



Perfil molecular tumoral del cáncer pulmonar medido por secuenciación de nueva generación

Molecular profile tumor of pulmonary cancer measured by next generation sequencing

Carla Paola Sánchez-Ríos,* María del Rosario Flores-Soto,* Jerónimo Rafael Rodríguez-Cid,* Luis Manuel Martínez-Barrera,* Patricio Santillán-Doherty,* Jorge Arturo Alatorre-Alexander*

*Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, México.

RESUMEN. Introducción: El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo; muestra un aumento en mujeres y no fumadores en la última década. Actualmente se trabaja bajo el enfoque diagnóstico-terapéutico con el conocimiento de la heterogeneidad de los tumores y la optimización en el análisis molecular con técnicas novedosas como la secuenciación genética. **Material y métodos:** Se realizó un estudio descriptivo y trasversal. Se incluyó 112 pacientes con cáncer. Se analizaron regiones relevantes en muestras de tejido tumoral para la búsqueda de mutaciones asociadas a cáncer en 15 genes y posteriormente se realizaron análisis descriptivo univariado. **Resultados:** Se observó una mayor frecuencia de mutaciones en TP53 (64.3%), seguido de 32 pacientes (28.6%) con mutación en receptor del factor de crecimiento epidérmico y 29 pacientes (25.9%) con mutación en ERBB2. Seguidas en orden de frecuencia KRAS, PIK3CA, KIT, BRAF y NRAS. No se encontraron mutaciones en AKT y MET. **Conclusiones:** Corroboramos por secuenciación de nueva generación la frecuencia aproximada informe de mutaciones en receptor del factor de crecimiento epidérmico y su asociación con antecedente de no fumar y el género femenino como se ha establecido en la literatura internacional.

Palabras clave: Cáncer de pulmón, secuenciación de nueva generación, pronóstico.

Abreviaturas:

- CP = Cáncer pulmonar.
- INER = Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.
- CPCNP = Cáncer pulmonar de células no pequeñas.
- EGFR = Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- KRAS = Gen KRAS.
- ALK = Cinasa de linfoma anaplásico.
- NCCN = National Comprehensive Cancer Network.
- ROS1 = Ros protooncogén 1.
- BRAF = Gen BRAF.
- RET = Protooncogén RET.
- MET = Protooncogén MET.
- EBUS = Ultrasonido endobronquial.
- NGS = Secuenciación de nueva generación.
- FFPE = Tejido fijado en formalina y embebido en parafina.
- qPCR = Reacción en cadena de polimerasa.
- PCR = Reacción en cadena de la polimerasa.

ABSTRACT. Introduction: Lung cancer is the leading cause of cancer death worldwide, showing an increase in women and non-smokers in the last decade. Currently, the diagnostic-therapeutic approach is being studied with the knowledge of the heterogeneity of tumors and the optimization in molecular analysis with novel techniques such as genetic sequencing. **Material and methods:** A cross-sectional and descriptive study was carried out. We included 112 patients with clinical stage IV non-small cell lung cancer. Relevant regions for the search for cancer-associated mutations in 15 genes were analyzed in tumor tissue samples and subsequently a univariate descriptive analysis was performed. **Results:** A higher frequency of mutations was observed in TP53 (64.3%), followed by 32 subjects (28.6%) with mutation in EGFR and 29 subjects (25.9%) with mutation in ERBB2. Followed in order of frequency KRAS, PIK3CA, KIT, BRAF NRAS. No mutations were found in AKT and MET. **Conclusions:** We corroborated by sequencing of new generation the approximate frequency reported of mutations in EGFR and its association with antecedent of smoking and the female gender as it has been established in the international literature.

Keywords: Lung cancer, next generation sequencing, prognosis.

NRAS = Protooncogén NRAS.

TKI = Inhibidores de tirosina cinasa.

HER2 = Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2.

MAP = Mitogen-Activated Protein (proteínas cinasas activadas por mitógenos).

FDA = Food and Drug Administration.

FISH = Hibridación fluorescente *in situ*.

Correspondencia:

Dr. Jorge Arturo Alatorre-Alexander

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Ciudad de México, México.

Correo electrónico: dr.j.alatorresq@gmail.com

Trabajo recibido: 16-IV-2019; aceptado: 16-VII-2019.

INTRODUCCIÓN

El CP sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer, el número de muertes estimadas mundialmente es de 1.6 millones según GLOBOCAN en 2012.¹ En 2018 se han estimado 1.8 millones de casos nuevos y únicamente 18% de pacientes con CP sobrevivirá a los cinco años después de realizarse el diagnóstico. Se ha proyectado que la incidencia de CP se incrementará de 14 millones de casos nuevos en 2012 a 22 millones en el año 2030.

En México, la incidencia y mortalidad por CP calculadas en el año 2012, fueron de 7.5 y 6.7 casos por 100,000 habitantes, respectivamente. La información estadística oficial muestra que el cáncer fue la tercera causa de mortalidad general en México con 73,240 muertes del total de 602,354 defunciones ocurridas en ese mismo año (12.2%). El cáncer de tráquea, bronquios y pulmón fue la tercera causa de mortalidad en varones durante 2012 con 4,152 defunciones (1.2% del total de 338,377 defunciones), sólo después de las enfermedades del corazón y la diabetes mellitus.

En comparación con los países desarrollados, en México los enfermos con CP se presentan a recibir atención especializada en etapas avanzadas de la enfermedad. Específicamente en el INER Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México, el CP representa la primera causa de muerte hospitalaria y la primera causa de hospitalización según la H. Junta de Gobierno institucional en relación a la centésima décima cuarta reunión de trabajo publicada en enero de 2019. Alrededor de 85% de esta patología corresponde a CPCNP, y el adenocarcinoma representa más de 50% de los casos en este grupo.² La mayoría de los pacientes tienen una enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico. Aunque la quimioterapia permanece como una forma importante del tratamiento, el desarrollo de nuevas drogas se ha centrado en terapias dirigidas a blancos moleculares. La efectividad de tales terapias dirigidas se basa en la presencia o ausencia de mutaciones «driver», las cuales son el principal mecanismo oncogénico de estas células.³

Las mutaciones del EGFR y KRAS, así como las translocaciones en ALK, se encuentran entre las primeras alteraciones genómicas importantes identificadas en el adenocarcinoma de pulmón, pero la lista ha crecido significativamente en los últimos cinco años.⁴⁻⁶ La consideración de las pruebas genéticas y la terapia dirigida basada en la alteración genómica es ahora el estándar de atención para pacientes con adenocarcinoma de pulmón en pacientes con enfermedad metastásica.⁷ Además de recomendar la evaluación de mutaciones en EGFR, KRAS y ALK, las pautas actuales de NCCN también incluyen pruebas para ROS1 y BRAF en esta población.⁸ Adicionalmente, se cuenta con estudios fase I y II para blancos en RET, MET y otros con resultados prometedores.⁹

La NGS es una tecnología que ha permitido aumentar de manera considerable la capacidad diagnóstica al incorporar la detección simultánea de múltiples alteraciones genéticas asociadas a cáncer a partir de una pequeña muestra de tejido, lo cual prepara el escenario para la toma de decisiones impulsada por genotipos para un número significativo de pacientes con adenocarcinoma de pulmón; además, con ello se tiene el potencial de impactar significativamente en la mortalidad por cáncer.¹⁰ En la actualidad, muchos pacientes son diagnosticados y estadificados con pequeñas muestras de biopsia por métodos como la aspiración transbronquial guiada por EBUS, criobiopsia, biopsias transbronquiales con fórceps o biopsias guiadas por ultrasonido o tomografía.^{11,12} Sin embargo, puede ser un reto realizar múltiples ensayos moleculares de un solo gen en pequeños especímenes de biopsia para los genes asociados al cáncer recomendados en las guías de la NCCN sin agotar el tejido disponible. Para maximizar la información de una sola biopsia, se han desarrollado plataformas multigen basadas en la NGS. Estas pruebas ofrecen una manera eficiente, rápida y precisa de identificar un panel selecto de mutaciones genómicas clínicamente relevantes en una pequeña fracción de la biopsia de tejido y se pueden integrar en la práctica clínica habitual.^{13,14} El panel ideal de genes blanco se expande constantemente y es necesario realizar la determinación de estas alteraciones genéticas para poder identificar un blanco terapéutico que permita ofrecer un tratamiento personalizado al paciente. Esta identificación del blanco terapéutico específico ideal para cada paciente ha derivado en supervivencias globales reportadas con una mediana de hasta 54 meses, lo cual contrasta con la mediana que se lograba únicamente con quimioterapia basada en platino que era de tan sólo nueve meses.¹⁵

El objetivo de este estudio es describir el perfil molecular tumoral de pacientes con CPCNP medido por NGS en el INER Ismael Cosío Villegas de la Ciudad de México.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio descriptivo y transversal se realizó en el INER Ismael Cosío Villegas, Alcaldía Tlalpan, Ciudad de México.

Se analizó la base de datos de los expedientes de pacientes diagnosticados con CPCNP atendidos en el INER durante 2018. Se solicitó al Servicio de Archivo Clínico del instituto los expedientes pertinentes para la revisión y llenado de hojas de cotejo formuladas por los mismos investigadores principales para determinar el perfil clínico.

De manera prospectiva se invitó a participar a todos los pacientes con diagnóstico reciente de CPCNP en el INER durante 2018 que contaran con bloques de tejido parafinado y en cantidad suficiente para el análisis molecular. Los

participantes firmaron consentimiento informado para que una sección de la biopsia de tumor en bloque de parafina se utilizara para realizar el estudio de mutaciones asociadas a cáncer por NGS.

Se realizó muestreo no probabilístico, por conveniencia, y se incluyó a todos los pacientes con muestras de tejido disponibles y apropiadas para realizar el análisis molecular y que autorizaron participar en el proyecto.

Criterios de selección

1. Criterios de inclusión: pacientes hombres o mujeres mayores de 18 años con diagnóstico histopatológico de CPCNP en el INER a partir de enero de 2017 y que autorizaran vía consentimiento informado la realización de la prueba de búsqueda de mutaciones asociadas a cáncer por NGS en tejido tumoral previamente obtenido como parte del seguimiento clínico.
2. Criterios de exclusión: no autorización para realizar la prueba.
3. Criterios de eliminación: tejido no óptimo para análisis molecular definido por el Servicio de Patología. Concentración y/o calidad del ADN extraído de tejido FFPE no óptima para el análisis molecular.

Procedimientos del estudio

Selección de tejido y extracción de ADN

La aprobación de las muestras para análisis molecular se realizó por patólogos expertos en el área del instituto. Se emplearon secciones de FFPE de biopsias tumorales. El patólogo analizó la muestra para garantizar un contenido de células tumorales > 75% cuando fuera posible y marcar el área del tumor. Posteriormente, se utilizaron secciones de tejido FFPE de 3 mm para la extracción de ADN genómico, se empleó el estuche de reactivos Allprep FFPE DNA/RNA Kit (QIAGEN). La calidad del ADN extraído se analizó por qPCR (FFPE QC Kit, Illumina) y se cuantificó por fluorometría (Qubit, Invitrogen).

Prueba de mutaciones asociadas a cáncer empleando NGS

A partir de 20 ng de ADN extraído se secuenciaron regiones relevantes para la búsqueda de mutaciones asociadas a cáncer en 15 genes para cada participante: AKT1, BRAF, EGFR, ERBB2, FOXL2, GNA11, GNAQ, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RET, TP53, se empleó el estuche de reactivos TruSight Tumor 15 (Illumina Way, San Diego, CA 92122). Brevemente, el estuche de reactivos se basa en la amplificación por PCR múltiple de 250 amplificaciones de 150-175 pb que cubren regiones relevantes para cáncer en los 15 genes mencionados. Las amplificaciones son generadas

en dos PCR múltiple y después marcados con secuencias índice, específicas para cada muestra. Después, los grupos de amplificaciones son secuenciados en corridas de ocho muestras en un equipo MiniSeq (Illumina), empleando cartuchos de 2 × 151 pb. El método permite identificar variantes con frecuencias de 5%, con una cobertura mínima de 500x. Los datos de secuenciación serán analizados e interpretados clínicamente empleando la base de datos SOPHiA Data-Driven Medicine de SOPHiA Genetics. Cabe mencionar que este proceso de detección de mutaciones asociadas a cáncer ha sido validado oficialmente en el Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas del INER mediante evaluación externa por parte de SOPHiA Genetics.

Análisis de mutaciones asociadas a cáncer e interpretación clínica

El análisis primario de los datos de secuenciación se realiza de manera rutinaria en el servidor de Illumina, BaseSpace (<https://basespace.illumina.com/home/index>), con el objeto de realizar el filtrado inicial de calidad y la generación de archivos fastq. Los archivos fastq con las lecturas de secuenciación serán analizados e interpretados clínicamente empleando la base de datos SOPHiA Data-Driven Medicine de SOPHiA Genetics (<https://www.sophiagenetics.com/>).

Esta plataforma permite visualizar las variantes e interpretar su significado clínico, lo cual asegura la protección de la información genética. La plataforma permite identificar de manera sencilla variantes genómicas patogénicas. Cada variante encontrada es guardada automáticamente en la base de datos global de SOPHiA y los usuarios pueden agregar una interpretación que será aplicada a cada paciente futuro que tenga la misma variante. Asimismo, la historia y frecuencia de una variante en los pacientes de la institución puede ser trazada y accesada por el usuario. Brevemente, los archivos fastq son cargados directamente en la plataforma y procesados de forma inmediata por medio de algoritmos avanzados patentados y procedimientos de aprendizaje automático, lo cual asegura una mayor exactitud en el análisis genómico. Una vez analizados los resultados, la interpretación se realiza a través de SOPHiA AI, que preclasiifica las variantes encontradas en clases patogénicas –desde una alta patogenicidad hasta benignas–. Por último, se genera un reporte de variantes desde la plataforma de SOPHiA, que incluye la interpretación clínica básica.

Análisis estadístico

Se realizó análisis descriptivo univariado para informar y examinar la frecuencia y las características de la población

estudiada con medidas de tendencia central (media, mediana y moda) y medidas de dispersión (desviación estándar, varianza y rango). Los análisis estadísticos se realizaron empleando el software SPSS versión 23.

RESULTADOS

Se incluyeron 112 pacientes con diagnóstico de CP, con un promedio de edad al diagnóstico de 61.95 ± 12.84 años. Con respecto al género, 69 (61.6%) fueron mujeres y 43 (38.7%) hombres.

En cuanto a antecedentes de exposición se pudo documentar esta variable en 109 casos, encontrando que 41 pacientes (37.6%) tenían antecedente de tabaquismo, 34 (31.2%) habían estado expuestos a biomasa y 34 (31.2%) habían tenido algún otro tipo de exposición de riesgo como fue exposición a hidrocarburos, metales, solventes inorgánicos y asbesto.

Con respecto a la estirpe de CP, la más frecuente fue el adenocarcinoma en 83 pacientes (71.4%), seguido del tipo escamoso en 26 individuos (23.2%) y en menor frecuencia el de células grandes, el cual se observó únicamente en tres pacientes (2.7%) (*Tabla 1*).

Se analizaron mediante secuenciación masiva los genes EGFR, ALK, TP53, BRAF, NRAS, ERBB2, AKT, PIK3CA, KIT y MET en tejido tumoral de CPCNP, encontrando lo siguiente (*Tabla 2*).

En los 112 pacientes incluidos en el estudio se observó una mayor frecuencia de mutaciones somáticas en TP53 (64.3%), seguido de 32 pacientes (28.6%) con mutación en EGFR y 29 sujetos (25.9%) con mutación en ERBB2. Únicamente se observaron 13 pacientes con mutaciones en KRAS (11.6%), cuatro con mutación en PIK3CA, dos con mutación en KIT, un paciente con mutación en BRAF y un sujeto en NRAS. No se encontraron mutaciones en ALK, AKT, PD-L1 y MET.

Es importante mencionar que de los 112 pacientes que se incluyeron en el estudio, 40 (35.7%) tuvieron ≥ 2 mutaciones somáticas en el tejido tumoral estudiado. Específicamente, 36 (32.1%) tuvieron dos mutaciones, y únicamente cuatro pacientes (3.6%) tuvieron tres mutaciones. Sólo en dos pacientes del total incluido en el estudio no presentaron alguna mutación.

Con respecto a TP53, en aquéllos con mutación somática se observó una edad promedio de 63.22 ± 13.46 comparado con 59.67 ± 11.45 años en quienes no tuvieron mutación. El género más frecuente fue el femenino tanto en quienes tuvieron mutación como en los que no, 45 (62.5%) y 23 (59.0%), respectivamente. En cuanto a la exposición, fue más frecuente el antecedente de tabaquismo en quienes tuvieron mutación; la exposición a biomasa fue más frecuente en quienes no presentaron mutación. La estirpe histológica más común

Tabla 1: Características sociodemográficas de los pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas en el INER.

Variable	n = 112 (media \pm DE; frecuencia y porcentaje)
Edad al diagnóstico	61.95 ± 12.84
Género	
Mujer	69 (61.6)
Hombre	43 (38.7)
Exposición	
Antecedente de tabaquismo*	41 (37.6)
Antecedente de exposición a biomasa†	34 (31.2)
Otras exposiciones de riesgo§	34 (31.2)
Estirpe de cáncer pulmonar de células no pequeñas	
Adenocarcinoma	83 (71.4)
Escamoso	26 (23.2)
Células grandes	3 (2.7)

* Se consideró exposición a tabaquismo como variable positiva a aquellos pacientes que habían consumido al menos 100 cigarrillos en su vida (según OMS).

† Se consideró exposición a biomasa como variable positiva a aquellos pacientes que tenían índice de exposición al humo de leña (IEHL) por arriba de 200 horas al año.

§ Exposición a hidrocarburos, asbesto, metales y/o solventes inorgánicos.

en pacientes con y sin mutación fue el adenocarcinoma (*Tabla 3*).

En relación con el EGFR, en los individuos con mutación somática se encontró una edad promedio de 60.18 ± 10.46 y de 62.66 ± 13.67 años en los que no. El género femenino fue el más frecuente tanto en el grupo con mutación como en los que no presentaron mutación. Se observó más exposición a biomasa en quienes tuvieron mutación en EGFR, mientras que los que no presentaron mutación tuvieron más exposición a tabaco. La estirpe histológica más frecuente en pacientes con y sin mutación fue el adenocarcinoma (*Tabla 3*).

DISCUSIÓN

Actualmente las guías internacionales recomiendan que se realice un panel ampliado de secuenciación (NGS) que permita identificar subgrupos de pacientes con mutaciones «driver» que ya han mostrado un beneficio al ser tratadas con TKI. Dicha prueba evalúa de manera simultánea las mutaciones en diferentes genes, incluyendo el EGFR, reordenamientos en el gen de la ALK, genes B-Raf (BRAF), ROS-1, K-RAS, MET y HER2 y varias otras moléculas que regulan diferentes vías de traducción de señales como son las vías de MAP cinasas o PI3K-AKT-MTOR.¹⁶ Hasta el momento la FDA ha aprobado diversos TKI contra los siguientes blancos terapéuticos: EGFR, BRAF, ROS1 y ALK.¹⁷

Tabla 2: Frecuencia de mutaciones en pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas medido por secuenciación de nueva generación en el INER.

Gen	Frecuencia y porcentaje (n = 112)		Mutación reportada	Frecuencia de mutaciones reportadas
	Con mutación	Sin mutación		
<i>TP53</i>	72 (64.3)	40 (35.7)	Exón 4 c.215C>G (p.Pro72Arg) c.139C>T (p.Pro47Ser) c.215C>G (p.Pro72Arg)l.c.639A>G (p.Arg213Arg) c.215C>G (p.Pro72Arg)l.c.818G>A (p.Arg273His) c.215C>G (p.Pro72Arg)l.c.734G>A (p.Gly245Asp)	68 1 1 1 1
<i>EGFR</i>	32 (28.6)	80 (71.4)	Exón 18 c.2156G>C (p.Gly719Ala) Exón 19 c.2235_2249delGGAATTAAGAGAGAAC p.Glu746.Ala750del c.2236_2250delGAATTAAG... (1) p.Glu746.Ala750del c.2239_2248delTTAAGAGA... (1) p.Leu747.Ala750delinsPro c.2240_2254delTAAGAGAA... (1) p.Leu747.Thr751del Exón 20 c.2303G>T (p.Ser768Ile) c.2361G>A (p.Gln787Gln) c.2369C>T (p.Thr790Met) Exón 21 c.2573T>G (p.Leu858Arg) c.2582T>A (p.Leu861Gln)	1 4 2 1 1 1 1 11 1
<i>ERBB2</i>	29 (25.9)	83 (74.1)	Exón 1 c.1873A>G (p.Ile625Val)	29
<i>KRAS</i>	13 (11.6)	99 (88.4)	Exón 2 c.35G>A (p.Gly12Asp) c.38G>A (p.Gly13Asp) c.34G>T (p.Gly12Cys) c.35G>T (p.Gly12Val) c.35G>C (p.Gly12Ala)	5 1 3 3 1
<i>PIK3CA</i>	4 (3.6)	108 (96.4)	Exón 10 c.1633G>A (p.Glu545Lys) c.1624G>A (p.Glu542Lys) Exón 21 c.3140A>G (p.His1047Arg)	2 1 1
<i>KIT</i>	2 (1.8)	110 (98.2)	Exón 17 c.2394C>T (p.Ile798Ile)	2
<i>BRAF</i>	1 (0.9)	111 (99.1)	Exón 15 c.1799T>A (p.Val600Glu)	1
<i>NRAS</i>	1 (0.9)	111 (99.1)	Exón 3 c.181C>A (p.Gln61Lys)	1
<i>ALK</i>	0 (0.0)	112 (100.0)	No se reportaron	NA
<i>AKT</i>	0 (0.0)	112 (100.0)	No se reportaron	NA
<i>MET</i>	0 (0.0)	112 (100.0)	No se reportaron	NA

Tabla 3: Estratificación de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas por factor de exposición.

Variable	TP53 n=112 (media ± DE; frecuencia y porcentaje)	
	Con mutación n = 72	Sin mutación n = 40
Edad al diagnóstico	63.22 ± 13.46	59.67 ± 11.45
Género		
Mujer	45 (62.5)	23 (59.0)
Hombre	27 (37.5)	16 (41.0)
Exposición		
Antecedente de tabaquismo	29 (40.8)	12 (31.6)
Antecedente de exposición a biomasa	19 (26.8)	15 (39.5)
Otras exposiciones de riesgo	23 (32.4)	11 (28.9)
Estirpe de cáncer pulmonar de células no pequeñas		
Adenocarcinoma	47 (65.3)	36 (90.0)
Escamoso	22 (30.6)	4 (10.0)
Células grandes	3 (4.2)	0 (0.0)
Variable	EGFR n = 112 (media ± DE; frecuencia y porcentaje)	
	Con mutación n = 32	Sin mutación n = 80
Edad al diagnóstico	60.18 ± 10.46	62.66 ± 13.67
Género		
Mujer	21 (67.7)	47 (58.7)
Hombre	10 (32.3)	33 (41.3)
Exposición		
Antecedente de tabaquismo	6 (19.4)	35 (44.9)
Antecedente de exposición a biomasa	16 (51.6)	18 (23.1)
Otras exposiciones de riesgo	9 (29.0)	25 (32.1)
Estirpe de cáncer pulmonar de células no pequeñas		
Adenocarcinoma	29 (90.6)	54 (67.5)
Escamoso	3 (9.4)	23 (28.7)
Células grandes	0 (0.0)	3 (3.8)

Varias mutaciones genéticas se han identificado como posibles blancos terapéuticos. Se han reconocido dos tipos de mutaciones en EGFR como las más frecuentes y significativas en la práctica clínica, las cuales representan 90% del total y han mostrado alta sensibilidad al bloqueo con TKI: delecciones en el exón 19 y la sustitución de leucina por arginina en el codón 858 del exón 21 (L858R).¹⁸ No obstante, hoy se sabe que existen mutaciones en el exón 20 (T790M/L858R, G719 y L861Q) que generan resistencia de novo o adquirida a los TKI.¹⁹

Con base en estos datos, la FDA ha aprobado a erlotinib, gefitinib, afatinib y osimertinib como tratamiento sistémico de primera línea para pacientes con mutaciones EGFR sensibles, ya que han demostrado una supervivencia libre de progresión al compararse con el estándar de tratamiento basado en platino de 10.9 a 18.9 meses versus 7.4 meses con riesgo relativo de 0.54 (IC 95% 0.38-0.79; p = 0.0012).²⁰ Un estudio reciente analizó la frecuencia de mutación de EGFR en pacientes europeos y encontró que estaba presente en 16.6%, observando una mayor frecuencia en mujeres (30%) que en hombres (8.2%), y una mayor proporción en no fumadores (38%) comparativamente con exfumadores (9.5%) y fumadores (5.8%).²¹

El reordenamiento de EML4-ALK se encuentra en 2 a 7% de pacientes con CPCNP.²² Se han identificado más de 20 variantes de EML4-ALK. El exón 13 (variante 1) y el exón 6a/b (variante 3a/b) de EML4 fusionado con el exón 20 de ALK generan las dos variantes más frecuentes que están presentes en más de 50% de los casos. El reordenamiento de ALK se encuentra casi siempre en el adenocarcinoma del subtipo sólido con presencia de células en anillo de sello, normalmente en pacientes jóvenes y mayoritariamente en no fumadores, siendo ocasional en tabaquismo.²³

Estudios clínicos han demostrado buenas respuestas con inhibidores de ALK, particularmente con alectinib, que mostró una mediana de supervivencia libre de progresión de hasta 35.2 meses versus 10.1 meses con crizotinib (ALEX trial), mostrando adecuada penetrancia al sistema nervioso central.²⁴ La fusión del gen ROS-1 ha sido identificada con una prevalencia de 1.7%.²⁵ Esta alteración es identificada en histología de adenocarcinoma, edad temprana al momento del diagnóstico y en personas que nunca fumaron con mayor frecuencia. Resulta interesante que los pacientes con CPCNP que presentan la translocación que genera el gen de fusión ROS-1 con CD74, SLC34A2 y fusiones del gen ROS-1 también se han identificado en pacientes con carcinoma epidermoide. Los pacientes ROS-1+ tratados con el TKI crizotinib o ceritinib han tenido tasas elevadas de respuesta similares a las de los pacientes ALK positivo.²⁶ Un estudio fase II demostró que la combinación de dabrafenib y de trametinib para el tratamiento de pacientes con CPCNP con la mutación V600E en el gen BRAF, presentaron una respuesta global de 64% y una respuesta libre de progresión con una mediana de duración de 10.4 meses.²⁷

También existen resultados alentadores con otros biomarcadores que han mostrado adecuadas tasas de respuesta como son: MET exón 14 que se encuentra en 1-2% de los casos y presenta tasa de respuesta de 44%; RET que se observa en 1% de los casos con tasa de respuesta de 17-38%.²⁸ Las mutaciones de HER2 representan 1.3% de los casos, con tasas de respuesta que varían entre 5-41%.²⁹

KRAS se encuentra entre 20-25%, sin ningún tratamiento dirigido hasta el momento.

La NGS analiza de manera simultánea miles de secuencias de ADN en una manera masiva, ofreciendo así un enfoque rentable para la detección de múltiples alteraciones genéticas en muestras tumorales. La sensibilidad obtenida por NGS es superior a la de la tecnología de secuenciación convencional, haciendo posible la detección de mutaciones que están presentes en porcentajes muy bajos en un fondo de ADN normal, lo cual es extremadamente importante para la detección de mutaciones somáticas. La aplicación a gran escala de esta tecnología en caracterización molecular de los tumores condujo a la generación de bases de datos que catalogan el genoma del cáncer, las cuales incluyen: COSMICO, *International Genome Consortium* y *Trial Cancer Genome Atlas*. Adicionalmente, la interpretación de variantes somáticas es factible debido a varios recursos de conocimiento disponibles y herramientas de interpretación en línea disponibles para clínicas y laboratorios de prueba.

La NGS nos permite no sólo identificar la presencia o ausencia de mutaciones, sino que se encuentra aprobada como método diagnóstico y se recomienda como método de preferencia de diagnóstico molecular, con múltiples estudios en el mundo que se han realizado utilizando esta técnica.³⁰ El uso de paneles de mutaciones basados en NGS ha demostrado excelentes tasas de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (cercanas al 100%) para encontrar las alteraciones existentes.³¹ Además, arriba de 50% de los pacientes tenía una mutación en un gen que podría estar relacionado con una terapia indicativa para acceder a un ensayo clínico, lo que enfatiza la importancia de su implementación. Por lo tanto, la caracterización molecular de los tumores es fundamental para la adecuación del tratamiento.

En la actualidad, en el INER, la determinación de las mutaciones asociadas a cáncer con relevancia clínica se hace en su mayoría mediante las técnicas de PCR y FISH, identificando únicamente alteraciones puntuales en el gen de interés de forma aislada; lo cual implica retraso en los tiempos de diagnóstico, mayor costo y dado que el tejido se obtiene por biopsias pequeñas suele no ser suficiente para analizar todas las mutaciones necesarias. La implementación de la detección de mutaciones en un panel de genes de interés para CPCNP basada en NGS permitirá identificar múltiples blancos con relevancia clínica o con potencial terapéutico de manera simultánea en nuestros pacientes.

Hasta el momento no se cuenta con un perfil molecular tumoral en la población del instituto, ni en población mexicana. Lo cual es de gran importancia a nivel individual para optimizar el tratamiento y a nivel poblacional para identificar la frecuencia de alteraciones de interés tera-

pétrico en nuestros pacientes. Es importante mencionar que los pacientes atendidos en el INER tienen factores sociodemográficos y de riesgo particulares, incluyendo una alta frecuencia de personas expuestas a humo de leña como factor de riesgo principal. Asimismo, es sabido que las frecuencias de exposición al humo de leña y tabaco en la población mexicana son diferentes a los de la población anglosajona y asiática.³²

Ante la alta prevalencia de CPCNP en nuestro instituto, es de suma importancia determinar cuáles y en qué frecuencia se encuentran las mutaciones genéticas con interés terapéutico, con el fin de ofrecer a los pacientes el mejor tratamiento disponible para cada caso. A su vez, es importante la descripción molecular y la determinación del perfil epidemiológico de cada una de las mutaciones en la población de pacientes atendidos en el INER, al ser éste un centro de referencia nacional para el estudio de pacientes con CP. Con el conocimiento de estas alteraciones podremos identificar subtipos de tumores dentro de la población general con CP, lo que permitirá brindar terapéutica individualizada y poder ofrecer mayor beneficio en términos de supervivencia de los pacientes con dicha patología.

CONCLUSIONES

Corroboramos por NGS la frecuencia aproximada reportada de mutaciones en EGFR y su asociación con no fumar y el género femenino, como se ha establecido en la literatura internacional. La realización de esta técnica en un número considerable de muestras de tejido tumoral podría representar el parteaguas entre las técnicas utilizadas en nuestro país, ya que corroboramos la factibilidad de realizarla. Lo que se debe considerar a futuro es la adquisición de nuevos *kits* en los que se incluya un mayor número de genes para obtener la mayor información posible y así poder caracterizar de mejor manera esta enfermedad en nuestra población con el menor riesgo posible en la adquisición de biopsias pequeñas y de igual manera el mejor tratamiento futuro. El 100% de los pacientes con mutación EGFR sensible a inhibidores de tirosina cinasa recibió tratamiento de manera oportuna.

REFERENCIAS

1. Arrieta O, Guzmán de Alba E, Alba López LF, et al. *Consenso Nacional de Diagnóstico y Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas*. Rev Invest Clin 2013;65(Supl.1):s5-s84.
2. Sharma SV, Settleman J. *ErbBs in lung cancer*. Exp Cell Res 2009;315(4):557-571. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.07.026.
3. Langer CJ, Besse B, Gualberto A, Brambilla E, Soria JC. *The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell*

- lung cancer.* J Clin Oncol 2010;28(36):5311-5320. doi: 10.1200/JCO.2010.28.8126.
4. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. *Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med 2010;363(18):1693-1703. doi: 10.1056/NEJMoa1006448.
 5. Schurbiers OC, Looijen-Salamon MG, Ligtenberg MJ, van der Heijden HF. *A brief retrospective report on the feasibility of epidermal growth factor receptor and KRAS mutation analysis in transesophageal ultrasound- and endobronchial ultrasound-guided fine needle cytological aspirates.* J Thorac Oncol 2010;5(10):1664-1667. doi: 10.1097/JTO.0b013e3181f0bd93.
 6. Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, et al. *American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: Epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy.* J Clin Oncol 2011;29(15):2121-2127. doi: 10.1200/JCO.2010.31.8923.
 7. Leighl NB, Rekhtman N, Biermann WA, et al. *Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the study of lung cancer/association for molecular pathology guideline.* J Clin Oncol 2014;32(32):3673-3679. doi: 10.1200/JCO.2014.57.3055.
 8. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. *Non-small cell lung cancer, version 6.2015.* J Natl Compr Canc Netw 2015;13(5):515-524. doi: 10.6004/jnccn.2015.0071.
 9. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al. *Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial.* Lancet Oncol 2017;18(10):1307-1316. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30679-4.
 10. Lee CK, Brown C, Gralla RJ, et al. *Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis.* J Natl Cancer Inst 2013;105(9):595-605. doi: 10.1093/jnci/djt072.
 11. Bulman W, Saqi A, Powell CA. *Acquisition and processing of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens in the era of targeted lung cancer chemotherapy.* Am J Respir Crit Care Med 2012;185(6):606-611. doi: 10.1164/rccm.201107-1199CI.
 12. Jurado J, Saqi A, Maxfield R, et al. *The efficacy of EBUS-guided transbronchial needle aspiration for molecular testing in lung adenocarcinoma.* Ann Thorac Surg 2013;96(4):1196-1202. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.05.066.
 13. Sequist LV, Heist RS, Shaw AT, et al. *Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice.* Ann Oncol 2011;22(12):2616-2624. doi: 10.1093/annonc/mdr489.
 14. Li T, Kung HJ, Mack PC, Gandara DR. *Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: Implications for current and future therapies.* J Clin Oncol 2013;31(8):1039-1049. doi: 10.1200/JCO.2012.45.3753.
 15. Amorín KE. *Cáncer de pulmón, una revisión sobre el conocimiento actual, métodos diagnósticos y perspectivas terapéuticas.* Rev perú med exp salud publica 2013;30(1):85-92.
 16. Dietz S, Sültmann H, Du Y, et al. *Patient-specific molecular alterations are associated with metastatic clear cell renal cell cancer progressing under tyrosine kinase inhibitor therapy.* Oncotarget 2017;8(43):74049-74057. doi: 10.18632/oncotarget.18200.
 17. NCCN guidelines version 3. 2018 Non-Small Cell Lung Cancer. Access date: 2018 March 14. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
 18. Varghese AM, Sima CS, Chaft JE, et al. *Lungs don't forget: Comparison of the KRAS and EGFR mutation profile and survival of collegiate smokers and never smokers with advanced lung cancers.* J Thorac Oncol 2013;8(1):123-125. doi: 10.1097/JTO.0b013e31827914ea.
 19. Mazza FD, Cappuzzo F. *Treating EGFR mutation resistance in non-small cell lung cancer – role of osimertinib.* Appl Clin Genet 2017;10:49-56. doi: 10.2147/TACG.S103471.
 20. Wu YL, Saijo N, Thongprasert S, et al. *Efficacy according to blind independent central review: Post-hoc analyses from the phase III, randomized, multicenter, IPASS study of first-line gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in Asian patients with EGFR mutation-positive advanced NSCLC.* Lung Cancer 2017;104:119-125. doi: 10.1016/j.lungcan.2016.11.022.
 21. Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, et al. *The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis.* Oncotarget 2016;7(48):78985-78993. doi: 10.18632/oncotarget.12587.
 22. Martelli MP, Sozzi G, Hernandez L, Pettrossi V, et al. *EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues.* Am J Pathol 2009;174(2):661-670. doi: 10.2353/ajpath.2009.080755.
 23. Kim H, Chung JH. *Overview of clinicopathologic features of ALK-rearranged lung adenocarcinoma and current diagnostic testing for ALK rearrangement.* Transl Lung Cancer Res 2015;4(2):149-155. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2014.12.02.
 24. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, et al. *Alectinib versus crizotinib in untreated alk-positive non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med 2017;377(9):829-838. doi: 10.1056/NEJMoa1704795.
 25. Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, et al. *Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations.* Virchows Arch 2016;469(5): 489-503. doi: 10.1007/s00428-016-2000-3.
 26. Zhao J, Li Q, Lin G, et al. *Mutation profiling and treatment choosing of Chinese ROS1 positive advanced lung cancer patients.* J Clin Oncol 2018. Access date: 2018 July 9. Available from: https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e21102.
 27. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, et al. *Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial.* Lancet Oncol 2017;18(10):1307-1316. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30679-4.
 28. Jorge SE, Schulman S, Freed JA, et al. *Responses to the multitargeted MET/ALK/ROS1 inhibitor crizotinib and co-occurring mutations in lung adenocarcinomas with MET amplification or MET exon 14 skipping mutation.* Lung Cancer 2015;90(3):369-374. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.10.028.
 29. Mar N, Vredenburgh JJ, Wasser JS. *Targeting HER2 in the treatment of non-small cell lung cancer.* Lung Cancer 2015;87(3):220-225. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.12.018.
 30. Liu L, Li Y, Li S, et al. *Comparison of next-generation sequencing systems.* J Biomed Biotechnol 2012;2012:251364. doi: 10.1155/2012/251364.
 31. Tops BB, Normanno N, Kurth H, et al. *Development of a semiconductor sequencing-based panel for genotyping of colon and lung*

- cancer by the Onconetwork consortium. BMC Cancer 2015;15:26. doi: 10.1186/s12885-015-1015-5.
32. D'Haene N, Le Mercier M, De Nève N, et al. Clinical validation of targeted next generation sequencing for colon and lung cancers. PLoS One 2015;10(9): e0138245. doi: 10.1371/journal.pone.0138245.

Declaración de intereses: Dr. Jorge Arturo Alatorre Alexander: Médico de educación continua, investigador y consultor de MSD, Bristol-Myers, Roche, Takeda, Amgen,

Abvie, Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, Pfizer, Celgen, Novartis y Bayer.

Dr. Jerónimo Rodríguez Cid: Médico de educación continua, investigador y consultor de MSD, Bristol-Myers, Roche, Takeda, Amgen, Abvie, Astra Zeneca, Boehringer Ingelheim, Pfizer, Celgen, Novartis y Bayer.

Conflictos de intereses: El resto de los investigadores no declaramos conflicto de intereses.