

Cáncer de pulmón de célula no pequeña ALK positivo.

Prevalencia y características.

La inmunohistoquímica como método diagnóstico.

Pablo Martínez Rodríguez



Universitat Autònoma de Barcelona

Directores: Enriqueta Felip Font
 Josep María Suriñach Caralt
Tutor: Albert Selva O'Callaghan

Barcelona, 2014

RESUMEN

Antecedentes: las translocaciones de ALK (anaplastic lymphoma kinase) representan una nueva diana terapéutica en un subgrupo de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP). En el presente estudio pretendemos analizar la prevalencia y características de los pacientes ALK positivo en una muestra de pacientes con CPCNP y valorar la utilidad de la inmunohistoquímica (IHC) como método diagnóstico.

Métodos: Se seleccionaron muestras tumorales de pacientes previamente testados para la presencia de mutaciones activadoras en EGFR (epidermal growth factor receptor) de forma local entre Junio de 2006 y Enero de 2010. La presencia de translocaciones de ALK se determinó mediante FISH (fluorescence *in situ* hybridization) y se exploró el uso de la IHC. Para la IHC de ALK se definió como positivo toda tinción de células tumorales de cualquier intensidad en $\geq 10\%$ de células tumorales.

Resultados: 99 pacientes fueron incluidos con una mediana de edad de 61.5 años (rango 35-83), 80% fueron adenocarcinomas, 7% escamosos y 13% NOS carcinomas. Cincuenta y uno por ciento eran mujeres. Todos eran caucásicos. Treinta y dos por ciento eran no fumadores y un 30% ex fumadores. Siete (7%) pacientes resultaron ALK positivos mediante FISH, 13 (13%) eran EGFR mutados y 65 (65.6%) eran nativos (WT/WT) para ALK y EGFR. Las translocaciones de ALK y las mutaciones de EGFR eran mutuamente excluyentes. Los pacientes ALK positivos tienden a ser más jóvenes que los EGFR mutados o los pacientes WT/WT (mediana de edad de 56.7, 63 y 62.3 años, respectivamente). Los pacientes ALK positivos eran predominantemente no fumadores (71.4%) y adenocarcinomas (71.4%). Los pacientes ALK positivos y los EGFR mutados tienen una mejor supervivencia que los pacientes WT/WT. Todos los pacientes ALK negativos por FISH fueron negativos para ALK mediante IHC. De los 7 pacientes ALK positivos mediante FISH, 5 fueron también positivos para ALK por IHC, uno fue negativo y en otro no había material suficiente para realizar el análisis.

Conclusiones: la prevalencia de translocaciones de ALK es del 7% en una población seleccionada de pacientes caucásicos con CPCNP. Los pacientes ALK positivos tienen características clínicas particulares y un mejor pronóstico que los pacientes ALK negativos y EGFR WT. La IHC con el anticuerpo D5F3 es un método diagnóstico preciso para identificar a los pacientes ALK positivo.

ABSTRACT

Background: ALK rearrangement represents a novel molecular target in a subset of non small cell lung cancers (NSCLC). Our aim is to explore fluorescence in situ hybridization (FISH) and immunohistochemistry (IHC) as diagnostic methods, prevalence and clinical outcomes of ALK rearrangement patients in a selected population of NSCLC.

Methods: Patients with NSCLC previously screened for EGFR mutation at our institution between June 2006 and January 2010 were selected. ALK rearrangement was identified by using FISH and the value of IHC (D5F3 monoclonal antibody-mAb) was explored. For IHC ALK protein expression positivity was defined as tumor-specific staining of any intensity in $\geq 10\%$ of the tumour cells.

Results: 99 patients were identified with median age was 61.5 years (range 35-83), 80% were adenocarcinomas, 7% squamous and 13% NOS carcinomas. 51% patients were female. All were caucasian. 32% of the patients were never smokers and 30% former smokers. 7 (7%) patients were ALK rearranged positive by FISH, 13 (13%) were EGFR mutant and 65 (65.6%) were wild type (WT/WT) for both ALK and EGFR. ALK rearrangements and EGFR mutations were mutually exclusive. ALK rearranged patients tend to be younger than EGFR mutated or WT/WT patients (median age of 56.7, 63 and 62.3 years, respectively). Patients with ALK positive tumors were predominantly never smokers (71.4%) and adenocarcinomas (71.4%). ALK positive and EGFR mutant patients have a better survival than WT/WT. All patients with ALK FISH negative tumors were negative for ALK IHC. Out of 7 patients positive for ALK FISH, 5 were also positive for ALK IHC, 1 negative and in the other there was not enough tissue to perform the analysis.

Conclusions: The prevalence of ALK rearrangement is 7% in a caucasian selected population of NSCLC. ALK positive patients have different clinical features and a better prognostic than EGFR WT and ALK negative patients. IHC with D5F3 mAb against ALK is a promising method for detecting ALK rearranged NSCLC patients.

III. ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN

- a. El cáncer de pulmón.
 - i. Generalidades
 - ii. El cáncer de pulmón en el no fumador
 - iii. Presentación clínica del CPCNP
- b. Estadiaje y tratamiento del cáncer de pulmón
- c. Terapias dirigidas a diana en función de selección molecular: la importancia de la biología molecular del cáncer de pulmón
 - i. Las translocaciones de ALK como segunda alteración molecular con tratamiento diferenciado en CPCNP
- d. La implicación de ALK en la oncogénesis de diversos tumores diferentes al CPCNP
- e. El CPCNP ALK positivo
 - i. Métodos diagnósticos de los pacientes con CPCNP ALK positivo
 - ii. La inmunohistoquímica de ALK como método diagnóstico

II. Justificación y objetivos

- a. Interés del presente trabajo e investigación
- b. Objetivos

III. Material y métodos

- a. Pacientes
- b. Muestras tumorales

IV. Resultados

V. Discusión

- a. Interpretación
- b. Presente y futuro de la IHC con D5F3
- c. Presente y futuro del tratamiento de los pacientes con CPCNP ALK positivo

- VI. Conclusiones
- VII. Referencias
- VIII. Comunicaciones y publicaciones.

IV. INTRODUCCIÓN:

El cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) ALK (anaplastic lymphoma kinase) positivo constituye una nueva entidad clínica y terapéutica dentro del espectro de tumores pulmonares[1]. Supone aproximadamente un 4% del total de casos de CPCNP [2-4]. Si tenemos en cuenta la alta incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón en general el subgrupo de pacientes con CPCNP ALK positivo representan el equivalente a la mortalidad anual de los melanomas, cáncer de cérvix o tumores laríngeos y sería superior a la de los tumores germinales, tiroides y linfomas de Hodgkin[5].

Una de las características principales del CPCNP ALK positivo, además de la posibilidad de recibir tratamientos específicos, la constituye el hecho de que es más frecuente entre los pacientes con CPCNP sin historia de tabaquismo[6]. La incidencia del CPCNP en no fumadores ha aumentado en los últimos tiempos[7]. El cáncer de pulmón en el no fumador será objeto de revisión en la introducción del presente trabajo. Por otro lado, conocer mejor la frecuencia y características clínicas de los pacientes con CPCNP ALK positivo en nuestro medio es otro de los objetivos del presente trabajo de investigación.

Una correcta identificación de los pacientes con CPCNP ALK positivos y la indicación del tratamiento específico tiene un impacto favorable en la supervivencia de estos pacientes[8]. Encontrar un procedimiento diagnóstico que permita la identificación de este subtipo de carcinoma pulmonar ALK positivo dentro de una amplia población de pacientes con CPCNP es crucial en la implementación de las terapias con inhibidores de ALK. La técnica considerada estándar en la actualidad, el FISH, es relativamente compleja, requiere de especialistas y medios adecuados y tiene un coste superior a otras posibles técnicas diagnósticas. Es por ello que la búsqueda de métodos precisos y asequibles para la sociedad surge como una necesidad. La inmunohistoquímica (IHC) representa una opción barata y accesible. Otro objetivo del presente trabajo es explorar el papel de la IHC como método diagnóstico de los pacientes ALK positivos.

V. EL CÁNCER DE PULMÓN.

GENERALIDADES.

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer en el mundo y supone aproximadamente unas 20.000 muertes anuales en España[9]. Del total de cánceres de pulmón aproximadamente el 85% se clasifican histológicamente como CPCNP[10]. La mayoría de los CPCNP son directamente atribuibles al hábito tabáquico. El riesgo de desarrollar cáncer pulmonar tiene una relación directa con la cantidad y la duración de la exposición al humo del tabaco[11]. Existe un patrón geográfico mundial de distribución de tabaquismo e incidencia de cáncer pulmonar[12]. Así, los países con mayor incidencia de cáncer de pulmón son aquellos en los que el tabaquismo es más frecuente. El tabaquismo representa la primera causa de muertes prevenibles en el mundo desarrollado, incluyendo aquí todos los tipos tumorales relacionados y las complicaciones cardiorrespiratorias[13]. La intensidad y duración del consumo de tabaco es el principal factor de riesgo de cáncer de pulmón. Sin embargo, es importante destacar que el cese del tabaquismo puede modular ese riesgo. Así, el riesgo de cáncer de pulmón de los exfumadores se reduce de forma significativa con el tiempo tras el abandono del consumo[14], aunque nunca llega a ser igual al del no fumador.

La relación entre tabaco y cáncer de pulmón es conocida desde hace décadas. Sin embargo, en los últimos tiempos el cáncer de pulmón entre los no fumadores ha cobrado importancia. Esta nueva entidad clínica de CPCNP en no fumadores tiene particularidades etiológicas, clínicas y moleculares[15]. El interés en estudiar este subgrupo de pacientes viene marcado porque el pronóstico, histología, alteraciones moleculares y opciones terapéuticas de estos tumores pueden ser distintos al del carcinoma pulmonar clásico.

Uno de los recientes avances en el tratamiento del CPCNP es la incorporación de los inhibidores de la actividad tirosina quinasa (TKI) de la proteína ALK en el tratamiento de pacientes con CPCNP ALK positivo. Este subgrupo de pacientes representa entre el 2-5% del total de CPCNP. Frecuentemente, los pacientes con esta alteración son no fumadores[1]. La tasa de respuesta, calidad de vida y la supervivencia son mejores en estos pacientes cuando reciben tratamiento con un TKI de ALK como crizotinib que cuando reciben el tratamiento con quimioterapia estándar habitual[16]. Los pacientes con CPCNP ALK positivos se incluyen predominantemente dentro del grupo de pacientes con carcinoma pulmonar sin historia de tabaquismo.

La definición de un tumor pulmonar como ALK positivo se realiza tras un análisis molecular mediante FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) sobre una muestra de tumor[17]. Otras técnicas diagnósticas como la IHC (inmunohistoquímica) también han sido exploradas. Las potenciales ventajas del uso de la IHC como método diagnóstico en los pacientes ALK positivo serían una mayor facilidad de universalización en el acceso a este test diagnóstico y que es una técnica más asequible técnica y económicamente[18].

EL CÁNCER DE PULMÓN EN EL NO FUMADOR.

Se estima que entre el 5-15% de hombres y el 15-50% de mujeres diagnosticadas de cáncer de pulmón en el mundo son no fumadores[19]. La importancia de este tipo de cáncer de pulmón muestra una tendencia ascendente en los últimos años y en la actualidad es una de las diez primeras causas de muerte por cáncer en Estados Unidos[20-22].

Los agentes precursores y promotores de la carcinogénesis no asociada al consumo directo de tabaco también han sido estudiados. Entre los factores etiológicos asociados al cáncer de pulmón en no fumadores están:

1. **Exposición ambiental al humo del tabaco.** La relación entre la exposición ambiental al humo del tabaco y el cáncer de pulmón se reportó por primera vez hace ya 30 años[23]. Desde entonces, diversos estudios epidemiológicos han permitido estimar que existe un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón por exposición secundaria al humo del tabaco del 35% en hombres y del 25% en mujeres en comparación con hombres y mujeres no expuestos[24]. Uno de los estudios más destacados en este sentido es el estudio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and nutrition). La población del estudio incluyó más de 500.000 voluntarios de 10 países europeos entre los años 1993 y 1998[25]. Se disponía de datos sobre exposición ambiental al humo del tabaco de 123.479 no fumadores y exfumadores (95.947 mujeres), de los que 97 desarrollaron cáncer de pulmón. El riesgo relativo para desarrollar cáncer de pulmón en la cohorte fue de 1.34 (95% CI, 0.85-2.13), siendo para los exfumadores de 2.32 (0.94-5.71) y para los nunca fumadores de 1.05 (0.60-1.82). Por sexos, los hombres tenían un riesgo relativo mayor que las mujeres de desarrollar cáncer de pulmón, 1.96 (0.68-5.67) y 1.20 (0.71-2.02), respectivamente. El riesgo de desarrollar cáncer de pulmón era mayor cuando la exposición

tenía lugar en el lugar de trabajo que en el domicilio, 1.65 (1.04-2.63) frente a 1.03 (0.60-1.76), respectivamente. Los recientes cambios en la legislación vigente sobre prohibición de consumo en lugares públicos pretenden incidir sobre este factor de riesgo, habiendo consenso de expertos a nivel internacional sobre sus beneficios.

2. **Exposición a humos de combustión domésticos.** La baja tasa de tabaquismo entre las mujeres asiáticas con CPCNP fomentó el interés por identificar otros factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer. Diversos estudios centrados sobre todo en poblaciones del sudeste asiático identifican la exposición a los humos derivados del uso de aceites en la cocina o de la combustión doméstica de madera/carbón como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer[26, 27]. En un estudio de casos y controles con 672 mujeres diagnosticadas de cáncer de pulmón (la mayoría no fumadoras) y con 735 controles se identificó el humo de aceite de colza como un factor que aumentaba el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón[28]. Cocinar más de 30 veces a la semana se asociaba con un incremento del riesgo. La exposición al humo del carbón también se ha asociado con un aumento del riesgo de cáncer de pulmón en mujeres chinas. En un estudio de casos y controles (965 pacientes y 959 controles) con mujeres chinas se reportó un aumento del riesgo de cáncer de pulmón del 1.5 (CI 1.1-2.0) con el uso de una forma de estufa doméstica de carbón[29]. En otro estudio se detectó un aumento del riesgo de cáncer de pulmón en ambos sexos con la exposición prologada a los humos de combustión domésticos[30]. Sin embargo, es apropiado señalar que otros estudios similares no han encontrado dicha asociación[27, 28]. Además, la propia naturaleza de los estudios caso-control hace que puedan verse afectados por sesgos de información, imprecisiones en la cuantificación de la exposición u otros factores de confusión como la exposición ambiental al humo del tabaco. En cualquier caso, existe evidencia de la presencia de carcinógenos en los humos de combustión o cocina domésticos por lo que campañas destinadas a mejorar la ventilación y métodos de cocinado podrían ser pertinentes.

3. **Susceptibilidad genética hereditaria.** La evidencia disponible en la actualidad apoya que la presencia de historia familiar de cáncer de pulmón se asocia con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Esto es así tanto en fumadores como en no fumadores[31, 32]. Las bases de datos sobre cáncer y riesgo familiar más amplias son el registro familiar de Utah, que incluye más de 125.000 individuos, y en el registro sueco sobre cáncer, que incluye más de 1.200.000 casos. El análisis del estudio sueco muestra que el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón entre los familiares de primer grado de un paciente es del 1.9 (95% CI 1.6-2.4)[33]. Ese riesgo familiar se sitúa en el rango de otros tumores con componente genético conocido, incluyendo el cáncer de mama (riesgo del 1.5) y el de colon (riesgo del 1.9). En el registro de Utah, el riesgo de cáncer de pulmón entre los familiares de primer grado de un paciente era del 2.55[34].

a) **Genes que predisponen a desarrollar cáncer de pulmón.**

Se han identificado algunos genes cuya alteración puntual puede predisponer al desarrollo de cáncer de pulmón. Se sitúan aquí las mutaciones germinales en *TP53* presentes en familias con el síndrome de Li-Fraumeni[35, 36]. También se han descrito casos esporádicos de transmisión por línea germinal de mutaciones de *EGFR* en familias con miembros diagnosticados de CPCNP[37]. La vía de señalización de EGFR y sus mutaciones son un proceso biológico relevante en el CPCNP. No obstante, hasta el momento no se han reportado más que casos esporádicos de estos agrupamientos familiares por lo que para estimar su peso relativo en la susceptibilidad genética hereditaria al CPCNP se necesitan más estudios. En cualquier caso, estas alteraciones monogénicas sólo explicarían una pequeña porción del total de casos de CPCNP con agrupación familiar.

b) **Variantes genéticas polimórficas.** Los polimorfismos en genes que codifican para enzimas que participan en el metabolismo de algunos compuestos carcinogénicos pueden modular el riesgo de desarrollar cáncer. Entre las más estudiadas se sitúan los

polimorfismos de la enzima CYP1A1. Esta proteína es un miembro de la familia del citocromo P450s y participa en la vía de metabolización de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)[38]. Los HAP son productos presentes en el humo del tabaco que actúan como carcinógenos[39]. En un análisis combinado de 11 estudios se identificó el polimorfismo en el exón 7 del gen *CYP1A1* como factor de riesgo de presentar cáncer[40]. Además, existía un aumento del riesgo de desarrollar CPCNP estadísticamente significativo en los fumadores con dicho polimorfismo en el exón 7 del gen *CYP1A1*. Otra variante polisómica, en gen *GSTM1* (Glutathione S Transferase M1), también aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón[41]. Los individuos con una delección homocigota en *GSTM1* aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón cuando existe exposición al humo del tabaco[42] y también entre no fumadores[43].

c) **Estudios de asociación génica.** Estos estudios consisten en realizar comparativas de riesgos sobre amplias muestras poblacionales de casos y controles en base a diversas variantes génicas. Se pretende así encontrar áreas de interés en el genoma que se asocien a riesgo de cáncer de pulmón. El estudio de esas regiones de riesgo podría identificar genes concretos que abrieran la puerta a un mejor conocimiento de la enfermedad. En 2008 los grupos International Agency for Research on Cancer (IARC), MD Anderson y DeCode comunicaron datos de estudios realizados mediante esta aproximación[44-46]. En total se incluyeron más de 5.000 casos de cáncer de pulmón y de 15.000 controles sanos. En los tres estudios se identificó una región de susceptibilidad en 15q25.1. El estudio del IARC, señaló otras zonas interesantes del DNA como de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón: 6p21 y 5p.

(1) Asociación del locus 15q25 y cáncer de pulmón. En esta región se localizan 3 genes que codifican para los receptores nicotínicos de acetilcolina. Se especula que

variantes en estos genes podrían actuar aumentando la adicción a la nicotina en el sujeto portador. Sin embargo, esta explicación no sería suficiente por sí sola, pues también se ha evidenciado que esa región del genoma es de riesgo para cáncer de pulmón en estudios con no fumadores[47].

(2) Cáncer de pulmón y locus 5p15. Esta región del DNA contiene dos genes relevantes: TERT, esencial en el mantenimiento de la actividad telomerasa y replicación celular, y CLPTM1L, cuyo papel es menos conocido pero que actúa como factor de resistencia a cisplatino en líneas celulares tumorales. Dos variantes génicas localizadas en este locus (rs402710 y rs2736100) se han reportado como asociadas a un aumento del riesgo de cáncer de pulmón [48, 49].

(3) Distintas variantes poblacionales en la región 6p21 se han asociado con un aumento de riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en algunos grupos étnicos[50, 51].

4. Exposición profesional.

a) Gas Radón. El radón es un producto de la degradación del uranio asociado al desarrollo de cáncer de pulmón en trabajadores de minas de uranio[52]. El radón es un emisor de partículas alfa las cuales tienen la capacidad de provocar daños en el DNA y podrían afectar así a las células de las vías respiratorias. Se ha descrito la inactivación del gen supresor de tumores p16 como una de las alteraciones genéticas procancerígenas producidas por el radón[53]. El radón también puede estar presente en el suelo y en el aire como contaminante y se le considera un factor de riesgo del cáncer de pulmón en la población general[54].

b) **Asbestos.** La exposición laboral a los asbestos es un factor de riesgo sólidamente establecido del desarrollo de cáncer de pulmón[55]. El incremento del riesgo de cáncer depende de la

duración de la exposición y del tipo de fibras[56]. En un estudio holandés sobre factores de riesgo identificó la exposición a asbestos como uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de CPCNP[57]. En dicho estudio se evaluaba la importancia de la dieta, estilos de vida, niveles socioeconómicos, ocupación y riesgo de cáncer en un total de 340.439 individuos. Los individuos debían aportar datos en un cuestionario que incluía diferentes aspectos de todas esas variables. La exposición ocupacional al asbesto se relacionó con un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de pulmón, sobre todo ente los varones en el tercil con mayor exposición (RR 3.60, CI 95% 1.48-8.74).

5. **Factores hormonales.** La incidencia de cáncer de pulmón en no fumadores es claramente superior en mujeres que en varones, por lo que existe considerable interés en estudiar el posible papel de la hormonas sexuales en la carcinogénesis y desarrollo del CPCNP[58]. El receptor de estrógenos se encuentra expresado tanto en tejido pulmonar sano como en tejido tumoral y en ambos sexos. Los estrógenos son capaces de estimular tanto el crecimiento de las células epiteliales normales como el de las tumorales, y se especula sobre distintos mecanismos que podrían estar implicados en la carcinogénesis pulmonar:

- a) Activación directa de la vía mediante la unión hormona-receptor[59].
- b) Ciertos metabolitos de los estrógenos podrían ser genotóxicos[60].
- c) Activación de otras vías de señalización de forma indirecta estimulando el crecimiento y diferenciación celular[61].
- d) Existen datos que indican un papel de los estrógenos en la angiogénesis[62].

6. **Enfermedades pulmonares previas.** Aunque se puede encontrar una asociación entre cáncer de pulmón y algunas enfermedades

pulmonares[63-65], en la mayoría de los casos son enfermedades producidas por el consumo de tabaco. No obstante, parece que mujeres no fumadoras con enfermedades pulmonares benignas (asma, neumonía, fibrosis pulmonar idiopática o tuberculosis) tienen un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de pulmón[66].

7. **Virus oncogénicos.** Los virus son los principales responsables de la oncogénesis por causa infecciosa. Los datos más relevantes sobre tumores pulmonares asociados a infecciones víricas hacen referencia al virus del papiloma humano (VPH). Existen algunas series, predominantemente de países asiáticos, en las que se llega a detectar la presencia del VPH serotipos 16/18 en más del 50% de las muestras de pacientes con cáncer de pulmón[67].

PRESENTACIÓN CLÍNICA DEL CPCNP

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial y se prevé que persista siendo uno de los principales problemas de salud en un futuro próximo[68]. Aunque en cáncer de pulmón continúa siendo más prevalente en varones la incidencia en mujeres ha aumentado de forma clara en las últimas décadas[69]. La mediana de edad al diagnóstico se sitúa en la séptima década de la vida aunque hasta en un 10% de los casos debuta a edades inferiores a los 50 años[70].

La presentación clínica es muy variable. Así, la mayoría de los pacientes con tumores en estadios iniciales son asintomáticos mientras que los pacientes sintomáticos tienen en su mayoría enfermedad avanzada. Las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes con CPCNP aparecen reflejadas en la Tabla 1.

Síntomas	Presencia al diagnóstico (%)
Tos	45-75
Disnea	40-60
Pérdida de peso	20-70
Dolor torácico	30-45
Hemoptisis	25-35
Dolor óseo	6-25
Fatiga	0-20
Disfagia	0-2
Estridor/ <u>sibilancias</u>	0-2
Ninguno	2-5

Tabla 1. Síntomas al diagnóstico de CPCNP. Adaptado de *Principles and practice of lung cancer*, 2010.

8. SÍNTOMAS POR AFECTACIÓN LOCAL PULMONAR.

Tos. Es el síntoma más frecuente de los pacientes con cáncer de pulmón. Está presente en la mayoría de los pacientes al diagnóstico y suele aparecer en la práctica totalidad de los pacientes con CPCNP avanzado en algún momento de la evolución de la enfermedad[71]. Las causas de la tos pueden ser diversas: tumor central, neumonitis obstructiva, metástasis pulmonares múltiples o derrame pleural. El tratamiento de la tos asociada al cáncer es más eficaz cuando va dirigido a la causa subyacente. Así, los tratamientos cáncer específicos son más eficaces que otros tratamientos sintomáticos. En pacientes con afectación de la vía aérea también puede ayudar el uso de broncodilatadores.

Hemoptisis. Aunque su cuantía puede variar en intensidad la forma más frecuente de presentación es la expectoración hemoptoica. El manejo de la hemoptisis en pacientes con cáncer depende de su severidad. La expectoración hemoptoica ocasional no requiere de ningún tratamiento específico. En casos más severos son necesarios el uso de antitusivos y de medidas higiénicas como el reposo lateral sobre el pulmón con sangrado. En casos amenazantes para la vida por su cuantía, crónica o aguda, se puede considerar el uso de radioterapia, cirugía electiva o embolizaciones[72-74]. Globalmente, la mayoría de los

pacientes tendrán unas expectativas de vida limitadas y la actitud terapéutica a seguir debe ser consistente con el pronóstico de cada paciente.

Dolor torácico. El dolor torácico es un síntoma frecuente que puede ocurrir incluso en estadios iniciales en ausencia de invasión de pared torácica, pleura o mediastino. El origen en estos casos no está claro, pues el parénquima pulmonar carece de inervación algésica. El dolor puede ser retroesternal cuando hay adenomegalias hiliares o mediastínicas o cuando existe infiltración pericárdica. En estos casos el dolor es más inespecífico y difuso que el dolor secundario a infiltración pleural o de la pared torácica. Una apropiada pauta analgésica, que puede incluir el uso de opioides mayores, debe ser indicada junto con la terapia antitumoral escogida.

Disnea. Es uno de los síntomas más frecuentes en pacientes con cáncer de pulmón. Aparece en la mayoría de los pacientes en algún momento del curso de la enfermedad[75]. La disnea puede deberse al propio tumor, a la patología pulmonar de base del paciente o a una combinación de múltiples factores. El tratamiento apropiado requiere de una valoración detallada de las causas subyacentes, pues no siempre se debe únicamente al tumor pulmonar. El tratamiento sintomático incluye el uso de oxigenoterapia, opioides y sedantes. El oxígeno es especialmente eficaz en el tratamiento de pacientes con hipoxia[76, 77]. Su utilidad en pacientes sin ella es más dudosa. El uso de opioides siempre ha suscitado controversias por el riesgo de depresión respiratoria en pacientes con funcionalismo pulmonar comprometido, aunque a las dosis habituales se consideran seguros[78, 79]. Lo mismo ocurre con el uso de sedantes[80, 81]. En los pacientes con EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) la administración de corticoides también puede ser de utilidad. La disnea es uno de los síntomas más discomfortantes para el paciente y la familia por lo que el óptimo tratamiento de la misma debe ser uno de los objetivos de todo plan terapéutico integral.

Sibilancias. Las sibilancias son un síntoma que puede aparecer sobre todo cuando existe afectación de los bronquios principales o lobares. Este síntoma no debe confundirse con las sibilancias generalizadas del broncoespasmo. El paciente a menudo es capaz de localizar el punto desde donde se producen las sibilancias. En las lesiones endobronquiales, cuando la resección quirúrgica no forme parte del plan terapéutico, el uso de técnicas de tratamiento endoluminales puede ser de utilidad[82-84].

Pneumonitis. Un cuadro atípico de neumonía puede aparecer en los pacientes con cáncer. La clínica de disnea, tos o dolor pleurítico a veces sin fiebre y el hallazgo en las pruebas de imagen de condensaciones lobares lleva al diagnóstico clínico de neumonía y la indicación de antibióticos.

9. SÍNTOMAS POR AFECTACIÓN LOCORREGIONAL TORÁCICA

Disfonía. En la mayoría de los casos se produce por parálisis de la cuerda vocal izquierda secundaria a una afectación del nervio laríngeo recurrente izquierdo. Esto se debe a que el nervio pasa en su trayecto torácico por debajo del cayado aórtico siendo susceptible de compresión o invasión por tumores hiliares, adenopatías hiliares o adenopatías mediastínicas. En otros casos puede ser el resultado de un tratamiento quirúrgico previo en el que la sección del nervio era necesaria para la extirpación completa del tumor pulmonar.

Parálisis del nervio frénico. El nervio frénico en su trayecto bilateral torácico a través del pericardio puede ser infiltrado por adenopatías o por masas pulmonares. El daño del mismo provoca la parálisis del hemidiafragma correspondiente. Su lesión se traduce radiológicamente en una disminución de volumen de ese hemitórax con elevación del hemidiafragma ipsilateral.

Disfagia. La disfagia puede ser el resultado de la compresión esofágica por adenomegalias en el mediastino. Otra potencial causa de disfagia puede ser que una afectación del nervio laríngeo recurrente curse con afectación de la inervación de la musculatura deglutoria.

Estridor. Su causa es el compromiso de la luz de la tráquea. Puede ser el resultado de una compresión o secundario a una parálisis bilateral de las cuerdas vocales. Es una complicación potencialmente letal y el tratamiento debe ir dirigido a salvar la oclusión del paso aéreo. Para ello, se pueden considerar la cirugía, procedimientos endoluminales locales o la radioterapia sin olvidar el tratamiento propio de la enfermedad de base.

Síndrome de vena cava superior (SVCS). Es una complicación relativamente frecuente en el cáncer de pulmón[85]. Generalmente es consecuencia de la obstrucción de la vena cava superior por adenopatías paratraqueales derechas o tumores primarios pulmonares localizados en el lóbulo superior del pulmón derecho. La clínica típica se caracteriza por la presencia de edema y congestión facial, tos y distensión de las venas cervicales y torácicas superficiales. La extensión y severidad de los síntomas depende de la rapidez de instauración de la obstrucción. Así, una rápida obstrucción del retorno venoso puede incluso provocar edema cerebral y muerte de forma precoz. En la mayoría de los casos de SVCS en pacientes con CPCNP el tratamiento suele ser la radioterapia local. En casos seleccionados también se puede considerar el uso de stents endoluminales[86, 87].

Derrame pleural. Aproximadamente un 15% de los paciente con CPCNP presentan derrame pleural al diagnóstico. Sin embargo, no todos los derrames son malignos. El diagnóstico se suele producir mediante el estudio citológico del líquido. Este diagnóstico puede ser importante cuando condiciona un tratamiento radical con cirugía o quimiorradioterapia. El estudio citológico del líquido pleural también puede condicionar cambios en el tratamiento cuando es la única evidencia de progresión de la enfermedad en la respuesta al mismo. En estos casos la confirmación mediante citología y su distinción de otras causas no metastásicas como atelectasias, neumonitis o fallo cardíaco es importante. El tratamiento de un derrame pleural maligno puede variar enormemente en función de la situación y pronóstico basal del paciente[88]. Así, se puede considerar realizar desde una toracotomía con talcaje hasta drenajes permanentes o simples toracocentesis sintomáticas. En algunos casos donde el derrame no es muy importante el inicio de un tratamiento sistémico puede ser eficaz y evita que los pacientes reciban tratamientos locales agresivos.

Derrame pericárdico. El derrame pericárdico aparece en un 5-10% de pacientes con CPCNP[89]. Los pacientes normalmente presentan disnea y ortopnea como síntomas iniciales. También puede cursar con ansiedad, presión subesternal, distensión venosa yugular y hepatomegalia. En los casos severos en que se produce taponamiento pericárdico el curso puede ser rápidamente letal y los síntomas inespecíficos pueden hacer difícil el diagnóstico. En todo paciente con CPCNP con disnea pero sin hipoxia habría que descartar la presencia de afectación pericárdica. En los pacientes con signos de taponamiento el tratamiento es urgente y consiste en la realización de una pericardiotomía o pericardiocentesis con drenaje[90]. Hay que tener en cuenta que el derrame pericárdico

puede ser secundario a tratamiento previos de radioterapia sobre el pericardio, por lo que no siempre hay que asumir en ese tipo de pacientes el origen maligno del derrame[91].

Síndrome de Pancoast. Ocurre cuando un tumor localizado en el ápex pulmonar invade las estructuras adyacentes. Clínicamente cursa con dolor en hombro y pared torácica superior, síndrome de Horner, plexopatía braquial y distrofia simpático-refleja. El dolor está causado por invasión de la primera y/o segunda costillas y, en ocasiones, por la invasión de la apófisis transversa del cuerpo vertebral adyacente. En algunos casos puede presentarse incluso con compresión medular. Además del control analgésico, que suele requerir opioides, el tratamiento depende de lo avanzado de la enfermedad. El uso de quimioterapia o quimiorradioterapia preoperatorias, quimiorradioterapia radical o radioterapia paliativa dependerá de la extensión del tumor en el momento del diagnóstico[92, 93].

Linfangitis carcinomatosa. La infiltración linfangítica pulmonar se caracteriza por disnea, tos e hipoxia progresivas junto con la presencia de infiltrados pulmonares. El diagnóstico es complejo y hay que descartar otras causas como la neumonitis rídica, procesos neumónicos u obstrucciones. Las pruebas de imagen y la broncoscopia con lavado o toma de biopsia pueden ser de utilidad[94]. Sin embargo, en la mayoría de los casos se inicia un tratamiento empírico con corticoides, oxígeno y antibióticos. Su presencia confiere un mal pronóstico al paciente.

10. MANIFESTACIONES EXTRATORÁNICAS DE LA ENFERMEDAD

Metástasis cerebrales. El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de metástasis cerebrales[95]. Algunos estudios sugieren que con el aumento del control local en tumores localmente avanzados y con la mejora en la supervivencia de los pacientes con enfermedad metastásica la incidencia de metástasis cerebrales está aumentando[96, 97]. La clínica es variable y depende de la localización de las mismas así como de la presencia o no de edema y/o hemorragia acompañantes. Los pacientes pueden presentar cefalea, náuseas, vómitos, focalidad neurológica, convulsiones, alteración del nivel de conciencia o alteraciones visuales. En caso de afectación leptomenígea la clínica suele cursar con

afectación de pares craneales. La resonancia magnética es la prueba diagnóstica más sensible en el diagnóstico de las metástasis cerebrales y de la afectación leptomenígea[98, 99]. El tratamiento inicial se basa en el uso de corticoides y el manejo subsiguiente depende del número, tamaño y localización de las metástasis así como de la situación de la enfermedad a nivel extracerebral[100, 101].

Metástasis óseas. El cáncer de pulmón puede afectar a casi cualquier hueso pero la localización más frecuente de metástasis óseas es el esqueleto axial y las zonas proximales de los huesos largos. El dolor óseo está presente en un 25% de los pacientes al diagnóstico de CPCNP. El PET tiene una sensibilidad similar a la gammagrafía ósea aunque es quizá menos específica[102]. La mayor parte de las veces el tratamiento sintomático incluye el uso de radioterapia y en las situaciones en las que hay riesgo de fractura de un hueso de carga se puede considerar la cirugía[103]. El uso de AINEs (antiinflamatorios no esteroideos) asociados a opioides suele ser el mejor tratamiento médico. La adición de bifosfonatos o denosumab puede disminuir el riesgo de eventos óseos[104].

Afectación hepática, suprarrenal y adenopática abdominal. Cuando las metástasis hepáticas están presentes pueden aparecer síntomas como la fatiga, pérdida de peso, dolor epigástrico y/o náuseas. Si esta afectación es de gran volumen puede provocar dolor en hipocondrio derecho. En las analíticas las pruebas de función hepática resultan normales en muchos casos. La afectación suprarrenal o adenopática abdominal suele ser asintomática y su diagnóstico es un hallazgo casual. Sólo en aquellos casos en los que es muy voluminosa puede producir dolor. La aparición de una insuficiencia suprarrenal por fallo glandular es poco frecuente y requiere de la presencia de una afectación suprarrenal muy voluminosa y bilateral.

Otros síntomas. Debido a la alta incidencia del CPCNP la afectación ocasional en otras localizaciones no es infrecuente. Esto incluye afectación a nivel de piel, partes blandas, páncreas, intestino, ovario o tiroides. Como siempre, el tratamiento suele ser sintomático y debe valorarse de forma individualizada.

Síntomas constitucionales. La clínica de depresión, fatiga, ansiedad o insomnio es muy frecuente en pacientes con CPCNP. Un inadecuado diagnóstico y tratamiento de las mismas puede afectar de forma importante a la calidad de vida de los pacientes con

CPCNP. Se debe hacer un especial ahínco en la identificación y manejo precoz de estos síntomas que afectan mucho a la calidad de vida del paciente.

11. SÍNDROMES PARANEOPLÁSICOS.

Como se ha descrito anteriormente la mayoría de los pacientes con CPCNP tienen síntomas derivados de un efecto masa del tumor primario o de las metástasis. Sin embargo, en algunas ocasiones pueden aparecer síntomas sin invasión directa del órgano o tejido alterado, los denominados síndromes paraneoplásicos[105]. La aparición del síndrome paraneoplásico puede preceder al diagnóstico de cáncer o aparecer posteriormente en el curso de la enfermedad. El origen y fisiopatología de estos síndromes no siempre es bien conocida. En la tabla 2 están recogidos algunos de los síndromes paraneoplásicos más frecuentes.

Endocrinológicos	Hematológicos	Musculoesqueléticos	Mucocutáneos
Hipercalcemia	Anemia	Osteoartropatía pulmonar hipertrófica	Acantosis nigricans
Hiponatremia	Anemia hemolítica autoinmune	Vasculitis	Callo palmar
Síndrome Cushing	Leucocitosis	Dermatomiositis	Melanosis generalizada
Ginecomastia	Eosinofilia	Polimiositis	Enfermedad Bazex
Galactorrea	Monocitosis	Miopatía	Tilosis adquirida
Hipoglicemia	Trombocitosis	Lupus eritematoso sistémico	Eritrodermia
Acromegalia	Purpura trombocitopénica idiopática	Sistémicos	Eritema anular centrífugo
Aumento calcitonina	Tromboflebitis	Fiebre	Eritema multiforme

Hiperestimulación función tiroidea	Síndrome Trousseau	Anorexia	Dermatomiositis
	Endocarditis marántica	Caquexia	Hipertricosis lanuginosa
	Coagulación intravascular diseminada		Prurito/Urticaria
Neurológicos	Renal/Metabólicos		Esclerodermia
Mielopatía necrotizante	Acidosis láctica		Dermatitis exfoliativa
Suboclusión intestinal	Hiperuricemia/Hipouricemia		Síndrome Sweet
Síndrome Eaton-Lambert	Hipertensión		Signo Leser-Trelat
Retinopatía	Síndrome nefrótico		
Neuropatía periférica	Nefropatía membranosa		
Degeneración cerebelosa			
Encefalitis límbica			
Encefalomielitis			
Síndrome Stiff-man			
Mioclonias			

Tabla 2. Síndromes paraneoplásicos asociados al cáncer de pulmón.

Caquexia. La caquexia asociada al cáncer se caracteriza por la combinación de anorexia, pérdida de peso y debilidad con repercusión sobre el estado general y la inmunidad[106]. La caquexia se define como una pérdida de peso superior al 5% del basal durante los últimos 2-6 meses. Es un síntoma muy frecuente en pacientes con CPCNP, sobre todo en aquellos con enfermedad avanzada. Su etiología y fisiopatología no es del todo bien conocida. Se considera que diversas interleuquinas, factores tumorales y circuitos

hormonales están implicados[107]. El resultado final es una reducción de la ingesta junto con una mala absorción y aprovechamiento metabólico. El síndrome de caquexia-anorexia asociadas al cáncer es de difícil manejo. El simple aumento de la ingesta calórica no es eficaz[108]. Un buen control de otros factores acompañantes como las mucositis, enteritis, el dolor y el estreñimiento acompañado de unas recomendaciones dietéticas y soportes farmacológicos parece la aproximación terapéutica más eficaz. Entre los orexígenos más utilizados están el acetato de megestrol y los corticoides[109].

Hipercalcemia. Es la endocrinopatía paraneoplásica más comúnmente asociada al cáncer de pulmón y es una de las alteraciones metabólicas más frecuentemente del cáncer en general[110]. Su incidencia en pacientes con cáncer de pulmón está en torno al 10%[111]. Puede ocurrir independientemente de la presencia de afectación ósea. Diversos mecanismos fisiopatológicos han sido involucrados como la osteolisis directa, diversas citocinas, el factor de necrosis tumoral o la liberación por el tumor de la hormona PTH-like (parathyroid hormone-related)[112, 113]. Los síntomas clínicos de la hipercalcemia dependen de la intensidad y rapidez de instauración de la misma. La presentación clínica más frecuente incluye náuseas y vómitos, fatiga, letargia, estreñimiento, poliuria y polidipsia. Estos síntomas pueden ser fácilmente atribuibles a otras circunstancias comunes en el paciente oncológico como son el uso de opioides o la progresión de la enfermedad. La hipercalcemia puede acompañarse de cambios electrocardiográficos como la prolongación del intervalo PR, QT corto con bradicardia o diversas arritmias supraventriculares o ventriculares. En caso de existir síntomas o tener unos niveles de calcio superiores a 13 mg/dL se recomienda iniciar tratamiento médico. La hidratación intensiva, el uso de diuréticos no tiazídicos, los bifosfonatos y la corticoterapia suelen conseguir una normalización de los niveles de calcemia y una resolución de los síntomas en la mayoría de los casos[114]. Sin embargo, el control último depende del correcto tratamiento del tumor pulmonar de base, que no suele ser fácil en los casos en los que aparece hipercalcemia.

VI. ESTADIAJE Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN

El tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón depende de la extensión de la enfermedad. Los estadios del CPCNP son importantes porque condicionan que se aplique un tratamiento u otro. Además, el estadio de la enfermedad es uno de los factores pronóstico más importante en el cáncer de pulmón.

Estadaje: Sistema TNM

Se denomina estadaje a la clasificación de la extensión de un tumor que permite agrupar a los pacientes con fines pronósticos o terapéuticos. El sistema TNM (tumor-nódulo-metástasis) se aplica de forma generalizada para el cáncer de pulmón desde 1972, y se ha ido revisando y ajustando desde entonces. En la actualidad, la clasificación vigente data de 2009[115]. En el sistema TNM de estadaje para el cáncer de pulmón, T indica el tamaño y lugar de asentamiento del tumor primario (describe la extensión del tumor primario), N se refiere a la afectación ganglionar de acuerdo con su localización (es decir, la ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cercanos) y M indica la presencia o ausencia de metástasis.

T	Tumor primario
Tx	Tumor primario no evaluado o tumor primario demostrado por presencia de células tumorales en esputo o lavado bronquial pero no visualizado por imagen ni broncoscopia
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	<p>Tumor menor o igual de 3 cm en su diámetro mayor, rodeado de pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión proximal al bronquio lobar</p> <p>T1a: tumor menos o igual de 2 cm</p> <p>T1b: tumor mayor de 2 cm</p>
T2	<p>Tumor mayor de 3 cm pero menor o igual de 7cm o tumor con cualquiera de las siguientes características: afecta a bronquio principal a 2cm ó más de la carina, invade pleura visceral, presenta atelectasis o pneumonitis obstructva que alcanza la zona hilar pero no afecta todo el pulmón</p> <p>T2a: tumor mayor de 3 cm pero menor o igual de 5 cm</p> <p>T2b: tumor mayor de 5 cm</p>
T3	<p>Tumor mayor de 7 cm o con alguna de las siguientes características: invasión de pared torácica, diafragma o pericardio; afectación de bronquio principal a menos de 2 cm de carina pero sin invadirla; o presenta atelectasia que afecta a todo el pulmón o nódulos tumorales en el mismo lóbulo</p>

T4	Tumor de cualquier tamaño que invade: mediastino, corazón, grandes vasos, traquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulos pulmonares en el mismo pulmón
N	Nódulos linfáticos regionales
Nx	Ganglio linfáticos regionales no evaluados
N0	Sin metástasis en los ganglios regionales
N1	Metástasis en los ganglios ipsilaterales peribronquiales o hiliares y ganglios intrapulmonares, incluida la afectación por invasión directa
N2	Metástasis en los ganglios mediastínicos ipsilaterales o subcarinales
N3	Metástasis en mediastino contralateral, hilio contralateral, escalenos ipsilaterales o contralaterales o en ganglios supraclaviculares
M	Metástasis a distancia
Mx	Afectación a distancia no evaluable
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis a distancia M1a: nódulos pulmonares en el pulmón contralateral o afectación pleural o pericárdica M1b: Metástasis a distancia

Tabla 3. Clasificación TNM en el CPCNP.

Estadios	T	N	M
Carcinoma oculto	Tx	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA	T1a-T1b	N0	M0

IB	T2a	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
	T1a-T2a	N1	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1a-T3	N2	M0
	T3-T4	N1	M0
	T4	N0	M0
IIIB	T1a-T4	N3	M0
	T4	N2	M0
IVa	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IVb	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Tabla 4. Agrupación por estadios en el CPCNP.

I. TRATAMIENTO QUIRÚRGICO.

La resección quirúrgica es la opción terapéutica con mayores tasas de curación en los pacientes con NSCLC estadios I y II[116]. En la valoración de la reseabilidad y operabilidad del paciente se requiere de una cuidada valoración radiológica, funcional y de reseabilidad en la que es fundamental la colaboración de diversos especialistas de forma multidisciplinar[117]. En algunos casos con pacientes medicamente inoperables o en una situación funcional subóptima se puede valorar la cirugía mínimamente invasiva o la radioterapia estereotáctica[118].

Los pacientes con estadios patológicos II-IIIa deben ser valorados de cara a recibir un tratamiento adyuvante con quimioterapia. Las indicaciones y consideraciones acerca de la quimioterapia perioperatoria serán discutidas más adelante en este mismo capítulo.

En cuanto al procedimiento quirúrgico, las diferentes opciones dependen en gran medida de la extensión de la enfermedad y de la reserva cardiorrespiratoria del paciente. Asimismo, es importante que la cirugía se realice por parte de equipos con experiencia. Algunos estudios sugieren que puede impactar en los resultados finales del tratamiento. La lobectomía o la pneumonectomía se consideran apropiadas cuando resultan fisiológicamente posibles[119, 120]. En algunos casos, la lobulectomía o las resecciones sublobares pueden ser suficientes en pacientes seleccionados (tumores periféricos y/o menores de 2cm)[121, 122].

- a. **Resección ganglionar.** Un correcto estudio patológico de las estaciones ganglionares torácicas tiene implicaciones terapéuticas y pronósticas. En el estudio ACOSOG Z0030 se comparó la linfadenectomía completa con el muestreo ganglionar sistemático en pacientes con CPCNP y estadios limitados (N0 y/o N1). En este estudio no se hallaron diferencias en supervivencia entre ambos procedimientos[123]. Se considera un muestreo ganglionar sistemático óptimo el que incluye un mínimo de 3 estaciones N2 según la American Thoracic Society[124].
- b. **La cirugía en el CPCNP estadio IIIAN2.** El papel de la cirugía en los pacientes con estadiaje patológico IIIAN2 es controvertido. Antes de considerar la cirugía es muy importante valorar la posible afectación ganglionar N2 mediante pruebas de imagen (TAC y/o PET) y considerar el uso de técnicas invasivas (EBUS, mediastinoscopia, toracoscopia, toracotomía) así como un abordaje multidisciplinar[125, 126]. Diversos estudios randomizados muestran que de forma global la cirugía no aumenta la supervivencia de los pacientes con estadios IIIAN2[127, 128]. Sin embargo, en uno de estos estudios se reclutaban pacientes considerados ya como irresecables en el momento de la inclusión[128]. La cirugía parece una opción terapéutica apropiada en los estadios IIIA sin afectación mediastínica N2 y en aquellos casos con afectación de una única estación ganglionar N2[129]. El uso de tratamiento neoadyuvante como

quimioterapia o quimiorradioterapia puede recomendarse en aquellos pacientes con afectación N2 candidatos a valorar una resección posterior[130]. Sin embargo, tampoco existe evidencia de que la adición de radioterapia a un régimen de quimioterapia neoadyuvante mejore las tasas de curación de los pacientes con CPCNP estadio IIIAN2[131].

II. **RADIOTERAPIA**

La radioterapia en el tratamiento de pacientes con CPCNP tiene varias indicaciones. Puede ser usada como parte de un tratamiento radical en aquellos pacientes con enfermedad localizada/localmente avanzada que no son candidatos a cirugía, pueden formar parte de un tratamiento perioperatorio y/o usarse como tratamiento paliativo en pacientes con enfermedad avanzada y sintomatología derivada de la enfermedad.

La radioterapia estereotáctica y la radioterapia con intención radical se puede recomendar en pacientes con estadios iniciales de CPCNP considerados médicamente inoperables y en aquellos que rechazan cirugía[118, 132]. Los tratamientos combinados de quimiorradioterapia con intención radical se deben considerar en aquellos pacientes con enfermedad localmente avanzada (estadios II-III) considerados médicamente inoperables[132]. En los pacientes con enfermedad avanzada (estadio IV) la radioterapia con intención paliativa puede considerarse en las localizaciones tumorales con un carácter puramente sintomático[132, 133].

La radioterapia postoperatoria en pacientes con tumores pulmonares completamente resecaos puede considerarse en aquellos casos con afectación ganglionar N2 en la pieza quirúrgica[134, 135]. Existe un metanálisis que indica que de forma global la radioterapia postoperatoria en los pacientes con tumores iniciales resecaos no aporta una mejoría en términos de supervivencia[136]. Sin embargo, en el subgrupo de pacientes con afectación ganglionar mediastínica (N2) aportaba un incremento en supervivencia. Por otro lado, en pacientes resecaos pero con afectación de márgenes se puede considerar su administración.

Varios ensayos clínicos se ha explorado en uso de radioterapia preoperatoria en pacientes con CPCNP estadio III. Aunque globalmente se considera que no aporta un mayor beneficio que el uso de quimioterapia preoperatoria sola, es valorada como una opción terapéutica más[131].

III. **QUIMIOTERAPIA PERIOPERATORIA**

En pacientes con CPCNP completamente resecao estadios IIA, IIB, IIIA y en aquellos estadios IB con tumores de gran tamaño el uso de quimioterapia postoperatoria o adyuvante ha demostrado mejorar la supervivencia.

- a. En el estudio IALT (International Adjuvant Lung Cancer trial) se reportó un aumento de la supervivencia global estadísticamente significativo con el uso de quimioterapia adyuvante basada en cisplatino en pacientes con CPCNP resecaos estadios I, II o III[137]. En el estudio se incluyeron 1867 pacientes con CPCNP resecao que fueron randomizados a quimioterapia basada en cisplatino frente a observación. Se encontró una mayor tasa de supervivencia a cinco años (45% vs 40%; HR 0.86, 95% CI, 0.76-0.98; $p \leq 0.03$) y una mayor tasa de supervivencia libre de progresión a cinco años (39% vs 34%; HR, 0.83; 95% CI, 0.74-0.94; $p \leq 0.003$) estadísticamente significativas para los pacientes que recibieron quimioterapia frente a los que realizaron controles.
- b. En el estudio NCIC CTG JBR.10 y en el estudio ANITA se valoró la eficacia de la quimioterapia adyuvante con cisplatino más vinorelbina frente a observación en pacientes con CPCNP resecao. En el estudio JBR.10, un total de 482 pacientes con CPCNP resecao estadios IB o II fueron randomizados a recibir cisplatino más vinorelbina u observación[138]. Se observó un significativo aumento en la mediana de supervivencia global (94 vs 73 meses, HR 0.69, $p=0.04$) y en la supervivencia libre de recaída (no alcanzada vs 47 meses, HR 0.6; $p < 0.001$) a favor del brazo que recibió quimioterapia adyuvante frente al de observación. La tasa de supervivencia a 5 años fue de 69% y 54%, respectivamente ($p=0.03$). Sin embargo, en una actualización de estos resultados con un seguimiento de 9 años la quimioterapia adyuvante era beneficiosa en los pacientes con estadios II pero perdía la significación estadística en el subgrupo de pacientes con estadio IB[139]. En el estudio ANITA, 840 pacientes con CPCNP resecao estadios IB, II o IIIA fueron randomizados a recibir cisplatino más vinorelbina u observación[140]. Con un seguimiento de 76 meses, la mediana de supervivencia fue significativamente

mayor en los pacientes que recibieron quimioterapia frente a los que realizaron únicamente observación (66 vs 44 meses). Esto se traducía en un aumento significativo del 8.6% en la tasa de supervivencia a 5 años en los pacientes CPCNP estadios II y IIA. No se observaba beneficio en los pacientes con estadio I.

- c. En el metanálisis LACE (Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation) que incluyó datos de 4.584 pacientes el uso de la quimioterapia adyuvante basada en cisplatino incrementaba la supervivencia global a los 5 años con un beneficio absoluto del 5.4%; este beneficio no se veía afectado por el agente usado en combinación con cisplatino[141].
- d. El estudio CALGB 9633 se valoró el uso de la quimioterapia adyuvante en pacientes con CPCNP resecao estadio IB[142]. En este estudio se incluyeron 344 pacientes que fueron randomizados a carboplatino más paclitaxel u observación. Con un seguimiento de 6 años el estudio fue negativo, no encontrando evidencia de un beneficio del uso de quimioterapia postoperatoria en pacientes con estadio IB.
- e. Quimioterapia neoadyuvante. Tras una resección pulmonar, posibles enfermedades concomitantes o una recuperación incompleta de la cirugía pueden condicionar la tolerancia a la quimioterapia adyuvante. Este problema quedó documentado en el estudio NATCH[143]. En este estudio fase 3 los pacientes con CPCNP estadio inicial se randomizaban a cirugía, quimioterapia preoperatoria con carboplatino más paclitaxel seguida de cirugía o quimioterapia postoperatoria con carboplatino más paclitaxel. Solo un 61% de los pacientes del brazo de quimioterapia postoperatoria llegaron a completar la quimioterapia prevista frente a un 90% de los pacientes que fueron randomizados a quimioterapia neoadyuvante. Sin embargo, aunque esta menor proporción de pacientes que reciben quimioterapia es numéricamente importante no se encuentran diferencias en la supervivencia global a 3 años (67.4% vs 67.7%) entre la administración de quimioterapia de forma neoadyuvante o adyuvante[144]. Con todos estos resultados se acepta que la quimioterapia postoperatoria es el tratamiento de referencia considerado

estándar[116]. Asimismo también se considera que la quimioterapia neoadyuvante es una opción con similar eficacia.

IV. **QUIMIORRADIOTERAPIA**

Una de las situaciones clínicas que mayor controversia suscita en cuanto a la terapéutica a seguir en el CPCNP se da en aquellos pacientes con estadios IIIA. Cirugía, quimioterapia y radioterapia pueden ser usadas en el tratamiento de estos pacientes[145, 146]. En los pacientes con CPCNP estadios IIIA o IIIB considerados potencialmente irreseables el tratamiento combinado con quimiorradioterapia es la opción terapéutica con mejores resultados[147, 148]. En aquellos casos con estadios IIIA potencialmente reseables no se puede descartar el uso de la cirugía como se describió anteriormente. En todos los demás casos de estadios IIIA o IIIB el uso de quimioterapia más radioterapia ha demostrado ser superior a la radioterapia sólo[148]. De forma similar, el tratamiento de quimiorradioterapia concomitantes ha demostrado ser superior a los tratamientos secuenciales[149].

V. **TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDAD AVANZADA**

De forma genérica, los pacientes con CPCNP con un buen estado general (ECOG 0-1), sin alteraciones moleculares en el gen de EGFR o ALK y sin contraindicaciones específicas se benefician de un tratamiento de quimioterapia basado en un doblete con platino[150, 151]. Los agentes incluidos en los dobletes de quimioterapia pueden ser cisplatino o carboplatino en combinación con taxanos, vinorelbina, pemetrexed o gemcitabina, por ejemplo. Con el uso de estos regímenes se alcanzan medianas de supervivencia de entre 9-12 meses[152-154]. El uso de pemetrexed está limitado a pacientes con histología no escamosa en base al estudio JMDB. En este estudio fase 3 se incluyeron 1.725 pacientes con CPCNP estadios IIIB y IV con PS 0-1[153]. Globalmente se demostró la no inferioridad del régimen de cisplatino más pemetrexed frente a cisplatino más gemcitabina. Sin embargo, en un análisis en función de la histología la combinación de cisplatino más pemetrexed fue superior en términos de supervivencia global frente a cisplatino más gemcitabina (SG 12.6 vs 10.9 meses, respectivamente) en pacientes con histología adenocarcinoma e histología carcinoma de célula grande (SG 10.4 vs 6.7 meses, respectivamente). En los pacientes con

histología escamosa los resultados eran favorables a la combinación de cisplatino más gemcitabina frente a cisplatino más pemetrexed (SG 10.8 vs 9.4 meses, respectivamente).

En los pacientes con CPCNP metastásico y estado funcional ECOG 2 el uso de quimioterapia con agente único o combinaciones de carboplatino con otro agente son opciones válidas. Dentro de los agentes con mayor nivel de evidencia se encuentran vinorelbina, gemcitabina, pemetrexed o docetaxel. Las combinaciones con carboplatino más evaluadas son con paclitaxel o pemetrexed[155, 156]. En un estudio recientemente comunicado el tratamiento con carboplatino más pemetrexed aumentaba la supervivencia global frente a pemetrexed en monoterapia en pacientes con PS 2.

En aquellos pacientes de edad avanzada el uso de monoterapia es una opción extendida. Debido a una mayor tasa de toxicidades y a la coexistencia de posibles enfermedades concomitantes el uso de dobles de quimioterapia en esta población debe ser considerado sólo tras una valoración individual del estado del paciente. Los regímenes con vinorelbina o gemcitabina en monoterapia son los que más explorados y los que de mayor evidencia clínica disponen en esta población de pacientes[157, 158]. En la actualidad, el uso de un doblete de quimioterapia en pacientes de 70-89 años con CPCNP avanzado y buen estado general también podría ser una opción estándar[159]. En un estudio fase 3 con pacientes afectados de CPCNP avanzado, buen PS y sin comorbilidades importantes el régimen de carboplatino más paclitaxel fue superior en SG a vinorelbina o gemcitabina en monoterapia. Si bien el riesgo de toxicidades secundarias era superior en el brazo del doblete basado en platino.

En los pacientes con CPCNP avanzado tras la progresión de la enfermedad a una primera línea terapéutica sólo existen aprobados dos tratamientos de quimioterapia y un TKI de EGFR. Los regímenes de docetaxel y pemetrexed, este último restringido a pacientes con histología no escamosa, tienen una tasa de respuestas cercana al 10% y consiguen un aumento de la supervivencia global (SG de 6-8 meses aproximadamente) y un mejor control sintomático con aumento de la calidad de vida de los pacientes. El único fármaco con indicación en segunda y tercera línea para el tratamiento de pacientes con CPCNP avanzado es erlotinib, un TKI de EGFR. En un estudio fase 3 frente a placebo demostró aumentar la supervivencia con una tasa de respuestas similares a las de docetaxel y pemetrexed[160]. Más adelante se discuten detenidamente las indicaciones de erlotinib en el tratamiento del CPCNP.

III. Terapias moleculares.

Los agentes no quimioterápicos en el tratamiento de los pacientes con CPCNP avanzado buscan mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes aportando un mejor perfil de toxicidad.

- a) **Bevacizumab.** Es un anticuerpo monoclonal que se une al factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). Bevacizumab impide así la acción periférica del VEGF circulante bloqueando la activación, entre otras, de la angiogénesis tumoral[161]. La formación de neovasos es un proceso fundamental para el crecimiento de los tumores ya que sin ellos los tumores no podrían crecer más de 1-2mm[162]. Se considera que ese es el límite de difusión tisular de oxígeno y nutrientes. El bloqueo de la angiogénesis intenta dificultar el crecimiento tumoral. Además la desaparición de los vasos sanguíneos aberrantes en el tumor facilitaría una mejor difusión de los agentes quimioterápicos cuando son usados en combinación con bevacizumab[163]. En el estudio ECOG 4599 se incluyeron 848 pacientes con CPCNP avanzado y PS 0-1. Los pacientes eran randomizados a recibir carboplatino más paclitaxel frente a carboplatino, paclitaxel y bevacizumab[164]. Los pacientes recibían un máximo de 6 ciclos y en el brazo en combinación con bevacizumab este se podía continuar en monoterapia hasta la progresión de la enfermedad o desarrollo de toxicidad. La mediana de supervivencia fue de 12.3 meses en el brazo asignado a quimioterapia más bevacizumab frente a 10.3 meses en el brazo de quimioterapia sólo. En otro estudio confirmatorio cuyo objetivo primario era SLP la combinación de cisplatino más gencitabina con bevacizumab fue superior a cisplatino-gencitabina sólo[165]. La adición de bevacizumab a un doblete de quimioterapia basada en platino se considera una opción terapéutica más en el tratamiento de primera línea.
- b) **Erlotinib.** Es una pequeña molécula con actividad inhibitoria de la actividad TK de EGFR. En pacientes con CPCNP avanzado tras la progresión a 1 ó 2 líneas de quimioterapia ha demostrado superioridad frente a placebo en términos de supervivencia global[160]. Está aprobado en segunda y tercera línea de tratamiento independientemente de las características moleculares del tumor. Además, erlotinib, junto con otros TKIs de EGFR como gefitinib o afatinib ha demostrado superioridad frente a quimioterapia en el tratamiento de primera línea de tratamiento en pacientes con CPCNP avanzado con mutaciones activadoras del EGFR[166-169]. Más adelante

se revisará la importancia de la selección molecular en el tratamiento de pacientes con CPCNP.

- c) **Crizotinib.** Crizotinib es una pequeña molécula con actividad TKI de ALK y MET. Ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de pacientes con CPCNP avanzado ALK positivos y por la EMEA para el tratamiento de pacientes con CPCNP ALK positivos tras la progresión a quimioterapia[16]. También se revisará más adelante con mayor detenimiento la indicación de tratamiento en base a selección molecular.

IV. Tratamiento de mantenimiento.

El concepto de terapia de mantenimiento hace referencia a tratamientos sistémicos que se pueden administrar tras los 4-6 ciclos de quimioterapia considerados estándar como tratamiento de primera línea[170]. Se distingue entre mantenimiento de continuación o mantenimiento con “Switch” en función de si los pacientes continúan con un fármaco que ya han recibido como parte de la primera línea o si inician uno diferente. La indicación del tratamiento de mantenimiento es controvertido, pues algunos pacientes se benefician de unas vacaciones en el tratamiento mientras que otros se deterioran muy rápido tras la progresión y no llegan a recibir ningún tratamiento de segunda línea[171].

- a. **Mantenimiento de continuación.** Bevacizumab se puede continuar tras 4-6 ciclos de un tratamiento de primera línea de quimioterapia basada en platino más bevacizumab en pacientes con CPCNP avanzado histología no escamosa[164]. Pemetrexed también puede continuarse en pacientes con CPCNP histología no escamosa que han realizado 4-6 ciclos de quimioterapia basada en platino. Un estudio fase 3 encontró que pemetrexed aumentaba la PFS (4.1 frente a 2.8 meses) y la SG (13.9 frente a 11 meses) frente a placebo como terapia de mantenimiento en pacientes con CPCNP avanzado histología no escamosa sin progresión tras 4 ciclos de cisplatino-pemetrexed[172].
- b. **Switch.** Dos estudios randomizados fase 3 han demostrado un beneficio en SLP y SG con el inicio de pemetrexed o erlotinib tras una primera línea de quimioterapia sin progresión[173, 174]. El tratamiento con pemetrexed se podría iniciar en pacientes con CPCNP avanzado histología no escamosa mientras que erlotinib se podría iniciar en pacientes con enfermedad estable tras una primera línea para enfermedad avanzada y cualquier histología.

VII. TERAPIAS DIRIGIDAS A DIANA EN FUNCIÓN DE SELECCIÓN MOLECULAR: LA IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN

El proceso mediante el cual una célula normal del epitelio respiratorio se transforma en una célula tumoral se denomina carcinogénesis. La carcinogénesis es un proceso con distintas etapas durante las cuales una acumulación progresiva de mutaciones en una célula normal, en este caso del epitelio respiratorio, acaban transformándola en un tumor pulmonar invasivo[175].

Se han descrito distintas alteraciones genéticas asociadas al cáncer de pulmón. Se incluyen aquí anomalías cromosómicas, activación de oncogenes, inactivación de genes supresores y/o alteraciones en los genes implicados en la reparación del DNA[176-179]. Incluso se deberían considerar diversas alteraciones epigenómicas[180, 181]. En el cáncer de pulmón el espectro de alteraciones moleculares es distinto según su tipo histológico principal: carcinoma pulmonar de célula pequeña (CPCP)[182], CPCNP adenocarcinoma[183] o CPCNP escamoso[184]. De especial relevancia en el momento actual son las mutaciones de oncogenes, pues existe la posibilidad de usar fármacos específicos que bloquean la actividad molecular resultante de dicha mutación. Dentro del CPCNP adenocarcinoma, el espectro de las alteraciones moleculares más frecuentes serían las mutaciones de KRAS, EGFR, ALK, PI3K, HER 2, BRAF y MET. Las frecuencias mutacionales en algunos de los estudios más destacados aparecen representadas a continuación:

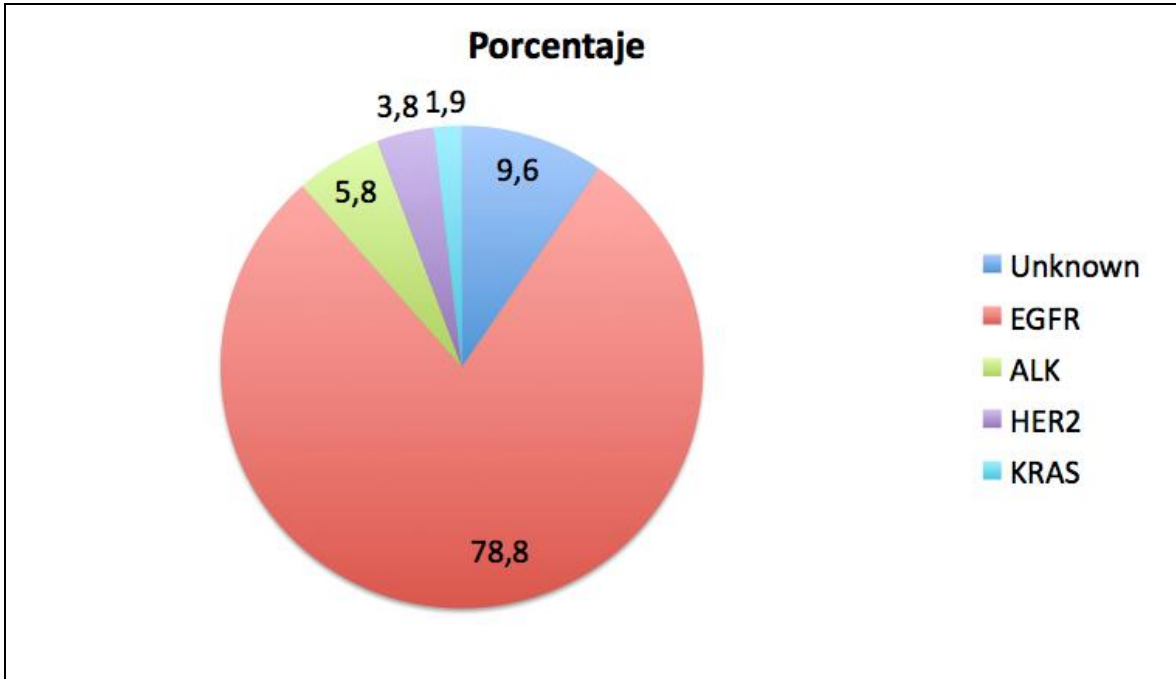


Figura 1. Mutaciones oncogénicas en 52 pacientes asiáticos nunca fumadores con adenocarcinoma de pulmón. Adaptado de Sun et al, JCO, 2010[185].

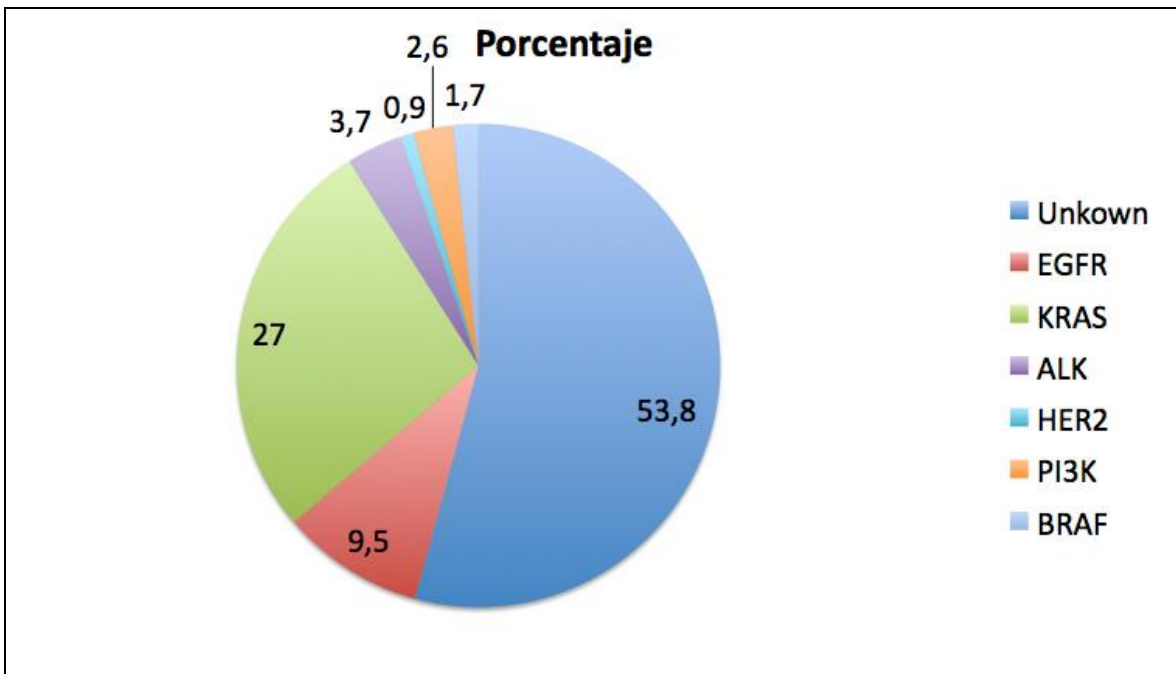


Figura 2. Mutaciones oncogénicas en 9911 pacientes con CPCNP. From Barlesi et al, ASCO 2013.

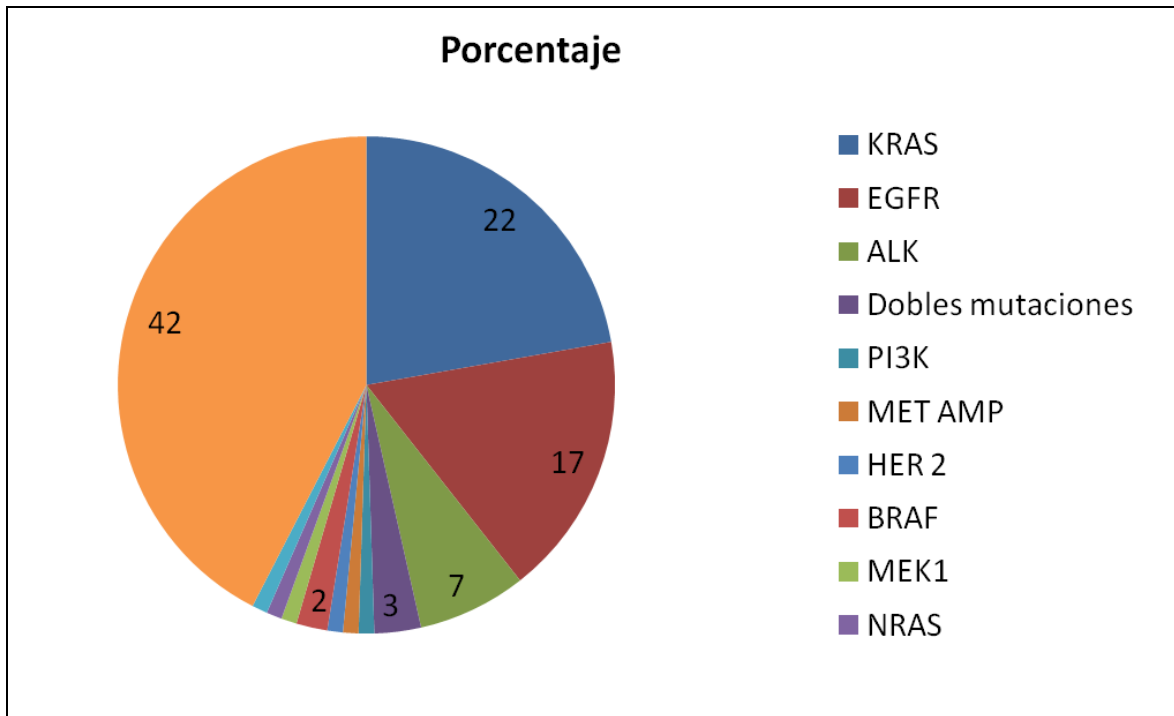


Figura 3. Mutaciones oncogénicas en 1.000 pacientes con adenocarcinoma de pulmón[2].

De acuerdo con estos y otros estudios similares, es posible encontrar una alteración molecular en el tumor de pacientes afectos de ADK de pulmón en aproximadamente el 15-20% de pacientes caucásicos[2]. Este porcentaje puede llegar a superar el 75% en poblaciones de pacientes asiáticos no fumadores poniendo así de manifiesto la importancia de esta entidad clínica: el cáncer de pulmón en el no fumador[185].

En la actualidad, identificar la presencia de esas alteraciones y usar fármacos específicos que reviertan la función celular alterada constituye el mecanismo fundamental de la denominada medicina personalizada. Uno de los conceptos principales de la medicina personalizada es que podríamos ofrecer un determinado tratamiento a pacientes cuyas características (biomarcador) se asocian a una mayor probabilidad de respuesta a ese fármaco. Así, también preservaríamos de efectos secundarios adversos a pacientes con pocas o nulas posibilidades de beneficio de ese tratamiento específico[186].

Por otro lado, parece que los tumores con determinadas alteraciones moleculares dependen principalmente para su crecimiento de la desregulación de la vía alterada. Este proceso por el que el crecimiento de un tumor es estimulado y mantenido por una alteración molecular única en una determinada vía de señalización celular se denomina dependencia

oncogénica[187]. El uso de fármacos específicos que revierten esa alteración molecular sería capaz de revertir en gran medida el crecimiento tumoral.

En CPCNP el primer ejemplo de medicina personalizada y demostración clínica del fenómeno de dependencia oncogénica lo constituye el uso de TKIs de EGFR en pacientes con mutaciones activadoras de EGFR[179, 188].

LAS MUTACIONES DE EGFR COMO NUEVO PARADIGMA EN EL TRATAMIENTO DEL CPCNP

En 2004, grupos independientes comunicaron que el análisis genético de muestras tumorales de pacientes que habían presentado excepcionales respuestas al tratamiento con TKIs de EGFR habían revelado la presencia de mutaciones en los dominios catalíticos de esa proteína[179, 189]. La presencia de estas mutaciones de EGFR hacían que el receptor fuera capaz de activarse sin unión a su ligando mediante la formación de hetero y homodímeros. Esta actividad sostenida del EGFR resultaba oncogénica y era la principal responsable del crecimiento tumoral en esos pacientes. Desde entonces, una creciente evidencia clínica ha demostrado que en el subgrupo de pacientes con CPCNP avanzado y presencia de mutaciones activadoras de EGFR el tratamiento con TKIs de EGFR es superior a la quimioterapia en tasa de respuestas y supervivencia libre de progresión[166, 168, 169]. En la actualidad los inhibidores de EGFR gefitinib, erlotinib y afatinib tienen indicación como tratamiento de primera línea en pacientes con CPCNP avanzado con mutaciones de EGFR. La supervivencia global de estos pacientes con CPCNP avanzado con mutaciones de EGFR se sitúa próxima a los 3 años, comparándose muy favorablemente con el global de pacientes con CPNCP avanzado cuya mediana de supervivencia se sitúa en torno a los 10-12 meses.

De forma genérica, en nuestro medio las mutaciones activadoras de EGFR están presentes en un 15-20% de pacientes con CPNCP[190]. Estas mutaciones son más frecuentes en pacientes con determinadas características clínicas como género femenino, raza asiática, no fumadores o histología adenocarcinoma[168]. Anteriormente ya ha sido mencionado que en poblaciones de pacientes con CPCNP con estas características clínicas la prevalencia de mutaciones de EGFR puede ser superior al 70%[185].

La identificación de la subpoblación de pacientes con CPCNP con mutaciones de EGFR pone de manifiesto que un mejor conocimiento de la biología molecular de los tumores es fundamental para el avance en los tratamientos oncológicos personalizados. Además, esta mejor caracterización tumoral permite diseñar de forma más precisa estudios clínicos dirigidos a una determinada población de pacientes, lo que facilita el rápido desarrollo de nuevas terapias. Así, el tiempo transcurrido entre el descubrimiento de la existencia de las mutaciones de EGFR en CPCNP y los resultados de un estudio fase 3 randomizado que llevó a la aprobación de gefitinib en primera línea para estos pacientes fue de sólo 5 años. Mientras que hasta entonces numerosos esfuerzos por dirigir este fármaco a poblaciones no seleccionadas habían arrojado resultados poco alentadores durante una década[191-193]. Otro de los cambios ocasionados por estos estudios basados en biomarcadores es la necesidad creciente de obtener suficiente material tumoral para que un patólogo pueda establecer un diagnóstico de malignidad y además se puedan realizar los estudios moleculares pertinentes.

LAS TRANSLOCACIONES DE ALK COMO SEGUNDA ALTERACIÓN MOLECULAR CON TRATAMIENTO DIFERENCIAL EN CPCNP

III. ALK, el descubrimiento.

En 2007, se describió la existencia de otra alteración molecular en CPCNP que cumplía criterios de dependencia oncogénica[194]. Un grupo de investigadores japoneses usando sistemas de expresión de DNA complementario (cDNA) mediante retrovirus a partir de una muestra de adenocarcinoma de pulmón descubrió una alteración genómica oncogénica no conocida. El estudio consistía en transfectar fibroblastos de ratón 3T3 con una biblioteca génica obtenida a partir de cDNA tumoral y analizar aquellas secuencias presentes en los fibroblastos transformados. De esta forma, en caso de existir alguna región del DNA tumoral que codificara para alguna proteína oncogénica se vería crecimiento transformante en las líneas celulares de fibroblastos. Mediante la secuenciación de uno de los plásmidos transformantes se identificó una secuencia génica de 3926 pares de bases que codificaba para una proteína de 1059 aminoácidos. La porción amino terminal de la proteína predicha correspondía con un fragmento de la proteína humana EML4

(echinoderm microtubule-associated protein like 4), mientras que la porción carboxiterminal es idéntica al dominio intracelular de ALK humano, sugiriendo que el cDNA presente en el tumor analizado era un producto derivado de la fusión de los genes *EML4* y *ALK*.

EML4 pertenece a la familia de echinoderm microtubule-associated protein-like proteins[195]. La estructura proteica de *EML4* está compuesta por una porción amino-terminal básica, un dominio hidrofóbico HELP (hydrophobic echinoderm microtubule associated protein-like) y un dominio de repeticiones WD. En la proteína de fusión mutante *EML4-ALK* la secuencia génica de *EML4* fusionada corresponde al dominio amino-terminal de *EML4*.

En condiciones normales, el gen *ALK* codifica para una proteína de 1619 aminoácidos que forma parte de la subfamilia de los receptores tipo insulín[196]. En la estructura proteica de *ALK* se distingue una región transmembrana hidrofóbica de 27 aminoácidos, una larga porción extracelular de gran tamaño (1014 aminoácidos) ampliamente glicosilada y un dominio intracelular con función TK.

Los genes *EML4* y *ALK* se localizan en el brazo corto del cromosoma 2 (2p21 y 2p23, respectivamente). Ambos genes están relativamente cerca con una distancia aproximada de 12 megabases entre ambos, presentando orientaciones opuestas[194]. Para tener lugar una mutación por fusión entre dos porciones de ambos genes debe producirse un cambio de orientación en ambos fragmentos génicos de fusión. Esta condición podría darse por una inversión dentro del mismo cromosoma, inv (2) (p21p23), o mediante una translocación cromosómica compleja de la misma región del brazo corto de ambos cromosomas 2.

IV. ALK, funcionalismo biológico.

En tejidos humanos la expresión del gen *ALK* parece limitada a los testes, hígado fetal y al cerebro[197]. La actividad de *ALK* es importante en el desarrollo del sistema nervioso central embrionario. Estudios preclínicos indican que también podría tener un papel en la diferenciación del músculo liso visceral. Sin embargo, su importancia en el adulto normal no es bien conocida.

ALK es una proteína transmembrana con capacidad de receptor de dependencia. Así, en ausencia de ligando es capaz de estimular la apoptosis vía activación de las caspasas[198]. Por el contrario, tras su activación, el aumento de su actividad TK promueve la supervivencia celular e inhibe la apoptosis.

VIII. LA IMPLICACIÓN DE ALK EN LA ONCOGÉNESIS DE DIVERSOS TUMORES DIFERENTES AL CPCNP.

1. Linfoma anaplásico de célula grande (LACG). Es un tipo de linfoma poco frecuente que representa el 2% del total de los linfomas. Su incidencia es más alta durante la infancia cuando supone el 25% de los linfomas en niños. Es un tipo de linfoma no Hodgkin. Immunofenotípicamente se caracteriza por ser CD3+, CD30+, EMA+ y ALK +. Aproximadamente en el 85% de los LACG se detecta la translocación t(2;5)(p23;q35) que crea el oncogén de fusión nucleospondina-ALK (NPM-ALK)[197]. NPM es una proteína nucleolar que participa en la formación del complejo prerribosomal. Este gen de fusión NPM-ALK no es el único posible conocido en este tumor. Otras translocaciones descritas son t(1;2) 17.5%, t(2;3) 2,5%, inv(2) 2.5%, t(2;17) 2%[199].
2. Neuroblastoma. El neuroblastoma es el tumor de la infancia más frecuente durante el primer año de vida. Tiene una incidencia de 10.9 casos por millón de niños y una supervivencia global superior al 50%[200]. El cambio molecular más frecuentemente descrito es la amplificación del oncogén *MYCN*. Este gen se localiza en el cromosoma 2 cerca del gen *ALK*. Otro gen descrito como causante de neuroblastoma es *PHOX2B*, un gen ligado al desarrollo de los tejidos simpáticoadrenales. *PHOX2B* está alterado en una minoría de casos de neuroblastoma hereditario (6.4%) y no suele estar implicado en los casos esporádicos. Mutaciones en *ALK* son responsables del 6-12% de casos de neuroblastoma esporádico[201]. Mutaciones y amplificaciones de ALK pueden iniciar la tumorigénesis del neuroblastoma. Estudios *in vitro* señalan que los inhibidores de la actividad TK de ALK son una herramienta terapéutica prometedora[202].

3. Tumor miofibroblástico inflamatorio. Es un tumor caracterizado por la proliferación de células con diferenciación mesenquimal a partir de miofibroblastos. Estos tumores tienen un característico infiltrado de eosinófilos, células plasmáticas y linfocitos. Su incidencia es mayor en la infancia o adultos jóvenes. Aproximadamente el 50% de los tumores presenta translocaciones que afectan al cromosoma 2 en el locus donde se localiza el gen *ALK* (2p23)[203]. Los genes con los que más frecuentemente tiene lugar la translocación son la tropomiosina 3 y la tropomiosina 4.

IX. EL CPCNP ALK POSITIVO

Estudios en líneas celulares ALK positivas demuestran la capacidad transformante, oncogénica y promotora del crecimiento tumoral de estas alteraciones[194]. A nivel funcional, la actividad de la TK en las proteínas de fusión y el crecimiento celular resultante pueden ser revertidos con el uso de inhibidores de la actividad TK de ALK[195]. Esta dependencia oncogénica de los CPCNP ALK positivos señala los inhibidores de ALK como una posible vía terapéutica de interés.

Como ya se ha sido anteriormente expuesto, la presencia de translocaciones en ALK y su implicación en el desarrollo de ciertos CPCNP fue descrita por primera vez en 2007. En la publicación original de Soda y colaboradores se usaba como método de detección la reacción en cadena de la polimerasa mediante transcriptasa reversa (RT-PCR) para determinar la presencia de alteraciones en el gen *ALK*. En una serie inicial de 33 casos hallaron la expresión de mRNA del gen de fusión *EML4-ALK* en 3 pacientes, lo que corresponde a una frecuencia del 9.1%. En el mismo trabajo estudiaron la presencia del gen de fusión *EML4-ALK* en una segunda población de 42 pacientes con CPCNP. Determinaron que 2 de los 42 pacientes eran ALK positivos. De forma conjunta la frecuencia de esta alteración en los 75 casos de CPCNP analizados era del 6.7%.

En el mismo trabajo, los autores describían lo que denominaron variantes de *EML4-ALK*. Si bien en todos los casos analizados en su estudio el gen de fusión ALK estaba translocado en la misma posición del exón 20, no ocurría lo mismo con el gen *EML4*. Se producen así distintas variantes de fusión de *EML4-ALK* en función del lugar de corte en

el gen EML4. También se han descrito fusiones de ALK con otros genes como KIF5B, TFG o KLC1[204-206], si bien son menos frecuentes. En la actualidad más de media docena de variantes de fusión han sido descritas. Sin embargo, se desconoce su implicación clínica[207].

FRECUENCIA Y CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES CON CPCNP ALK POSITIVOS

En el momento de diseñar el presente trabajo los datos publicados sobre la frecuencia y las características clínicas de los pacientes con CPCNP ALK positivo en poblaciones europeas eran limitados. El estudio original de 2007 situaba su frecuencia en un 6.7%. Sucesivos estudios clínicos, predominantemente con población asiática, situaban su prevalencia global en la población de pacientes con CPNCP entre 1-8%.

Los estudios más importantes realizados hasta el momento de diseñar el presente trabajo están representados en la siguiente tabla:

Estudio	Número de pacientes	Raza	Alk positivos Número/ Porcentaje		Método diagnóstico	Características clínicas
Soda et al, CPCNP [194]	75	Japón	5	7	RT-PCR	No mutaciones en KRAS ni EGFR
Inamura et al [208]		Japón			RT-PCR	Adenocarcinomas. No mutaciones en KRAS ni EGFR
Total	221		5	2		
AD	149		5	3		
SQ	48		0	0		
LC	3		0	0		
SCLC	21		0	0		
Takeuchi et al [209]		Japón			RT-PCR	Adenocarcinomas
Total	364		11	3		
AD	253		11	4		
ADSQ	7		0	0		

SQ	71		0	0		
LC	7		0	0		
LCNE	3		0	0		
PLEO	2		0	0		
SCLC	22		0	0		
Inamura et al [210]	11	Japón				Histología acinar, más jóvenes, no fumadores, sin mutaciones en KRAS ni EGFR
Perner et al, CPCNP [211]	603		16	3	FISH	
	507	Suiza				
	96	EEUU				
Koivunen et al, CPCNP[195]	305		8	3	RT-PCR	Adenocarcinomas. No fumadores. No mutaciones en KRAS ni BRAF. 1 doble mutación EGFR
	138	EEUU	2	1		
	167	Korea	6	4		
Shinmura et al, CPCNP [212]	77	Japón	2	3	RT-PCR	Adenocarcinoma. Ex-fumadores. No mutaciones en EGFR, KRAS ni PI3K
Martelli et al, CPCNP [213]	120	Europa	9	8	RT-PCR	No mutaciones en EGFR. 1 doble mutación en KRAS
Wong et al, CPCNP [214]	266	China	13	5	RT-PCR	Adenocarcinomas. No fumadores. Jóvenes. No mutaciones en KRAS ni EGFR
AD	200		11	5		
SQ	34		0	0		
LEL	11		0	0		
Otros	12		2	17		
Shaw et al, CPCNP [1]	141		19	13	FISH, IHC	Adenocarcinomas. No fumadores. Jóvenes. No mutaciones en KRAS ni EGFR
AD	130		18	14		
ADSQ	4		1	25		
SQ	2		0	0		
LC/NOS	5		0	0		

Tabla 5. Estudios que evalúan la frecuencia de CPCNP ALK positivo.

Sólo dos de estos trabajos incluían pacientes europeos[211, 213]. En ninguno de ellos se reportaban datos sobre las características clínicas de dichos pacientes. A continuación se analizan más detalladamente ambos estudios.

En el estudio de Martelli y colaboradores se incluyeron un total de 120 pacientes. Los pacientes habían sido diagnosticados de CPCNP y tratados mediante resección quirúrgica en 2 instituciones: Istituto Nazionale Tumori (Perugia, Italia) y el Hospital Clínic (Barcelona, España). Cada institución aportó 60 pacientes. Mediante RT-PCR se analizó la presencia de las variantes de fusión de EML4-ALK 1, 2 y 3. La frecuencia global de CPCNP ALK positivo fue del 5.8%. En una serie reducida de casos de CPCNP ALK positivo y controles ALK negativo mediante RT-PCR analizaron la utilidad de las técnicas FISH e IHC (anticuerpos ALK1, ALKc y 5A4). No hallaron positividad para ALK en ninguno de los casos con ambas técnicas en las muestras analizadas. Los autores concluían que la utilidad del FISH y la IHC como métodos diagnósticos de los pacientes con CPCNP ALK positivo era muy dudosa. Al menos, esa afirmación era cierta según los parámetros y protocolos de laboratorio establecidos hasta entonces. Aportaban las características clínicas de los pacientes individuales con CPCNP ALK positivo (Tabla 6), pero no las comparaba con el resto de la población estudiada.

Paciente	Sexo	Edad	Histología	Estadio	KRAS	EGFR	Tabaquismo	Variante EML4-ALK
1	Hombre	54	Adenocarcinoma	IIIA	Mutado	WT	SI	V1
2	Hombre	74	Escamoso	IA	WT	WT	SI	V1
3	Hombre	61	Adenoescamoso	IIB	WT	WT	SI	V1
4	Hombre	78	Adenoescamoso	II	WT	WT	SI	V1
5	Hombre	74	Escamoso	II	WT	WT	SI	V1
6	Hombre	71	Escamoso	IV	WT	WT	SI	V1
7	Hombre	68	Escamoso	I	WT	WT	SI	V1
8	Mujer	64	Adenocarcinoma	IA	WT	WT	NO	V3
9	Hombre	85	Adenocarcinoma	IB	WT	WT	SI	V3

Tabla 6. Características de los pacientes ALK positivos

El otro estudio con datos de pacientes europeos fue realizado por Perner y colaboradores. En él se analizaron muestras de CPCNP procedentes de 507 pacientes de la Universidad de

Zurich (Zurich, Suiza) y de 96 pacientes de la Universidad de Chicago (Illinois, EEUU). Mediante la técnica FISH detectaron una frecuencia de CPCNP ALK positivo del 2.7%. Mediante RT-PCR de la variante 1 de EML4-ALK sólo pudieron detectar positividad en 4 de los 10 pacientes ALK positivo mediante FISH. Tampoco este trabajo reportaba las características clínicas de los pacientes.

Diversos estudios habían analizado las características clínicas de los pacientes con CPCNP ALK positiva, aunque ninguno con una población de pacientes europea. De todos ellos, el más relevante fue el publicado por Shaw y colaboradores en 2009. En aquel momento, en su centro hospitalario (Massachusetts General Hospital Cancer Center) realizaron el estudio genómico molecular (EGFR y ALK) en los pacientes diagnosticados de CPCNP que cumplían 2 de las siguientes características: sexo femenino, histología adenocarcinoma, no fumador o raza asiática. En esa población seleccionada de pacientes encontraron un 13% de pacientes con CPCNP ALK positivo. También evidenciaron que las mutaciones en el gen EGFR y las translocaciones en ALK eran mutuamente excluyentes. Clínicamente, los pacientes con CPCNP ALK positivo tendían a ser más jóvenes, histología predominantemente adenocarcinoma (muchos con presencia de células en anillo de sello, un evento histológico de muy escasa frecuencia en la población general de pacientes con CPCNP) y con poca o nula historia de tabaquismo. También analizaron la respuesta a los tratamientos oncológicos recibidos. Así, los pacientes con CPCNP ALK positivo respondían igual que el resto a tratamientos con quimioterapia pero eran resistentes a tratamientos con inhibidores de EGFR. Este estudio, puso de relieve que una selección en base a las características clínicas de los pacientes podía aumentar las probabilidades de detectar aquellos casos de CPCNP ALK positivo. También era de destacar que aunque las características clínicas eran similares a las de los pacientes con CPCNP EGFR mutados los pacientes ALK positivo no se beneficiaban del tratamiento con inhibidores de EGFR. Por lo tanto, determinar la presencia de estas alteraciones era muy significativo a la hora de decidir el tratamiento en esa población de pacientes clínicamente seleccionada. Muchos de los hallazgos reportados en este trabajo como la ausencia de mutaciones en otros genes como EGFR o KRAS, el patrón histológico con células en anillo de sello, o el hecho de aparecer en pacientes más jóvenes que la media han sido confirmados posteriormente en otros trabajos.

TRATAMIENTO DEL CPCNP ALK POSITIVO

Los primeros datos sobre tratamientos farmacológicos con inhibidores de ALK dirigidos a en pacientes con CPCNP ALK positivo llegaron con el estudio fase 1 de crizotinib[215]. Crizotinib es un inhibidor selectivo de la actividad TK de ALK y MET (Hepaticyte growth factor receptor) de administración oral. El estudio había sido diseñado con el objetivo de valorar la seguridad de crizotinib y tenían especial interés en reclutar pacientes afectos de tumores con alteraciones en la vía de MET. Durante ese periodo se descubrieron las mutaciones de ALK en el CPCNP. Los investigadores decidieron explorar esa vía y dos pacientes con CPCNP ALK positivo fueron incluidos en la fase inicial de escalada de dosis. Debido a la gran actividad observada se decidió crear una cohorte de expansión específica en la que se incluyeron 80 pacientes con CPCNP ALK positivo. Como resultado del fase 1 se estableció el régimen de administración de crizotinib en 250 mg dos veces al día como la dosis recomendada para continuar el desarrollo del estudio. El método de selección molecular para los pacientes con CPCNP ALK positivo fue la positividad mediante FISH.

I. ESTUDIO FASE 1 DE CRIZOTINIB EN PACIENTES CON CPCNP ALK POSITIVOS

Los primeros resultados de la parte del estudio fase 1 de crizotinib centrada en los pacientes con CPCNP ALK positivo se publicaron en 2011[215]. Entre agosto de 2008 y febrero de 2010 realizaron estudio molecular mediante FISH a unos 1.500 pacientes con CPCNP. Las características de los 82 pacientes ALK positivo incluidos aparecen en la tabla 7. Los pacientes tendían a ser más jóvenes que la media de los pacientes con cáncer de pulmón y predominaba la ausencia de historia de tabaquismo o una muy baja exposición (≤ 10 paquetes/año) (Tabla 7). La histología era predominantemente adenocarcinoma y con frecuencia presentaban un patrón histológico con células en anillo de sello.

Características	Valor Total (%)
Sexo masculino	43 (52)
Edad Mediana años	51
Raza	
Blanca	46 (56)
Asiática	29 (35)

Otra	7 (9)
ECOG	
0	24 (29)
1	44 (54)
2	13 (16)
3	1 (1)
Número terapias previas	
0	5 (6)
1	27 (33)
2	15 (18)
>3	34 (41)
No reportado	1 (1)
Histología	
Adenocarcinoma	79 (96)
Escamoso	1 (1)
Otra	2 (2)
Hábito tabáquico	
Nunca	62 (76)
<10 paquetes-año	15 (18)
>10 paquetes-año	5 (6)

Tabla 7. Características clínicas de los 82 pacientes incluidos.

En cuanto a datos de eficacia la tasa global de respuestas fue del 57% (95% CI, 46-68). Si se tenía en cuenta el total de pacientes que presentaban respuesta y aquellos con enfermedad estable la tasa de control de la enfermedad a las ocho semanas era del 87%, un resultado nunca alcanzado con quimioterapia en el tratamiento del CPCNP.

En lo referente a la seguridad y el perfil de toxicidad del tratamiento con crizotinib, se podía concluir que el esquema del mismo a 250mg cada 12 horas era muy bien tolerado. Estos datos aparecen detallados en la tabla 8:

Acontecimiento adverso	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
Náusea	43 (52)	1 (1)	0	0
Diarrea	38 (46)	1 (1)	0	0
Vómitos	35 (43)	1 (1)	0	0
Alteraciones visuales	34 (41)	0	0	0

Estreñimiento	18 (22)	2 (2)	0	0
Edema distal	13 (16)	0	0	0
Mareos	12 (15)	0	0	0
Anorexia	11 (13)	0	0	0
Fatiga	8 (10)	0	0	0
Acontecimiento adverso grados 3 ó 4				
Aumento ALT			4 (5)	1 (1)
Aumento AST			5 (6)	0
Linfopenia			2 (2)	0
Hipofosfatemia			1 (1)	0
Neutropenia			1 (1)	0
Hipoxia			1 (1)	0
Neumonitis			1 (1)	0
Embolismo pulmonar			1 (1)	0

Tabla 8. Acontecimientos adversos en 82 pacientes.

Entre los efectos secundarios más frecuentes están los digestivos y los visuales. De los considerados severos los más frecuentes eran trastornos enzimáticos por toxicidad hepática. Las náuseas y las diarreas aparecían en la mitad de los pacientes tratados, si bien eran de poca intensidad (grado 1 según los Common Toxicity Criteria of Adverse Events, CTCAE). Alteraciones visuales leves se observaron en el 41% de los pacientes. Estas consistían frecuentemente en halos de luz alrededor de objetos en movimiento, siendo más intensos al acomodarse a ambientes más iluminados. Los estudios oftalmológicos no revelaron ninguna alteración orgánica. En cuanto a la toxicidad hepática, el aumento de enzimas hepáticas, alanín aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), era de grado moderado-severo (grados 3 o 4) en el 5% y 6% de los pacientes, respectivamente. Estos aumentos eran generalmente reversibles con la suspensión de crizotinib y la mayoría de los pacientes pudieron continuar tratamiento a un nivel de dosis reducida sin reincidencia.

Una actualización posterior del mismo estudio con 149 pacientes incluidos confirmaba una elevada tasa de respuestas, del 60.8% (CI 95%, 52.3-68.9), con una amplia población de pacientes en tratamiento prolongado [216]. En la Tabla 9 aparecen las características de los 149 pacientes incluidos. La mayoría de pacientes eran relativamente jóvenes (mediana de edad de 52 años), tenían poca historia de tabaquismo (71% de nunca fumadores) y una histología predominantemente adenocarcinoma (97%).

	Pacientes, n=149 (rango o %)
Edad (años)	52 (21-86)
Sexo	
Hombre	73 (49)
Mujer	76 (51)
Origen étnico	
Blanco	95 (64)
Asiático	41 (28)
Otro	13 (9)
Hábito tabáquico	
Nunca	106 (71)
Ex-fumador	42 (28)
Fumador activo	1 (1)
Histología	
Adenocarcinoma	144 (97)
Célula grande	1 (1)
Escamoso	2 (1)
Otro	2 (1)
ECOG	
0	56 (38)
1	75 (50)
2 ó >	18 (12)
Número de líneas previas	
0	24 (16)
1	47 (32)
2	31 (21)
3	19 (13)
>3	28 (19)

Tabla 9. Características basales de los pacientes incluidos.

El buen perfil de toxicidad comunicado previamente se mantenía (Tabla 10).

Acontecimiento adverso	Cualquier grado (%)	Grados 3 ó 4 (%)
Todos	144 (97%)	36 (24)
Visuales	96 (64)	0
Náusea	84 (56)	1 (<1)
Diarrea	74 (50)	0
Vómitos	58 (39)	1 (<1)

Edema periférico	44 (30)	0
Estreñimiento	41 (28)	1 (<1)
Mareos	31 (21)	0
Anorexia	24 (16)	0
Fatiga	24 (16)	2 (1)
Elevación de ALT	18 (12)	6 (4)
Rash	17 (11)	0
Disgeusia	16 (11)	0
Elevación de AST	15 (10)	5 (3)

Tabla 10. Acontecimientos adversos reportados en al menos el 10% de los 149 pacientes incluidos.

Se reportaba también información sobre el tiempo a la respuesta una vez iniciado el fármaco. Este era bastante reducido (7.9 semanas, rango 2.1-39.6) y en algunos pacientes la respuesta era objetivable tras sólo unos días de iniciado el tratamiento. Las respuestas parecían ser duraderas (49.1 semanas; CI 95%, 39.3-75.4) y aunque un estudio fase 1 no está diseñado para capturar eventos como SLP o SG, se estimó la mediana de SLP en 16.3 meses, un dato que supera incluso la mediana habitual de SG de los pacientes con CPCNP en primera línea (10-12 meses).

DESARROLLO DE CRIZOTINIB EN CPCNP ALK POSITIVO

Tras los primeros resultados de crizotinib en el tratamiento de pacientes con CPCNP ALK positivo el desarrollo del fármaco fue muy rápido. Los siguientes estudios se lanzaron de forma sucesiva y sincrónica.

Estudio fase 2. Este estudio permitía la inclusión de pacientes con CPCNP ALK positivo que no aplicaban para los estudios randomizados fase 3. El criterio de selección de pacientes fue el FISH, aunque en algún momento posterior se amplió a otras técnicas y previa discusión y autorización del espónsor de forma individual. Con un tamaño muestral de 1.100 pacientes sus objetivos principales eran la tasa de respuesta y el perfil de seguridad. La última vez que se comunicaron datos se habían reclutado 901 pacientes[217]. La tasa de respuestas era del 60%. La mediana de tiempo a la progresión fue de 8 meses (CI 95%, 7-10).

En agosto de 2011, la FDA (Federal Drug Administration) autorizó el uso de crizotinib para el tratamiento de pacientes con CPCNP avanzado ALK positivo mediante un test autorizado por la FDA. Asimismo, aprobó como test diagnóstico autorizado el Kit de FISH usado en los estudios iniciales. La aprobación se basaba en los datos de 136 pacientes incluidos en el estudio fase 1 y de 119 pacientes incluidos en el fase 2.

Fase 3 en segunda línea de tratamiento. En este estudio se incluían pacientes con CPCNP avanzado ALK positivo centralmente mediante FISH. Los pacientes debían haber progresado a un tratamiento previo con quimioterapia basada en platino. Se randomizaba 1:1 a crizotinib o quimioterapia (pemetrexed o docetaxel)[16]. El objetivo principal era la SLP. Entre febrero de 2010 y febrero de 2012, un total de 4967 pacientes fueron testados para ALK siendo 347 finalmente randomizados[16]. Un total de 99 pacientes (57%) en el brazo de quimioterapia recibieron pemetrexed, y 72 pacientes (41%) recibieron docetaxel. Ambos brazos de tratamiento estaban bien balanceados en cuanto a las características basales de los pacientes (Tabla 11).

Características	Crizotinib (n=173)	Quimioterapia (n=174)
Edad mediana (rango)	51 (22-81)	49 (24-85)
Distribución por edad		
<65 años	146 (84)	151 (87)
≥65 años	27 (16)	23 (13)
Sexo masculino	75 (43)	78 (45)
Raza (%)		
Blanca	90 (52)	91 (52)
Asiática	79 (46)	78 (45)
Otra	4 (2)	5 (3)
Hábito tabáquico		
Nunca fumador	108 (62)	111 (64)
Ex-fumador	59 (34)	54 (31)
Fumador activo	5 (3)	9 (5)
Histología		
Adenocarcinoma	164 (95)	164 (94)
No adenocarcinoma	5 (3)	7 (4)
ECOG		
0	72 (42)	65 (37)
1	84 (49)	95 (55)

2	16 (9)	14 (8)
Extensión de la enfermedad (%)		
Localmente avanzada	7 (4)	16 (9)
Metastásica	165 (95)	158 (91)
Metástasis cerebrales (%)	60 (35)	60 (34)

Tabla 11. Características basales de los pacientes.

El estudio fue positivo siendo la mediana de tiempo a la progresión de 7.7 meses (95% CI, 6.0-8.8) en el brazo de crizotinib frente a los 3.0 meses (95% CI, 2.6-4.3) alcanzados en el brazo de quimioterapia (riesgo relativo, 0.49; 95% CI, 0.37-0.64; $p < 0.001$). La tasa de respuestas también fue significativamente superior en el brazo de crizotinib frente al brazo de quimioterapia: 65% (95% CI, 58-72) versus 20% (95% CI, 14-26), respectivamente ($p < 0.001$). Sin embargo, en la mediana de SG (20.3 meses con crizotinib y de 22.8 meses con quimioterapia, RR 1.02; 95% CI, 0.68-1.54; $p = 0.54$) no había diferencias significativas. Este hecho posiblemente está condicionado porque de los 174 pacientes aleatorizados a recibir quimioterapia 112 (64%) recibieron crizotinib a la progresión.

El perfil de toxicidad fue el esperado, sin nuevos eventos adversos desconocidos. La incidencia de aumento de transaminasas \geq grado 3 alcanzaba el 16%, pudiendo reintroducirse el tratamiento en la mayoría de casos sin nuevas incidencias.

En este estudio también se realizaron evaluaciones de calidad de vida. Los pacientes presentaban una reducción significativamente superior de síntomas como alopecia, tos, disnea, fatiga, dolor torácico, dolor de brazo, dolor de hombro o en cualquier otro lugar si recibían crizotinib. Además, los pacientes tratados con crizotinib presentaban un retraso significativo en el empeoramiento de los síntomas. Globalmente, los pacientes que recibieron crizotinib presentaron una mejoría global significativamente superior a los pacientes que recibieron quimioterapia.

El estudio permitía concluir que crizotinib era superior a quimioterapia en pacientes con CPCNP ALK positivo previamente tratados en términos de tasa de respuesta, SLP y calidad de vida. Estos resultados llevaron a la aprobación en octubre de 2012 por parte de la EMEA del uso de crizotinib en pacientes con CPCNP avanzado ALK positivo previamente tratados con quimioterapia.

Fase 3 en primera línea. Se incluyeron pacientes con CPCNP avanzado ALK positivo centralmente mediante FIS. Los pacientes fueron randomizados a recibir crizotinib o un doblete de quimioterapia (platino y pemetrexed). El objetivo primario del estudio era demostrar un aumento de SLP en el brazo de crizotinib. Resultados preliminares confirmando la superioridad de crizotinib frente a quimioterapia en tasa de respuesta y SLP han sido recientemente comunicados[218]. Se espera la publicación de los resultados definitivos próximamente.

X. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LOS PACIENTES CON CPCNP ALK POSITIVO

IDENTIFICACIÓN DE LOS PACIENTES ALK POSITIVO EN LOS ESTUDIOS CON CRIZOTINIB

En los estudios de crizotinib en pacientes con CPCNP avanzado el método diagnóstico usado en la identificación de pacientes ALK positivo fue la Hibridación *in situ* con fluoresceína (FISH, del inglés Fluorescence *in situ* Hybridization).

Esta técnica diagnóstica, denominada break-part mediante FISH y disponible en el mercado (Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit®), consiste en dos sondas génicas marcadas con fluorógenos que hibridan con dos zonas distales a la zona de translocación del gen *ALK*[219]. De este modo, en un gen normal y sin alteraciones, al microscopio de fluorescencia las sondas hibridan muy próximas y se ve un color de fusión resultado de la superposición de ambos fluorógenos. En los casos de mutación por translocación, una parte del gen *ALK* se desplaza a otra región del genoma y al microscopio de fluorescencia veríamos dos señales de distinto color separadas. También existe la posibilidad de que una parte del gen *ALK* se pierda como consecuencia de la translocación y sólo se vea la sonda de un color que corresponde al dominio TK de *ALK*.

La técnica FISH puede realizarse sobre muestras tumorales fijadas con formol y conservadas en parafina. Esta técnica es capaz de detectar las translocaciones de *ALK* con cualquiera de sus partners de fusión (variantes) pues identifica las interrupciones en el locus de *ALK*, independientemente de cuál sea el gen acompañante de fusión (*EML4*, *KIF5A* u otros). Sin embargo, en ocasiones la presencia de translocación puede ser sutil si el gen con el cual se transloca está próximo al locus de *ALK*. Este es precisamente el caso de la

translación más frecuente con *EML4*, pues este gen está situado en el mismo brazo del cromosoma 2.

A pesar de que en la actualidad se considera el método diagnóstico estándar del estado mutacional de ALK en los pacientes con CPCNP el uso del FISH no está exento de problemas. El hecho de que se requiera personal altamente cualificado para la interpretación de los resultados, que sea necesario para su lectura un microscopio de fluorescencia o que no resulte económicamente asequible frente a otros métodos diagnósticos no la hace una prueba ideal como método diagnóstico o de screening en amplias poblaciones de pacientes. Éste hecho puede condicionar que no todos los pacientes con CPCNP reciban un análisis FISH sobre su muestra tumoral. En última instancia su difícil implementación puede condicionar la supervivencia, probabilidad de respuesta al tratamiento y calidad de vida de los pacientes al no poder recibir inhibidores de ALK. De estas controversias surge el interés por conseguir un método diagnóstico del status de ALK asequible, accesible y técnicamente menos exigente.

El FISH de ALK como técnica diagnóstica (Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit®) recibió la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration), a la vez que el mismo crizotinib, como único método diagnóstico validado para identificar pacientes con CPCNP ALK positivo.

OTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DEL CPCNP ALK POSITIVO

Además del FISH existen otras técnicas diagnósticas que pueden ser utilizadas para identificar la presencia de mutaciones en ALK, siendo las más relevantes la RT-PCR y la IHC.

1. RT-PCR

La RT-PCR (polimerase chain reaction- reverse transcriptase) es una técnica muy sensible capaz de detectar la presencia en una muestra biológica de una secuencia conocida de ARNm en muy pequeñas cantidades. Para detectar la presencia del gen de fusión ALK-EML4 deben ser usados cebadores complementarios de las secuencias 3' y 5' del gen de fusión. Por lo tanto, deben usarse cebadores de todos los partners conocidos y no puede

detectar el gen de fusión presente si el partner (variante) no ha sido previamente identificado e incluido en el análisis, por lo que existe la posibilidad de encontrarnos ante falsos negativos[209].

La principal ventaja de esta técnica es que no requiere de interpretaciones ya que es una variable dicotómica[220]. Sin embargo, la RT-PCR presenta varias desventajas que la hacen poco útil para ser un método de cribado ampliamente extendido. La primera de todas es que requiere de ARN de alta calidad, por lo que es muy difícilmente aplicable a muestras conservadas en parafina y restringida sólo a material tumoral congelado. La segunda, es que requiere del diseño de cebadores para todas las variantes de fusión con ALK que se quieran testar. Por todo ello se considera una técnica de elevada complejidad, técnicamente costosa y poco conveniente para el diagnóstico de amplias poblaciones de pacientes.

2. INMUNOHISTOQUÍMICA

La detección mediante IHC de la proteína ALK tiene un potencial considerable como método de screening. Biológicamente, en los CPCNP ALK positivo como resultado de la translocación del gen de *ALK* tiene lugar una expresión anómala de una porción de la proteína ALK. El hecho de que la expresión de esta proteína en los tejidos normales del adulto sea prácticamente inexistente hace que la posibilidad de detectar la presencia de esta proteína pueda usarse como método diagnóstico de las mutaciones de ALK en el CPCNP. La IHC consiste en el uso de anticuerpos específicos dirigidos a la proteína ALK con un cromógeno que los hace visibles al microscopio óptico. El uso de esta técnica presenta varias ventajas: es una técnica de bajo coste, realizable en la práctica totalidad de laboratorios de anatomía patológica, relativamente más rápida que el FISH y la RT-PCR y fácilmente incluíble en el panel diagnóstico inicial de muestras tumorales con sospecha de CPCNP[220].

XI. LA INMUNOHISTOQUÍMICA DE ALK COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO

Las principales dificultades para el uso extendido de FISH como prueba diagnóstica de los pacientes con CPCNP ALK positivo, actualmente es la única validada, son la necesidad de un microscopio de fluorescencia, un personal entrenado, las derivadas de la propia técnica de hibridación y su coste. Todo ello ha empujado el interés de la comunidad científica en la búsqueda de un método que sea más asequible técnica, humana y económicamente.

En el momento de diseñar el presente estudio, el conocimiento sobre el uso de la IHC como método diagnóstico en los pacientes con CPCNP ALK positivo era limitado. Diversos anticuerpos habían sido testados y no existía un consenso de la comunidad sobre la posible utilidad de la IHC. Algunos investigadores señalaban que podía ser un método útil para el cribado o screening de amplias poblaciones de pacientes candidatos a someterse a un test FISH diagnóstico, por su mayor sencillez y fácil implementación. Otros autores exploraban su uso como método diagnóstico único de los pacientes con CPCNP ALK positivo. No obstante todos consideraban que el FISH era la única técnica validada por su uso en los estudios pivotaes.

Técnicamente se considera que la IHC es más sencilla y fácilmente implementable que la técnica FISH. La IHC de diversas proteínas se realiza de rutina en la práctica totalidad de laboratorios de anatomía patológica del mundo. Pero la implementación de una nueva técnica no está exenta de dificultades. La optimización y puesta a punto de la IHC con un nuevo anticuerpo no deja de ser una labor extensa. Genéricamente, se pueden definir 3 pasos principales en el procesamiento de una muestra sobre la que se realiza un test de IHC. Cada uno de estos 3 pasos tiene sus particularidades y en cada uno de los pasos se pueden producir variaciones que afecten al resultado final de la prueba:

1. Preincubación: el proceso de fijación y procesamiento de las muestras biológicas sobre las que se realizará el análisis puede afectar a la preservación de las proteínas a testar. Existe evidencia con otros anticuerpos diferentes a ALK que indican que este paso es crítico e irreparable[221]. Falsos negativos pueden ser debidos a una pobre fijación del tejido. En el caso de tener que introducir una nueva prueba de IHC como el anticuerpo D5F3 en un laboratorio de rutina es que la mayor parte de este proceso ya está definido y protocolizado.

2. Incubación. Uno de los principales escollos para la IHC de ALK es que las concentraciones de la proteína en los CPCNP ALK positivo son relativamente bajas. La metodología estándar usada en el diagnóstico de tumores hematológicos resulta inadecuada en el diagnóstico de los CPCNP ALK positivo[222]. Cada anticuerpo monoclonal tiene un protocolo estricto de tiempos y procesos que deben seguirse para garantizar la precisión del test. Incluso el lote de un mismo clon de anticuerpo monoclonal de un mismo fabricante pueden afectar los resultados finales en una prueba de este tipo[223]. Veremos más adelante como se hicieron modificaciones relativas a la concentración del anticuerpo D5F3 en este paso para conseguir un mejor resultado.
3. Postincubación: Uno de los principales escollos en la estandarización de la IHC como método cuasicuantitativo, es la diferenciación de los distintos grados de intensidad de la tinción. Asimismo, los distintos patrones de tinción citoplasmático o de membrana pueden tener un distinto valor y la interpretación final de un resultado puede verse afectado por el observador. Veremos como en el caso de la IHC con D5F3 se ha desarrollado un kit (Ventana Medical Systems, INC. Tucson, AZ) que permite reducir el margen de interpretación y variabilidad entre laboratorios[18].

LOS PRINCIPALES ANTICUERPOS EN LA INMUNOHISTOQUÍMICA DE ALK.

Los tres principales anticuerpos que encontramos en la literatura son: ALK 1 (Dako), 5A4 (Novocastra) y D5F3 (Cell signalling, actualmente Ventana).

- a. **ALK 1.** El anticuerpo ALK1, por ser el normalmente usado en el diagnóstico de LACG, fue el primero en ser explorado como método diagnóstico para pacientes con CPCNP. Su aplicabilidad en pacientes con CPCNP vino dificultada porque la cantidad de proteína expresada es muy inferior en los tumores pulmonares[222]. Para tratar de salvar este obstáculo se modificaron los protocolos de hibridación, incrementado su concentración e incluso incorporando pasos con amplificadores de

señal[224]. Tres grandes series han comparado la IHC con el anticuerpo ALK1 frente al FISH en la detección de pacientes CPCNP ALK positivo:

Estudio	Nº de muestras	Dilución de ALK1	Antigen retrieval	Detección con amplificador	Score	Corte para positividad IHC	Sensitividad IHC vs FISH	Especificidad IHC vs FISH
Rodig et al, 2009[225]	358	1:2	EDTA pH 8 bajo presión	EnVision	0 vs +	>10% células +	80%	100%
Mino-Kenudson et al, 2010	153	1:2	EDTA pH 8 bajo presión	EnVision	0, 1+, 2+ ó 3+ y % de células	>10% células +	67%	97%
Yi et al, 2011[226]	101	1:100	EDTA pH 8 en PT Link	Advance	0, 1+, 2+ ó 3+	>0	90%	97%

Tabla 13. Características de la IHC con el anticuerpo ALK1.

En general, la IHC con el anticuerpo ALK1 parece menos sensible que el FISH aunque ofrece una buena especificidad. Algunas muestras en estos estudios han sido positivas para ALK mediante FISH pero negativas mediante IHC. Además, no existe consistencia en la definición de positividad y en algunos estudios como el de Yi y colaboradores el score 2+ se consideraba indeterminado y se recomendaba realizar un FISH confirmatorio. Por todo ello, aunque podría usarse es un screening poblacional como método de preselección de no resulta apto por si sólo como método diagnóstico ya que no permite prescindir del FISH.

- b. **Anticuerpo 5A4.** La IHC con la clona 5A4 también ha sido comparada frente al FISH en series amplias de pacientes. Globalmente, la sensibilidad y especificidad se situaba entre el 93-100% y el 96-100%, respectivamente. Sin embargo, en uno de los estudios se reportaron la existencia de falsos positivos y falsos negativos. Esto ha condicionado el desarrollo de los estudios posteriores y en la práctica totalidad de protocolos propuestos que

usan el MoAb 5A4 como prescreening, debiendo confirmarse los resultados positivos mediante FISH antes de considerar a un paciente ALK positivo. Por lo tanto, nos encontramos con las mismas limitaciones que con el anticuerpo ALK1, no pudiendo prescindir del método FISH.

Estudio	Nº de muestras	Dilución	Antigen retrieval	Detección	Scoring	Corte para positividad	Sensitividad IHC vs FISH	Especificidad IHC vs FISH
Jokoji et al, 2010 [227]	254	1:100	TR solution, pH alto	EnVisión	0 vs 1+	No score	100% FISH sólo se realizó a los +	100%
Paik et al, 2011 [228]	640	1:30	CC1	iVIEW	0,1+,2+ o 3+	0 o 1+: negativo 2+: dudoso 3+: positivo	100%	96%
Kim et al, 2011 [229]	465	1:30	CC1	iVIEW	0,1+,2+ o 3+	0 o 1+: negativo 2+: dudoso 3+: positivo	100% Si se incluyen los 2+	98%
McLeer-Florin et al, 2012 [230]	441	1:50	CC1	UltraVIEW	0,1+,2+ o 3+ y % células tumorales	>10% células +	95%	100%
Lopes et al, 2012 [231]	62	1:200	Microondas	Novolink	No score	>10% células +	100%	100%
Sholl et al, 2013 [232]	186	1:50	Buffer citratado (pH6) a presión	EnVision	0,1+ o 2+	1+ o 2+	93%	100%

Tabla 14. Características de la IHC con 5A4.

- c. **Anticuerpo D5F3.** Con respecto a la utilidad de la IHC con el anticuerpo D5F3 como método diagnóstico existían dos estudios principales y sólo en uno de ellos había sido comparado frente al FISH. Mino-Kenudson y colaboradores, testaron y optimizaron el uso de dos nuevos anticuerpos monoclonales, D5F3 y D9E4[222]. Primero, determinaron que ambos eran igual de sensibles y más precisos en el diagnóstico de muestras tumorales de linfomas ALK positivo que el anticuerpo ALK1. Sin embargo, se debían usar protocolos de IHC con concentraciones mayores de anticuerpo para detectar la presencia de la proteína ALK en muestras de tumores sólidos

como es el caso del CPCNP. Esto se debe a la menor cantidad de proteína expresada en los tumores no hematológicos. Tras aumentar dichas concentraciones, la intensidad de las tinciones resultaba superior, más aparente, con el anticuerpo D5F3 que con el D9E4, por lo que lo escogieron al primero para continuar el estudio (Figura 4).

Estudio	Nº de muestras	Dilución	Antigen retrieval	Detección	Scoring	Corte para positividad	Sensibilidad IHC vs FISH	Especificidad IHC vs FISH
Mino-Kenudson et al, 2010	153	1:100	EDTA pH 8 a presión	EnVision	0, 1+, 2+ o 3+ y % de células	>10% células positivas	100%	99%

Tabla 15. Características de la IHC con el anticuerpo D5F3.

Al comparar el anticuerpo D5F3 frente al FISH en una serie de casos y controles con CPCNP la sensibilidad fue del 100% y la especificidad del 99% (Tabla 15). Los autores concluían que la IHC con el nuevo anticuerpo D5F3 podría sustituir a la FISH y debería ser explorada en la práctica clínica (Tabla 16).

	D5F3	ALK1
Sensibilidad	100%	67%
Especificidad	99%	97%
VPP	96%	78%
VPN	100%	95%
índice Kappa	0,94	0,79

Tabla 16. Comparación entre la IHC con D5F3 y ALK1 en una serie de 153 adenocarcinomas de pulmón.

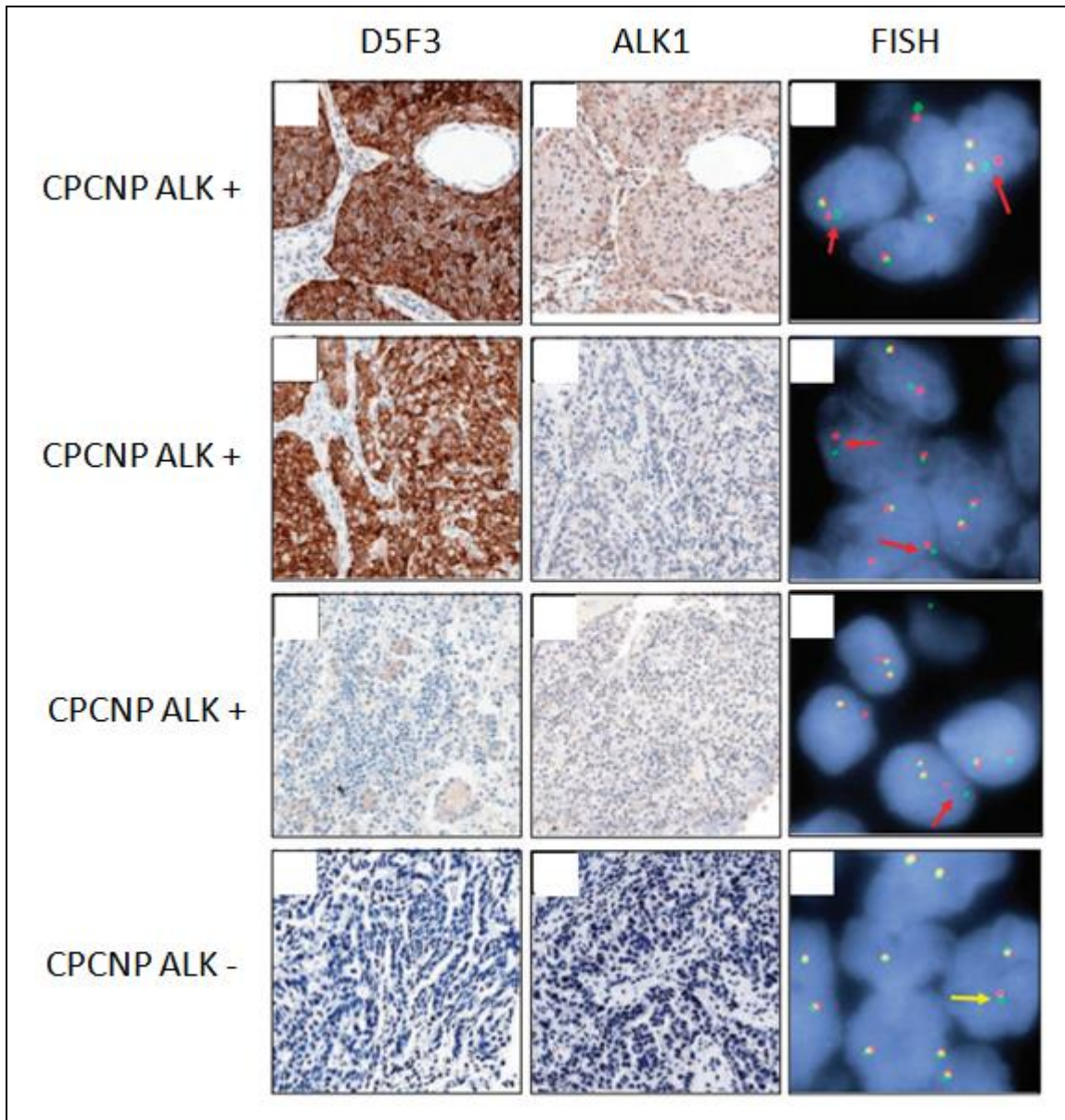


Figura 4. Cuatro casos de CPCNP analizados mediante IHC con ALK 1 y D5F3 y mediante FISH.

Los otros datos disponibles sobre la utilidad de la IHC con el anticuerpo D5F3 procedían de una serie de pacientes con CPCNP ALK positivo incluidos en el fase 1 de crizotinib[215].

depende de la biología molecular. Para conocerla es mandatorio realizar análisis moleculares en las muestras tumorales. Es por ello, que en el caso de ALK, conseguir un método diagnóstico accesible, de fácil implementación y asequible como la IHC supondría un beneficio para pacientes y médicos tratantes.

En 2011, cuando diseñamos el presente trabajo, se habían comunicado los primeros estudios en los que se describían las características de los pacientes con CPCNP ALK positivo: no fumadores, edad joven e histología adenocarcinoma. La mayoría de estas series incluían pacientes asiáticos o americanos. Es por ello que realizar un estudio similar en una población eminentemente europea permitiría refutar o no esos hallazgos. El interés radicaba en que diferencias en función de la raza se habían descrito a nivel clínico y molecular en otras poblaciones con CPCNP.

Por otro lado, nos resultaba muy interesante intentar valorar el uso de la IHC como método diagnóstico. Se escogió el anticuerpo D5F3 porque con los datos disponibles en aquel momento parecía ser el que más sensibilidad y especificidad poseía y el que aún no se había comparado de forma inicial y directa frente al FISH en muestras de pacientes.

En conclusión, nos planteábamos dos hipótesis principales a la hora de diseñar el presente trabajo:

- I. ¿Es la población europea de pacientes con CPCNP ALK positivo similar a la de sus similares asiáticos o americanos?
- II. ¿Es útil la IHC con D5F3 como método diagnóstico de los pacientes con CPCNP ALK positivo?

II. OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

1. Determinar la frecuencia de los casos de CPCNP ALK positivo en una población europea seleccionada.
2. Describir las características clínicas de los pacientes con CPCNP ALK positivo.

3. Valorar el uso de la IHC con el anticuerpo D5F3 como método diagnóstico de los pacientes con CPCNP ALK positivo.

XII. PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

I. Pacientes.

Los pacientes incluidos en el presente estudio habían recibido tratamiento o habían sido valorados en el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona (España). Se seleccionaron los pacientes con CPCNP que habían sido sometidos a análisis mutacional del estatus de EGFR entre mayo de 2006 y enero de 2010 y de los

cuales quedaba material tumoral disponible. El estudio mutacional de EGFR había sido realizado a petición del médico tratante siguiendo una indicación individualizada. Parámetros tales como género, histología y hábito tabáquico se tenían en cuenta durante ese período de tiempo a la hora de solicitar la determinación del estado mutacional de EGFR pero no existían unos criterios fijos predeterminados. Se obtuvieron datos de la historia médica sobre las características demográficas, clínicas, tratamientos recibidos y de supervivencia de los pacientes incluidos. Si había material disponible para análisis, los pacientes eran primero testados mediante FISH y a continuación mediante IHC. El estudio fue aprobado por el comité ético de la institución.

II. Muestras tumorales.

El patólogo realizaba una revisión del material tumoral disponible de aquellos pacientes a los que se les había solicitado la determinación del estatus mutacional de EGFR. Era una revisión macroscópica sobre el material tumoral archivado. Las muestras podían proceder de resecciones, biopsias o bloques celulares y estaban fijadas en formalina e incluidas en parafina. El patólogo seleccionaba como válidos aquellas muestras tumorales en los que la revisión macroscópica inicial del bloque parafinado permitía apreciar la presencia de material remanente. En caso de no evidenciarse presencia de tumor en los bloques ese paciente no era seleccionado ni incluido en el presente análisis.

Se obtuvieron laminillas de 3-4 micras de grosor sin teñir de las muestras tumorales previamente seleccionadas.

III. Análisis mutacional de EGFR.

1. **Extracción del DNA.** Las muestras tumorales son digeridas durante 48 horas con proteinasa K y 180 microlitros (μ l) de medio tampón G2 a 37°C de temperatura. El DNA se extrae mediante el kit tisular de DNA EZ1 con ayuda del sistema Biorobot EZ1. A continuación el DNA es diluido en 50 μ l siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza de DNA extraído se determina mediante espectrometría. El DNA así obtenido es conservado a una temperatura de -20°C.

2. **Amplificación mediante PCR y secuenciación directa.** La PCR es realizada en volúmenes de 30 μ l usando 50 ng de DNA muestral, 0.75 unidades de DNA polimerasa AmpliTaq Gold (Perkin-Elmer, Roche Molecular Systems; Branchburg, NJ), 3 μ l de tampón para PCR (Perkin-Elmer), 0.8 μ mol/L de cada cebador y concentraciones de MgCl₂. Los exones 19 y 21 del gen *EGFR* eran amplificados mediante PCR. Las secuencias de los cebadores fueron:

- exón 19F: TGCATCGCTGGTAACATCCA
- exón 19R: GAAAAGGTGGGCCTGAGGTT
- exón 21F: ATGCAGAGCTTCTTCCCATGA
- exón 21R: CAGGAAAATGCTGGCTGACC

El programa de PCR es realizado mediante 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 45 segundos seguido de hibridación con el primer a 58°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 30 segundos. Una extensión final se realizó a 72°C durante 10 minutos. Las bandas de PCR con los productos finales son visualizadas mediante electroforesis en gel con bromuro de etilo. Cada muestra es secuenciada por duplicado en ambas direcciones usando el Kit Bigdye Terminator 3.1 (Applied Biosystems; Foster City, CA) y un ABI Prims 3100 (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias son entonces comparadas con el GenBank de secuencias de EGFR humano (número de acceso AY588246) mediante el programa Chromas Pro Software.

3. Determinación del EGFR mediante RT-PCR.

Todos los casos se analizan usando el kit Therascreen para PCR de EGFR (Qiagen, Manchester Ltd.) siguiendo las instrucciones del fabricante para la detección de mutaciones mediante RT-PCR. Las RT-PCR se realizaron usando un ABI7500 Fast (Applied Biosystems; Foster City, CA) y los resultados fueron analizados usando el software 7500 (versión 2).

IV. Análisis mediante FISH (Fluorescence *in situ* hybridization).

Se prepararon laminillas de 3-4 μm de grosor a partir de las muestras tumorales. Se usó el kit comercial Vysis LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados eran analizados en un microscopio de fluorescencia (Nikon 501) usando el software de procesamiento de imágenes Isis Fluorescence. Un mínimo de 100 núcleos debían ser valorados para considerar el resultado como válido. La positividad para FISH se definió con la presencia de señales de translocación o señales rojas aisladas en más de un 15% de los núcleos analizados. Cada FISH era valorado por dos observadores diferentes y en caso de discordancia era revalorado de forma conjunta acordándose una lectura común.

V. Inmunohistoquímica (IHC).

Se prepararon laminillas de 3-4 μm de grosor a partir de las muestras tumorales. Las laminillas se colocaban sobre portaobjetos tratados con Poli-L-Lisina. Todas las laminas fueron teñidas con el anticuerpo anti ALK (clona D5F3, Cell Signalling Technology) en una dilución 1:50. Se usó un kit de detección Ventana Ultraview DAB en un procesador Ventana BenchMark XT (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ). La captura del antígeno se realizó mediante un proceso automatizado estándar en el Ventana BenchMarkXT a 37°C durante 16 minutos. Los resultados fueron valorados por dos patólogos y clasificados. Se consideró positiva toda tinción de cualquier intensidad presente en $\geq 10\%$ de células tumorales.

VI. Análisis estadístico.

Salvo que se especifique otra cosa, todos los análisis comparativos de marcadores moleculares o características clínicas de los pacientes se realizaron usando:

1. Prueba exacta de Fisher en los test de correlación entre variables categóricas.
2. Test *t* de Student en la exploración de la asociación entre las distribuciones de las respuestas al tratamiento.
3. Estadístico *kappa* en las comparaciones de correlación entre FISH e IHC como métodos diagnósticos de los pacientes con CPCNP ALK positivo.

Todos los valores del estadístico *p* presentados son a dos lados, salvo que se especifique otra cosa, y se consideró un test como estadísticamente significativo si la *p* tenía un valor igual o inferior a 0.05.

XIII. RESULTADOS

Entre mayo de 2006 y enero de 2010 se identificaron un total de 99 pacientes con status mutacional de EGFR previamente determinado y material tumoral disponible en el archivo local de Anatomía Patológica de nuestro centro.

En 14 de las 99 muestras tumorales no se pudo obtener material válido para realizar el análisis mediante FISH tras los procedimientos técnicos requeridos para la generación de las laminillas tumorales. Entre esos 14 casos la mayoría de ocasiones la causa se debía a la ausencia de células tumorales en el material restante archivado o al agotamiento de la muestra durante el procesamiento en el microtomo. Además, en los estudios de IHC se realizados de forma secuencial al FISH la cifra de resultados no válidos aumentó a 19 casos. En la mayoría de casos también se debía al agotamiento del material tumoral disponible.

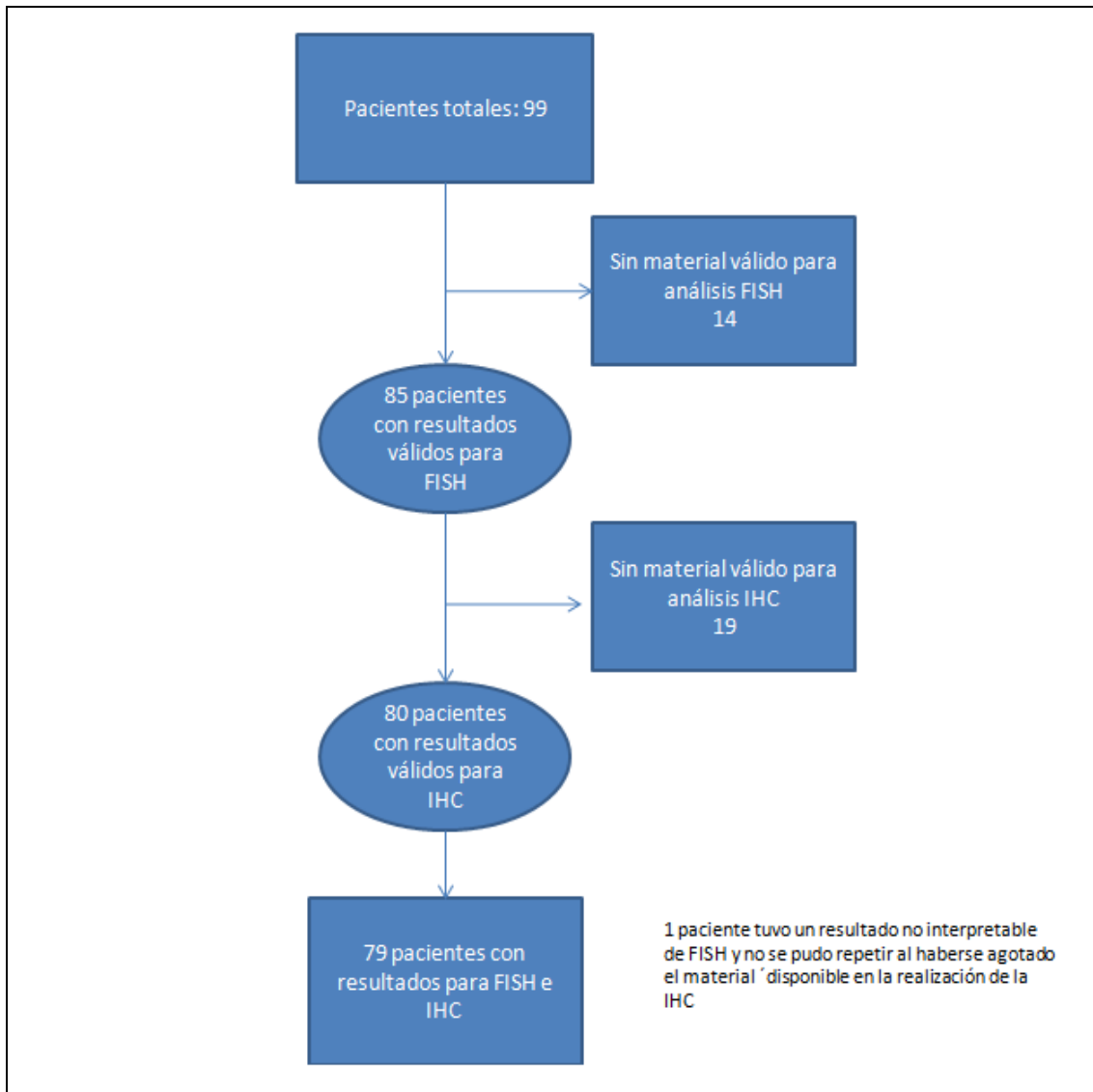


Figura 6. Diagrama de flujo de las muestras analizadas.

Las características de los 99 pacientes incluidos aparecen resumidas en la tabla 17.

Edad (rango)	61.5 (35-83)
Histología	
ADK	79 (80%)
SCC	7 (7%)
NOS	13 (13%)
Sexo femenino	48 (49%)
Raza caucásica	99 (100%)
Nunca fumador	34 (34%)

Exfumador	28 (28)
Estadio	
I	20
II	8
III	20
IV	51

Tabla 17. Características basales.

La mediana de edad de los pacientes incluidos fue de 61.5 años, la histología mayoritaria era adenocarcinoma (80%) y muchos tenían nula o escasa historia de consumo de tabaco (62%). La distribución por sexos resultó equitativa.

Al distribuir las poblaciones de pacientes en función de los resultados para el estudio mutacional de EGFR y el FISH de ALK encontramos las siguientes 4 poblaciones de pacientes (tabla 18):

	EGFR WT/ ALK - (n=65)	EGFR mut /ALK - (n=13)	EGFR WT/ ALK + (n=7)	EGFR WT/ALK UNK(n=14)
Frecuencia	65.7%	13.1%	7.1%	14.1%
Edad, mediana Años (rango)	62.3 (36-83)	63 (36-78)	56.7 (38-78)	58.8 (35-80)
Sexo				
Masculino (%)	36 (55.4)	3 (23)	3 (42.9)	9 (64.3)
Femenino (%)	29 (44.6)	10 (77)	4 (57.1)	5 (35.7)
Tabaquismo				
Nunca	16 (24.6%)	9 (69.2%)	5 (71.4%)	4 (28.6%)
Exfumador	20 (30.8%)	3 (23.1%)	0	5 (35.7%)
Fumador activo	29 (44.6%)	1 (7.7%)	2 (28.6%)	5 (35.7%)
Histología				
ADC	49 (75.4%)	13 (100%)	5 (71.4%)	12 (85.8%)
SCC	6 (9.2%)	0	0	1 (7.1%)
NOS	10 (15.4%)	0	2 (28.6%)	1 (7.1%)

Tabla 18. Características de los pacientes según el estado mutacional de EGFR y ALK.

Una mayoría de 65 pacientes (65.7%) de la muestra resultaron no mutados para EGFR (EGFR WT) y ALK negativo (ALK -). Trece pacientes (13.1%) tenían una mutación activadora de EGFR (EGFR mut) en esta cohorte de pacientes seleccionada y europea. La frecuencia de pacientes con CPCNP ALK positivo fue del 7.1%. Los 14 pacientes (14.1%)

en los que no hubo material suficiente para realizar el FISH se clasificaron como EGFR WT y ALK desconocido (ALK UNK). Es de destacar que no se encontró ningún paciente en el que coexistieran la presencia de mutaciones en EGFR y la positividad para ALK, siendo alteraciones mutuamente excluyentes.

Al comparar las características de los pacientes de los distintos grupos moleculares destaca que los pacientes con CPCNP ALK positivo tienden a ser más jóvenes que los pacientes con mutación de EGFR y los EGFR WT/ALK negativo (mediana de edad de 56, 63 y 62 años, respectivamente). Estas diferencias no alcanzaban la significación estadística. La distribución por sexos fue de 4 mujeres y 3 hombres. Una mayoría de pacientes ALK positivo eran no fumadores, cinco de los 7 pacientes (71%). Los dos pacientes restantes eran fumadores activos en el momento del diagnóstico. La totalidad de los pacientes con CPCNP ALK positivo tenían una histología de CPCNP no escamosa, con 5 de los 7 pacientes con histología adenocarcinoma y 2 pacientes con histología NOS (Not otherwise specified). En 4 de los cinco pacientes con CPCNP ALK positivo e histología adenocarcinoma la revisión histológica reveló la existencia de un patrón de crecimiento sólido y acinar (Figura 7). Además en 4 de los cinco pacientes ALK positivo también se evidenció la presencia de células en anillo de sello.

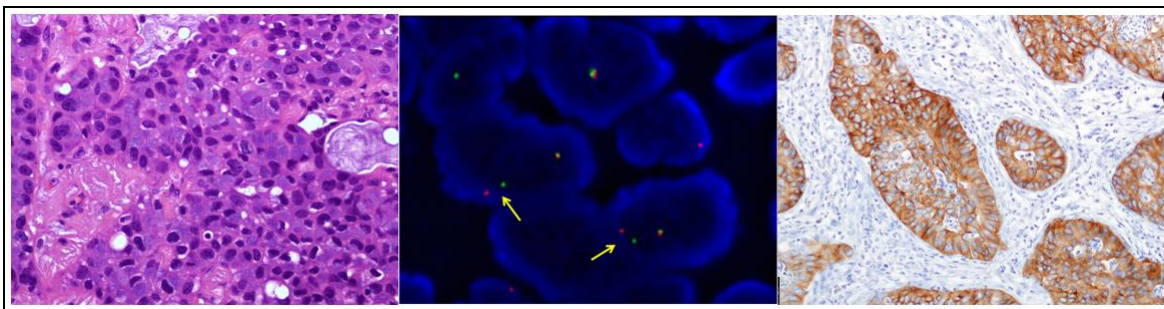


Figura 7. Adenocarcinoma pulmonar ALK positivo. En la primera imagen se evidencia un patrón de crecimiento sólido con la presencia de células en anillo de sello. En la segunda imagen se evidencia la translocación de la sonda mediante FISH. En la última se observa una tinción claramente positiva con el anticuerpo D5F3.

Los pacientes con CPCNP y mutaciones activadoras del EGFR también tenían una histología mayoritariamente adenocarcinoma (100%) y una escasa exposición al tabaco, siendo no fumadores el 71% de los pacientes. En cuanto a la distribución por sexos, entre los pacientes con mutaciones en EGFR había una significativa mayoría de mujeres (77%).

Las características del grupo de pacientes sin alteración molecular en EGFR ni ALK, incluyendo los pacientes EGFR WT/ALK negativo y los EGFR WT/ALK UNK, no difieren entre sí ni con las características basales de la cohorte global de 99 pacientes. Hay un predominio de histología adenocarcinoma, la mayoría son varones y predomina la historia pasada o actual de tabaquismo.

Se recogieron datos de las respuestas obtenidas con los tratamientos oncológicos y datos relativos a la supervivencia en los pacientes con CPCNP avanzado o con recaída. Se valoró el uso de tratamientos con quimioterapia basada en platino y/o TKI's de EGFR y también su actividad en función del status molecular de EGFR y ALK. La distribución de las respuestas viene reflejada en la tabla 19.

Tratamiento	ALK+	EGFRmut	EGFR WT/ALK-
Quimioterapia	2/7 (29%)	3/5 (60%)	6/15 (40%)
TKI	0/2	6/8 (75%)	0/7

Tabla 19. Respuesta al tratamiento (parcial + completa) a quimioterapia con un doblete de platino o a TKI según el estado molecular del tumor.

Las respuestas al tratamiento con quimioterapia de primera línea basada en platino para los pacientes ALK positivo, EGFR mutado y EGFR WT/ALK UNK fueron del 29%, 60% y 40%, respectivamente.

Al valorar la respuesta a los TKI de EGFR las respuestas fueron más variables: en los pacientes con CPCNP ALK positivo no se obtuvo ninguna respuesta, aunque el tamaño de la muestra es muy limitado con solo dos pacientes tratados. Entre los pacientes EGFR WT/ALK negativo tampoco se evidenciaron respuestas al tratamiento con TKI de EGFR. En cambio, en el grupo de pacientes con mutaciones activadoras de EGFR la tasa de respuestas al tratamiento con TKI de EGFR fue de un 75%.

En el análisis de la supervivencia se consideró a los pacientes con CPCNP avanzado o con recaída. Se incluyeron 65 pacientes y se tenía una mediana de seguimiento de 9.5 meses desde el momento del diagnóstico de enfermedad diseminada. En el momento del análisis habían muerto 57 pacientes. El análisis de SG se realizó en función del status mutacional para EGFR y ALK (Figura 8).

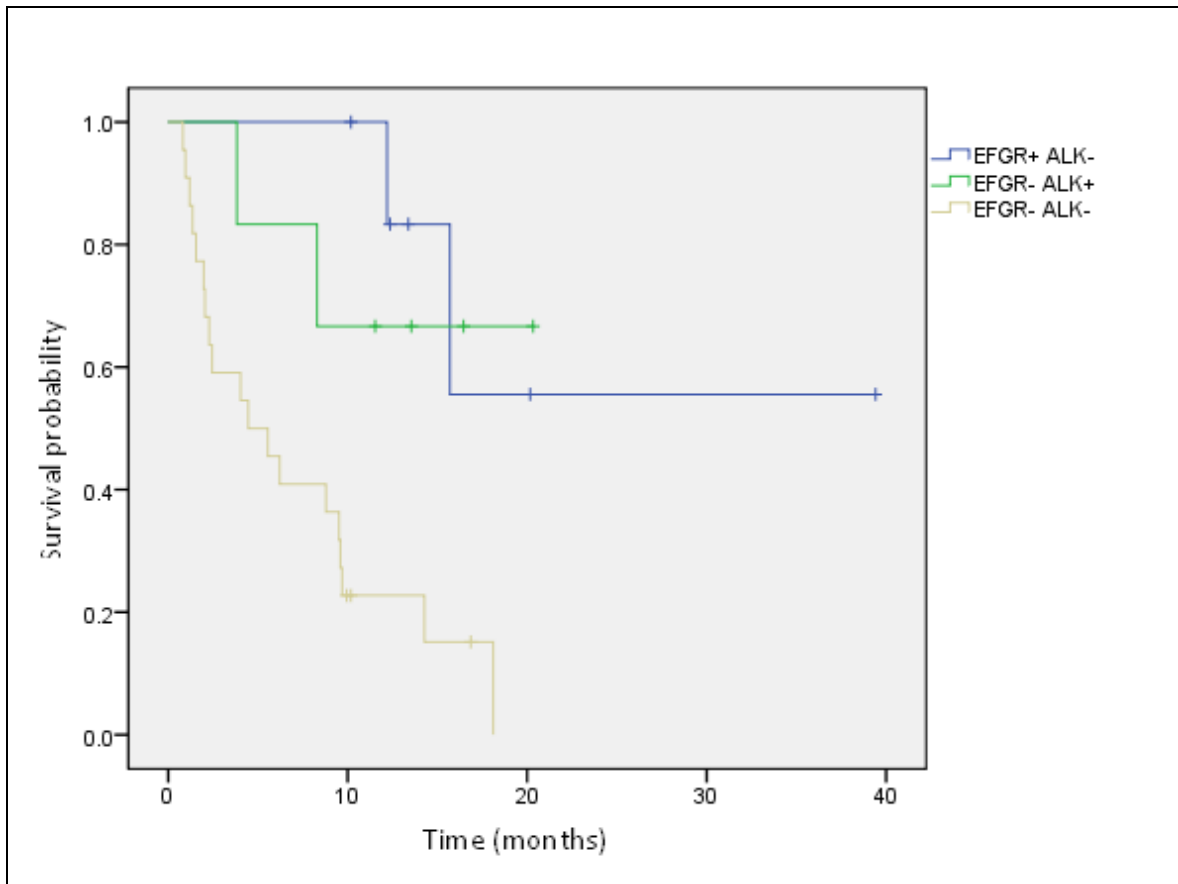


Figura 8. Supervivencia global según el estado molecular del tumor.

La mediana de SG fueron de 4.5 meses y de 15.7 meses para los pacientes EGFR WT/ALK negativo y EGFR mutado, respectivamente. Estas diferencias eran estadísticamente significativas ($p=0.018$) a favor de los pacientes EGFR mutados. En la cohorte de pacientes ALK positivo no se habían producido eventos suficientes para calcular la mediana en el momento del análisis con una mediana de seguimiento superior a los 9 meses. La tendencia en SG era superior a la de los pacientes sin alteración molecular (EGFR WT/ALK -) pero no alcanzaba la significación estadística ($p=0.103$). Dentro de este grupo de 7 pacientes con CPCNP ALK positivo avanzado 4 habían recibido tratamiento específico con crizotinib u otro inhibidor de ALK en algún momento de la evolución de su enfermedad. No se realizó el análisis de SG dentro de los pacientes ALK positivo en función de si recibieron o no tratamiento con inhibidores de ALK por tratarse de una cohorte muy pequeña. Por lo tanto, no se puede conocer si la positividad para ALK es un factor pronóstico de supervivencia y/o predictivo de respuesta a inhibidores de ALK.

Finalmente, se realizó el análisis mediante IHC de la expresión proteica de ALK con el uso del anticuerpo D5F3. Había material tumoral disponible en los 80 pacientes tras haberse realizado el análisis del FISH de ALK. La distribución del total de pacientes aparece representada en la figura 9.

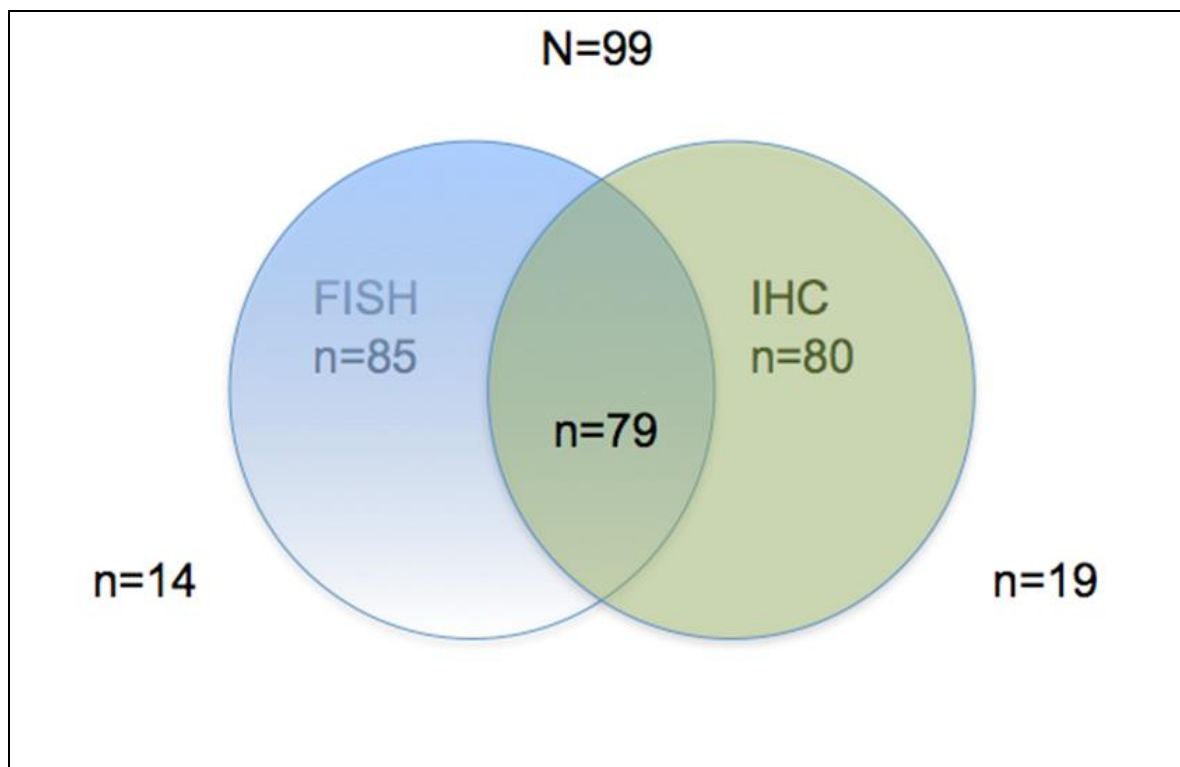


Figura 9. Diagrama del total de pacientes y su distribución de acuerdo a la realización del análisis mediante FISH e IHC.

Tras realizar la IHC en los 80 pacientes con CPCNP previamente testados para FISH uno de los análisis FISH resultó fallido y no quedaba material disponible. Por lo tanto, se disponían de análisis mediante FISH y ALK en 79 pacientes de la cohorte inicial. Todos los pacientes ALK negativo mediante FISH (n=73) resultaron ALK negativo mediante IHC. Se pudo realizar la IHC de ALK en seis pacientes de los 7 siete ALK positivo mediante FISH. En cinco de ellos la IHC de ALK fue también positiva. Sin embargo, en uno de los pacientes FISH positivo la IHC resultó negativa.

	IHC			
FISH		+	-	
	+	5	1	
	-	0	73	
				79

Tabla 20. Distribución de los pacientes según el estado de ALK mediante FISH y mediante la IHC con el anticuerpo D5F3.

De forma conjunta, estos resultados del FISH y la IHC arrojan un valor predictivo positivo para la IHC con D5F3 del 100% y una concordancia alta (kappa 0.783, rango 0.642-0.924). La sensibilidad y especificidad de la IHC con D5F3 fueron del 83.3% y 100%, respectivamente.

XIII. DISCUSIÓN

El CPCNP en no fumadores representa una entidad clínica con características propias dentro del cáncer de pulmón. Estos tumores presentan una biología molecular con elevada prevalencia de mutaciones oncogénicas (EGFR, ALK, MET, Her2, PI3K o MET). Recientemente, el desarrollo de nuevas terapias dirigidas a bloquear dichas alteraciones ha supuesto un cambio de paradigma en el abordaje diagnóstico y terapéutico del CPCNP.

Las mutaciones de ALK han suscitado un gran interés por parte de la comunidad médica. En la actualidad, el CPCNP ALK positivo representa una entidad propia y existen tratamientos con TKI de ALK aprobados para esta población de pacientes. Fue en 2007 cuando se identificó que las translocaciones de ALK estaban presentes en algunos pacientes con CPCNP y desde entonces diversos estudios previos situaban su frecuencia entre el 1% y el 7% del total[233, 234]. Estos estudios, incluían predominantemente pacientes asiáticos y tratados con cirugía. En uno de los trabajos más relevantes sólo se incluían pacientes seleccionados por determinadas características clínicas (no fumadores, sexo femenino, histología adenocarcinoma, raza asiática) siendo la prevalencia de CPCNP ALK positivo de hasta el 13%[1].

En nuestro trabajo la prevalencia de pacientes con CPCNP ALK positivo en una población seleccionada europea es del 7.1%. Todas las características clínicas que encontramos en nuestra población europea de pacientes con CPCNP ALK positivo (frecuencia, edad, histología, hábito tabáquico o respuestas a tratamiento) nos permiten concluir que no parecen existir diferencias con respecto a lo reportado en estudios con poblaciones mayoritariamente asiáticas. Otros estudios realizados desde entonces con poblaciones europeas también han reportado resultados de frecuencias de tumores pulmonares ALK positivos en rangos similares, con pequeñas diferencias que pueden ser atribuibles a diferencias en las características basales de las distintas poblaciones estudiadas. Así, en el estudio Lungscape del grupo europeo ETOP (European Thoracic Oncology Project) la frecuencia de tumores ALK positivo en una cohorte de 1099 pacientes con CPCNP resecado de 11 países europeos fue del 2.1%[235]. Esta menor tasa puede deberse a la ausencia de preselección en función de características clínicas. Es de suponer que el prerrequisito de haber realizado el estudio de la mutación de EGFR en nuestra sería afecte a la tasa de pacientes mujeres, no fumadores y adenocarcinomas. Así, la frecuencia de no fumadores y mujeres en esta cohorte paneuropea era del 14.6% y el 44%, respectivamente,

mientras que en nuestra serie los no fumadores y las mujeres representan el 34% y el 49% del total, respectivamente. En otro estudio realizado en dos centros franceses, Cabillic y colaboradores reportan una incidencia del 3.6% de un total de 3244 pacientes con diagnóstico consecutivo de CPCNP. Globalmente, teniendo en cuenta que la población de nuestro estudio había sido previamente seleccionada localmente para determinar la presencia de mutaciones de EGFR, la tasa de positividad para ALK se sitúa dentro del rango de lo esperado. Además, como control adicional de la representatividad de nuestra población vemos que la tasa de mutaciones de EGFR (13.1%) es similar a la reportada en pacientes españoles con CPCNP (16.6%) en otros estudios[190].

El análisis comparativo por perfiles moleculares dentro de nuestra cohorte de 99 pacientes mostró que las alteraciones genómicas en EGFR y ALK eran mutuamente excluyentes. Hay una amplia evidencia en la literatura sobre este aspecto aunque existen algunos casos excepcionales en los que ambas mutaciones coinciden en un mismo paciente[236]. Siguiendo este razonamiento, la prevalencia de pacientes ALK positivo entre aquellos que previamente habían sido etiquetados como EGFR WT la tasa de positividad sube al 10.8%. Esto se traduce clínicamente en que uno de cada diez pacientes con CPCNP previamente seleccionado por perfil clínico y EGFR WT tienen una diana terapéutica eficaz si son adecuadamente diagnosticados.

En cuanto a las características clínicas de los pacientes con CPCNP según su perfil molecular, en nuestro estudio los pacientes ALK positivo tienden a ser más jóvenes al diagnóstico, predominantemente adenocarcinomas y con poca historia de tabaquismo que el resto de subpoblaciones (EGFR mut y EGFR WT/Unk), aunque no alcanzaban la significación estadística.

Uno de los principales cambios de la individualización del tratamiento en la era de las terapias moleculares es que la selección de los pacientes en base a sus características clínicas resulta insuficiente. Las características moleculares de cada tumor son las que condicionan su crecimiento y respuesta a los tratamientos por lo que su identificación es fundamental para tomar decisiones terapéuticas. Así, los pacientes con mutaciones de EGFR y aquellos ALK positivo comparten unas mismas características clínicas pero sus opciones de respuesta a fármacos dirigidos son distintas. Por el contrario, las respuestas a la quimioterapia no parecen estar condicionadas por el status mutacional. En nuestra serie de pacientes todos presentaban respuestas a quimioterápicos con tasas del 29-60%, sin ser

las diferencias significativas. Por el contrario, los pacientes con mutaciones de EGFR presentaban tasas de respuesta del 75% a TKI de EGFR mientras que entre los subgrupos de pacientes sin alteraciones en EGFR (aquellos con CPCNP ALK positivo y aquellos EGFR WT/ALK -) no hubo ninguna respuesta a los TKI de EGFR, si bien los recibieron con poca frecuencia (sólo 2 pacientes ALK positivo y 7 EGFR WT/ALK- tratados). Estos hallazgos son concordantes con los reportados por otros autores [1] y que han supuesto la base científica para no ofrecer erlotinib a los pacientes con CPCNP ALK positivo en los brazos control de los estudios randomizados[60]. En todo caso, estos datos subrayan el hecho de que los perfiles moleculares son el mejor predictor de respuesta a los distintos tratamientos y han superado a la selección por características clínicas.

El primer estudio en CPCNP que demostró la superioridad de los marcadores moleculares frente a las características clínicas en la selección del tratamiento en pacientes con CPCNP fue el estudio IPASS[168]. En este estudio se incluyeron 1217 pacientes con CPCNP avanzado que no habían recibido tratamiento previo y cumplían las siguientes características: histología adenocarcinoma y no fumadores/exfumadores (abandono del tabaquismo hace más de 15 años y con exposición inferior a los 10 paquetes-año). Los pacientes eran randomizados a recibir gefitinib o quimioterapia basada en carboplatino-paclitaxel. El objetivo primario del estudio era SLP y cumplió el objetivo primario de no inferioridad de gefitinib frente a quimioterapia (5.7 meses vs 5.8 meses, respectivamente). Lo más interesante es que en el subestudio de biomarcadores se pudo analizar la presencia de mutaciones de EGFR en un 35.9% de los pacientes. Del total de 437 pacientes 261 (59.7%) resultaron positivos para la presencia de mutaciones en EGFR. Entre los pacientes con mutaciones en EGFR la SLP era significativamente superior con gefitinib frente a quimioterapia (HR 0.48; 95% CI, 0.36-0.64; $p \leq 0.001$) mientras que en los pacientes con EGFR WT la SLP era significativamente superior con quimioterapia frente a gefitinib (HR 2.85; 95% CI, 2.05-3.98; $p \leq 0.001$). Los resultados de este estudio permitieron la aprobación de gefitinib en primera línea de tratamiento para los pacientes con CPCNP avanzado con mutaciones activadoras de EGFR. Diversos estudios posteriores con gefitinib, erlotinib y afatinib han venido a dar mayor robustez a estos hallazgos.

Desde entonces, la importancia de la selección molecular en CPCNP ha significado que en todo el desarrollo de crizotinib se seleccionase únicamente a los pacientes ALK positivo mediante FISH. Así, la biología molecular ha sustituido a los criterios clínicos en la

selección del tratamiento de primera línea en pacientes con CPCNP avanzado. No obstante, una selección de pacientes en base a sus características histológicas, demográficas o historia de tabaquismo permite aumentar la proporción de pacientes en los que encontrará una alteración molecular. Sin embargo, no cumplir esas características no debe ser un factor para no realizar dichos estudios moleculares en un paciente, pues se han descrito mutaciones de EGFR o ALK en pacientes con diferentes histologías o elevada historia de tabaquismo. Por ejemplo, en nuestro trabajo dos pacientes tenían una histología NOS y otros dos eran fumadores activos.

En el momento actual, crizotinib tiene la aprobación condicional de la EMEA desde octubre de 2012 para pacientes con CPCNP avanzado ALK positivo previamente tratados con quimioterapia. Esa decisión fue tomada en base al análisis de los estudios fase 1 y fase 2 que demostraban la seguridad y actividad de crizotinib en pacientes previamente tratados. Posteriormente, los datos de los estudios PROFILE 1007 y PROFILE 1014 [16, 218] han demostrado la superioridad de crizotinib frente a quimioterapia en los pacientes con CPCNP ALK positivo. Con estos resultados a los pacientes con CPCNP avanzado se les debería ofrecer la realización de las determinaciones de EGFR y ALK dentro de la práctica clínica habitual.

En esta primera parte del estudio lo más destacable es que en nuestra serie de pacientes con CPCNP avanzado y mayoritariamente no fumadores se encuentra una alteración molecular que condiciona el tratamiento de estos pacientes en un 20% de los casos (13% mutaciones de EGFR y 7% ALK positivos). Se confirma también en el momento de realizar el estudio que los pacientes con CPCNP ALK positivo europeos parecen tener una incidencia similar a las comunicadas en poblaciones asiáticas y unas características clínicas que no diferían de lo descrito previamente. Clínicamente, saber que en uno de cada cinco pacientes no fumadores con CPCNP avanzado está presente una alteración molecular que condiciona su beneficio a distintos tratamientos es un dato de gran importancia. En la actualidad existe una clara evidencia a favor de los TKI de EGFR o ALK en primera línea de tratamiento frente a quimioterapia en los pacientes portadores de mutaciones de EGFR o ALK positivo. Es por ello que se recomienda realizar todos los esfuerzos posibles dirigidos a la obtención de material tumoral que permita estos estudios que serán determinantes para el tratamiento actual del cáncer de pulmón. La obtención de material tumoral suficiente siempre ha sido un reto en el CPCNP. Siguiendo esta lógica, y aunque las técnicas diagnósticas se encaminan hacia una mayor sensibilidad a partir de cada vez

menores cantidades de tejido, parece que las citologías deben ser considerados insuficientes en pacientes con cáncer de pulmón avanzado. Esta afirmación es cierta en aquellos pacientes con histología adenocarcinomas o no fumadores, existiendo consenso a este respecto.

En la segunda parte de nuestro estudio, el uso de la IHC con el anticuerpo D5F3 resultó fácil de implementar y su lectura no dio lugar a casos discrepantes. Con una sensibilidad del 83% y una especificidad del 100% resulta especialmente interesante su valor como posible prueba diagnóstica. Así, un resultado positivo mediante IHC con D5F3 podría ser suficiente para indicar un tratamiento con crizotinib u otros fármacos dirigidos a los pacientes con CPCNP ALK negativos.

Otros estudios han valorado la utilidad de la IHC con D5F3 como método diagnóstico en el CPCNP frente al FISH con resultados equiparables. En los estudios de Minca et al y Wynes et al la sensibilidad fue de 94% y 91%, respectivamente. En los mismos estudios la especificidad fue del 100% y 96%, respectivamente. (Tabla 21)

Estudio	Nº muestras	Sistema lectura	Score	IHC positivo	Sensibilidad IHC	Especificidad IHC
[237]	231	Optiview	0 vs +	Positivo	94%	100%
[18]	98	Optiview	0 vs +	Cualquier tinción	91%	96%

Tabla 21. Estudios comparando la IHC con D5F3 y el FISH.

Además, el procedimiento de preparación y lectura de las muestras mediante la IHC con D5F3 ha sido automatizado mediante un Kit (Ventana Medical Systems, INC. Tucson, AZ) con lo que se reduce el margen de interpretación y variabilidad entre laboratorios[18]. Una de las principales diferencias de este kit es que se añade un paso extra de amplificación de la señal en el procesamiento de la muestra. Esta amplificación de señal logra aumentar la

visualización y mejora la lectura en casos con expresiones débiles de la proteína ALK. De forma global, la mejora y sistematización de la determinación mediante IHC con D5F3 permitiría la implementación de la IHC en la práctica habitual de la mayoría de centros. Esto haría posible que la gran población de pacientes con CPCNP fuera estudiada para las mutaciones en ALK. Sin duda, finalmente repercutiría en que la mayoría de pacientes con CPCNP ALK positivo fueran tratados de la mejor forma posible.

Presente y futuro de la IHC con D5F3

La valoración conjunta de los resultados de nuestro trabajo así como los datos obtenidos en otros estudios sobre la utilidad de la IHC con D5F3 (Minca et al, Wynes et al, análisis retrospectivo de las muestras del estudio fase 1 de crizotinib) permiten establecer la hipótesis de que la IHC con el anticuerpo D5F3 es una técnica suficientemente precisa para el diagnóstico y selección de pacientes con CPCNP ALK positivo candidatos a recibir tratamiento con inhibidores de ALK. El siguiente paso en su validación sería considerarlo un criterio de inclusión para un estudio con inhibidores de ALK. Esta hipótesis está siendo valorada y busca ser validada en los estudios en curso fase 2 y 3 con ceritinib, un nuevo inhibidor de ALK, cuyo reclutamiento está en marcha. En estos estudios el criterio único de inclusión es la positividad por IHC con dicho anticuerpo. Si los resultados de estos estudios fueran positivos permitirían la aprobación de la IHC con D5F3 como método diagnóstico para seleccionar pacientes candidatos a ser tratados con inhibidores de ALK.

Presente y futuro del tratamiento de los pacientes con CPCNP ALK positivo

A pesar de la alta tasa de respuestas y la prolongación de la SLP observada en los pacientes con CPCNP avanzado ALK positivo que reciben tratamiento con crizotinib la progresión de la enfermedad finalmente ocurre. Entender los mecanismos por los cuales se produce esa resistencia adquirida o secundaria facilitará el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en estos pacientes.

En general, la resistencia adquirida en tumores con dependencia oncogénica se puede producir de dos formas principales. La primera consiste en la aparición de alteraciones en la diana terapéutica (mutaciones secundarias o amplificación génica) que hacen que el inhibidor deje de bloquear la vía. Una segunda forma de resistencia es mediante la activación de vías de señalización alternativas, también denominadas bypass. En este caso,

en presencia del fármaco inhibidor la diana está inactiva pero el resto de la vía de señalización se mantiene activada a través de vías alternativas.

Los dos estudios más importantes publicados hasta el momento sobre la resistencia a crizotinib en los pacientes con CPCNP ALK positivo provienen de dos centros: Massachusetts General Hospital (18 pacientes) y la Universidad de Colorado (11 pacientes)[238, 239]. En la figura 10 se pueden observar los principales resultados obtenidos en dichos trabajos.

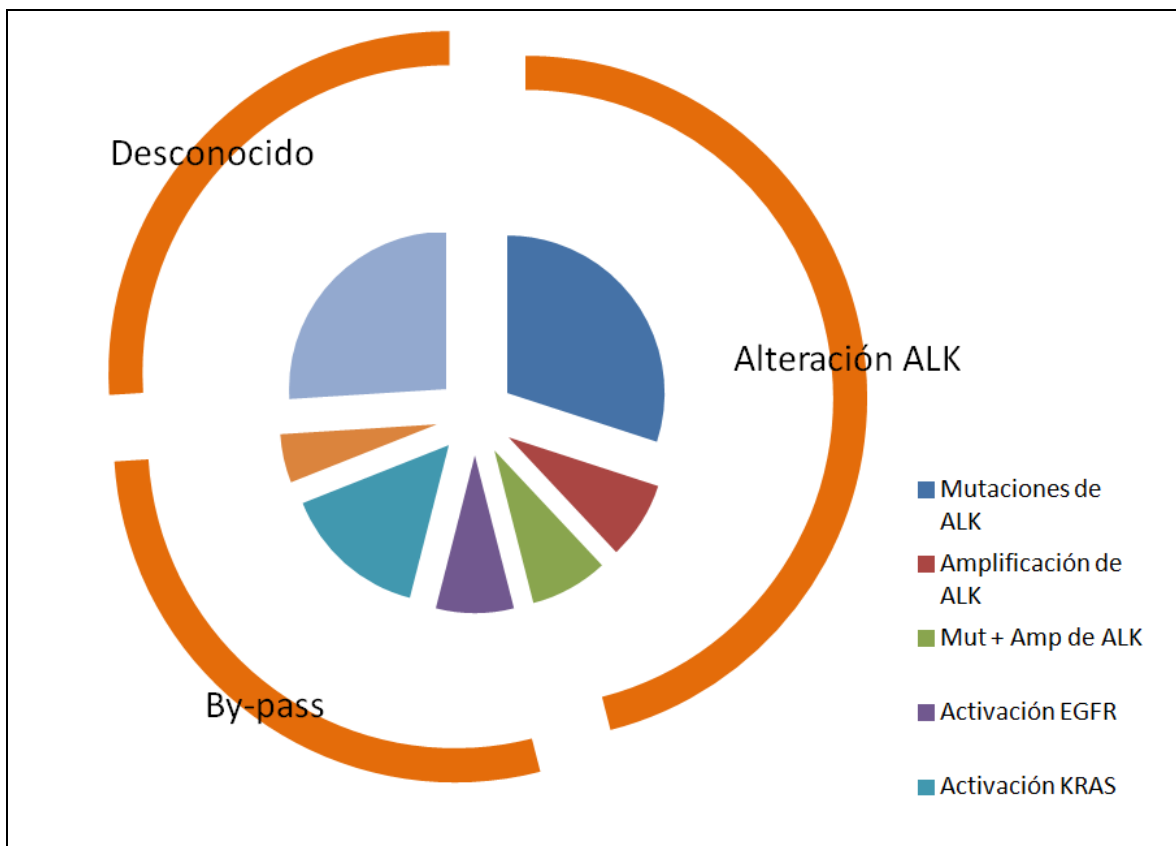


Figura 10. Resumen de los mecanismos de resistencia a crizotinib en CPCNP ALK positivo.

En un tercio de los pacientes analizados con CPCNP ALK positivo en progresión a crizotinib se evidenciaban segundas mutaciones de resistencia en el dominio quinasa de

ALK. Hasta la fecha, se han descrito varias mutaciones en el dominio TK de ALK que pueden conferir distinta sensibilidad a inhibidores de ALK[240]. La posible aplicación práctica en la era de la medicina individualizada sería que la secuencia con los nuevos fármacos actualmente en desarrollo dependería de cada mutación de resistencia presente en estos tumores a la progresión a crizotinib. Amplificaciones en el número de copias del gen de fusión y la coexistencia de segundas mutaciones y amplificaciones se hallaban presentes en algunos tumores resistentes a crizotinib. La contribución de las amplificaciones a la resistencia se basaría en que los niveles de crizotinib en plasma del paciente serían insuficientes para inhibir la mayor cantidad de proteína de fusión ALK presente en el tumor. Una posible vía de individualización del tratamiento sería escalar las dosis de crizotinib en estos pacientes.

En los dos tercios restantes de casos analizados el mecanismo de resistencia parece ser independiente de ALK. Esto sugiere la presencia de activación de otras vías de señalización alternativas que mantienen el crecimiento tumoral en ausencia de activación de ALK. La vía del EGFR ha sido descrita como mecanismo de resistencia a ALK por distintos investigadores. En la serie de pacientes del Massachusetts General Hospital 17 de 18 muestras tumorales tenían algún grado de activación de la vía de EGFR evidenciada mediante el estudio de EGFR fosforilado en las muestras tumorales. El mecanismo preciso por el que se produce esta activación en EGFR es desconocido aunque algunos estudios sugieren que EGFR y sus ligandos podrían estar sobrerregulados. En líneas celulares con este mecanismo de resistencia la inhibición de EGFR restaura la sensibilidad a crizotinib[241].

Una segunda vía activadora alternativa es c-KIT. En 2 de 18 muestras de la serie del Massachusetts General Hospital se describió una amplificación del gen *c-KIT* que se traducía en una sobreexpresión de la proteína c-KIT. El ligando de c-KIT (Stem-cell factor, SCF) en las células estromales de las muestras analizadas también estaba sobreexpresado. Estudios de laboratorio confirman que la presencia de SCF es necesaria para inducir una resistencia mediada por c-KIT. Este mecanismo de resistencia a crizotinib abre la puerta a intentar revertir la resistencia mediante el uso combinado de un inhibidor de c-KIT y un inhibidor de ALK.

Otra vía de señalización implicada en la resistencia se halló en dos pacientes de la serie de Colorado. Dos pacientes presentaban mutaciones en KRAS. Desafortunadamente los tratamientos dirigidos a inhibir KRAS siguen siendo desalentadores en la actualidad.

Finalmente, a pesar de todos los análisis realizados hasta en un tercio de los pacientes se desconoce cual puede ser el mecanismo de resistencia.

Resulta innegable que este conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a crizotinib facilitará el desarrollo de nuevas terapias. De este modo, en aquellos pacientes con resistencias por mutaciones secundarias o sobreexpresión de ALK el uso de nuevos inhibidores de ALK podría ser eficaz. También podrían un papel fármacos que dirigidos disminuir la cantidad de la proteína ALK como los inhibidores de la chaperona HSP90. Ya hemos mencionado que la combinación con inhibidores de EGFR o KIT podrían suponer un enfoque terapéutico adecuado en algunos pacientes. Sin embargo, hasta en un tercio de los pacientes se desconoce cuál puede ser el mecanismo de resistencia. Aquí la quimioterapia continuaría siendo el tratamiento de elección.

Como conclusión, es evidente que la situación clínica de los pacientes con CPCNP ALK positivo representa en la actualidad un reto diagnóstico y terapéutico. Un correcto diagnóstico de estos pacientes permite ofrecerles tratamientos con fármacos inhibidores de ALK siendo los resultados mejores que con el uso de quimioterapia. Es por ello, que lograr un método diagnóstico accesible, sencillo y barato como la IHC facilitaría la universalización del diagnóstico y que ningún paciente con cáncer de pulmón avanzado ALK positivo quedara sin un diagnóstico. La necesidad de un creciente número de estudios moleculares en CPCNP avanzado hace que nos debamos plantear la implementación de biopsias en detrimento de las citologías.

XV. CONCLUSIONES:

En nuestro medio, los pacientes con CPCNP ALK positivo representan un 7.1% del total en una muestra seleccionada.

Los pacientes con CPCNP ALK positivo presentan unas características clínicas específicas.

La IHC con D5F3 es un método diagnóstico preciso que puede identificar adecuadamente a los pacientes con CPCNP ALK positivo.

La IHC con D5F3 es un proceso diagnóstico candidato a ser validado de forma prospectiva en estudios con inhibidores de ALK.

XVI. REFERENCIAS:

1. Shaw, A.T., et al., *Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4247-53.
2. Kris, M.G., et al., *Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs*. JAMA, 2014. **311**(19): p. 1998-2006.
3. Zhang, Y., et al., *Frequency of driver mutations in lung adenocarcinoma from female never-smokers varies with histologic subtypes and age at diagnosis*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(7): p. 1947-53.
4. Blackhall, F.H., et al., *Prevalence and Clinical Outcomes for Patients With ALK-Positive Resected Stage I to III Adenocarcinoma: Results From the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project*. J Clin Oncol, 2014.
5. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F, *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. International Agency for Research on Cancer, 2013.
6. Thu, K.L., et al., *Lung adenocarcinoma of never smokers and smokers harbor differential regions of genetic alteration and exhibit different levels of genomic instability*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33003.
7. Zell, J.A., et al., *Epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma: improvement in survival after release of the 1999 WHO classification of lung tumors*. J Clin Oncol, 2005. **23**(33): p. 8396-405.
8. Shaw, A.T., et al., *Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis*. Lancet Oncol, 2011. **12**(11): p. 1004-12.
9. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2006*. CA Cancer J Clin, 2006. **56**(2): p. 106-30.
10. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
11. Stellman, S.D. and L. Garfinkel, *Lung cancer risk is proportional to cigarette tar yield: evidence from a prospective study*. Prev Med, 1989. **18**(4): p. 518-25.
12. Fiore, M.C., et al., *Trends in cigarette smoking in the United States. The changing influence of gender and race*. JAMA, 1989. **261**(1): p. 49-55.
13. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030*. PLoS Med, 2006. **3**(11): p. e442.
14. Doll, R. and R. Peto, *Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers*. J Epidemiol Community Health, 1978. **32**(4): p. 303-13.
15. Subramanian, J. and R. Govindan, *Lung cancer in never smokers: a review*. J Clin Oncol, 2007. **25**(5): p. 561-70.

16. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(25): p. 2385-94.
17. Thunnissen, E., et al., *EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations*. Virchows Arch, 2012. **461**(3): p. 245-57.
18. Wynes, M.W., et al., *An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(5): p. 631-8.
19. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
20. Boffetta, P., et al., *Incidence of lung cancer in a large cohort of non-smoking men from Sweden*. Int J Cancer, 2001. **94**(4): p. 591-3.
21. Thun, M.J., et al., *Lung cancer death rates in lifelong nonsmokers*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(10): p. 691-9.
22. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2005*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(1): p. 10-30.
23. Hirayama, T., *Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan*. Br Med J (Clin Res Ed), 1981. **282**(6259): p. 183-5.
24. Vineis, P., et al., *Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(2): p. 99-106.
25. Vineis, P., et al., *Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study*. BMJ, 2005. **330**(7486): p. 277.
26. Yu, I.T., et al., *Dose-response relationship between cooking fumes exposures and lung cancer among Chinese nonsmoking women*. Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4961-7.
27. Ko, Y.C., et al., *Risk factors for primary lung cancer among non-smoking women in Taiwan*. Int J Epidemiol, 1997. **26**(1): p. 24-31.
28. Gao, Y.T., et al., *Lung cancer among Chinese women*. Int J Cancer, 1987. **40**(5): p. 604-9.
29. Wu-Williams, A.H., et al., *Lung cancer among women in north-east China*. Br J Cancer, 1990. **62**(6): p. 982-7.
30. Kleinerman, R., et al., *Lung cancer and indoor air pollution in rural china*. Ann Epidemiol, 2000. **10**(7): p. 469.
31. Sellers, T.A., et al., *Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(15): p. 1272-9.
32. Yang, P., et al., *Lung cancer risk in families of nonsmoking probands: heterogeneity by age at diagnosis*. Genet Epidemiol, 1999. **17**(4): p. 253-73.
33. Lindelof, B. and G. Eklund, *Analysis of hereditary component of cancer by use of a familial index by site*. Lancet, 2001. **358**(9294): p. 1696-8.

34. Goldgar, D.E., et al., *Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(21): p. 1600-8.
35. Birch, J.M., et al., *Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations*. Oncogene, 2001. **20**(34): p. 4621-8.
36. Olivier, M., et al., *Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype*. Cancer Res, 2003. **63**(20): p. 6643-50.
37. Gazdar, A., et al., *Hereditary lung cancer syndrome targets never smokers with germline EGFR gene T790M mutations*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(4): p. 456-63.
38. Kiyohara, C. and Y. Ohno, *[Role of metabolic polymorphisms in lung carcinogenesis]*. Nihon Koshu Eisei Zasshi, 1999. **46**(4): p. 241-9.
39. Guengerich, F.P. and T. Shimada, *Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes*. Mutat Res, 1998. **400**(1-2): p. 201-13.
40. Le Marchand, L., et al., *Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States)*. Cancer Causes Control, 2003. **14**(4): p. 339-46.
41. Benhamou, S., et al., *Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk*. Carcinogenesis, 2002. **23**(8): p. 1343-50.
42. Kiyohara, C., et al., *Risk modification by CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms in the association of environmental tobacco smoke and lung cancer: a case-control study in Japanese nonsmoking women*. Int J Cancer, 2003. **107**(1): p. 139-44.
43. Bennett, W.P., et al., *Environmental tobacco smoke, genetic susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(23): p. 2009-14.
44. Hung, R.J., et al., *A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 633-7.
45. Amos, C.I., et al., *Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1*. Nat Genet, 2008. **40**(5): p. 616-22.
46. Thorgeirsson, T.E., et al., *A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease*. Nature, 2008. **452**(7187): p. 638-42.
47. Wu, C., et al., *Genetic variants on chromosome 15q25 associated with lung cancer risk in Chinese populations*. Cancer Res, 2009. **69**(12): p. 5065-72.
48. Wang, Y., et al., *Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk*. Nat Genet, 2008. **40**(12): p. 1407-9.
49. Landi, M.T., et al., *A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(5): p. 679-91.
50. Zhang, M., et al., *Candidate variants at 6p21.33 and 6p22.1 and risk of non-small cell lung cancer in a Chinese population*. Int J Mol Epidemiol Genet, 2010. **1**(1): p. 11-8.

51. Jin, G., et al., *Genetic variants at 6p21.1 and 7p15.3 are associated with risk of multiple cancers in Han Chinese*. Am J Hum Genet, 2012. **91**(5): p. 928-34.
52. Samet, J.M., *Radon and lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(10): p. 745-57.
53. Belinsky, S.A., et al., *Plutonium targets the p16 gene for inactivation by promoter hypermethylation in human lung adenocarcinoma*. Carcinogenesis, 2004. **25**(6): p. 1063-7.
54. Samet, J.M. and G.R. Eradze, *Radon and lung cancer risk: taking stock at the millenium*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 4**: p. 635-41.
55. Selikoff, I.J., E.C. Hammond, and J. Churg, *Asbestos exposure, smoking, and neoplasia*. JAMA, 1968. **204**(2): p. 106-12.
56. Mossman, B.T., et al., *Asbestos: scientific developments and implications for public policy*. Science, 1990. **247**(4940): p. 294-301.
57. van Loon, A.J., et al., *Occupational exposure to carcinogens and risk of lung cancer: results from The Netherlands cohort study*. Occup Environ Med, 1997. **54**(11): p. 817-24.
58. Wakelee, H.A., et al., *Lung cancer incidence in never smokers*. J Clin Oncol, 2007. **25**(5): p. 472-8.
59. Gruber, C.J., et al., *Production and actions of estrogens*. N Engl J Med, 2002. **346**(5): p. 340-52.
60. Yager, J.D. and J.G. Liehr, *Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 203-32.
61. Stabile, L.P., et al., *Combined targeting of the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer shows enhanced antiproliferative effects*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1459-70.
62. Losordo, D.W. and J.M. Isner, *Estrogen and angiogenesis: A review*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(1): p. 6-12.
63. Samet, J.M., C.G. Humble, and D.R. Pathak, *Personal and family history of respiratory disease and lung cancer risk*. Am Rev Respir Dis, 1986. **134**(3): p. 466-70.
64. Osann, K.E., *Lung cancer in women: the importance of smoking, family history of cancer, and medical history of respiratory disease*. Cancer Res, 1991. **51**(18): p. 4893-7.
65. Brenner, A.V., et al., *Previous pulmonary diseases and risk of lung cancer in Gansu Province, China*. Int J Epidemiol, 2001. **30**(1): p. 118-24.
66. Alavanja, M.C., et al., *Preexisting lung disease and lung cancer among nonsmoking women*. Am J Epidemiol, 1992. **136**(6): p. 623-32.
67. Cheng, Y.W., et al., *The association of human papillomavirus 16/18 infection with lung cancer among nonsmoking Taiwanese women*. Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 2799-803.
68. Soni, M.K., et al., *The validity and clinical utility of symptom monitoring in advanced lung cancer: a literature review*. Clin Lung Cancer, 2002. **4**(3): p. 153-60.

69. Izarzugaza, M.I., et al., *Tobacco-related tumours of the lung, bladder and larynx: changes in Spain*. *Ann Oncol*, 2010. **21 Suppl 3**: p. iii52-60.
70. Henschke, C.I., et al., *Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening*. *Lancet*, 1999. **354**(9173): p. 99-105.
71. Patel, A.M. and S.G. Peters, *Clinical manifestations of lung cancer*. *Mayo Clin Proc*, 1993. **68**(3): p. 273-7.
72. Cremaschi, P., et al., *Therapeutic embolization of bronchial artery: a successful treatment in 209 cases of relapse hemoptysis*. *Angiology*, 1993. **44**(4): p. 295-9.
73. Hayakawa, K., et al., *Bronchial artery embolization for hemoptysis: immediate and long-term results*. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 1992. **15**(3): p. 154-8; discussion 158-9.
74. Ma, J.T., et al., *A meta-analysis comparing higher and lower dose radiotherapy for palliation in locally advanced lung cancer*. *Cancer Sci*, 2014.
75. Muers, M.F. and C.E. Round, *Palliation of symptoms in non-small cell lung cancer: a study by the Yorkshire Regional Cancer Organisation Thoracic Group*. *Thorax*, 1993. **48**(4): p. 339-43.
76. Bruera, E., et al., *Effects of oxygen on dyspnoea in hypoxaemic terminal-cancer patients*. *Lancet*, 1993. **342**(8862): p. 13-4.
77. Bruera, E., T. Schoeller, and T. MacEachern, *Symptomatic benefit of supplemental oxygen in hypoxemic patients with terminal cancer: the use of the N of 1 randomized controlled trial*. *J Pain Symptom Manage*, 1992. **7**(6): p. 365-8.
78. Bruera, E., et al., *Effects of morphine on the dyspnea of terminal cancer patients*. *J Pain Symptom Manage*, 1990. **5**(6): p. 341-4.
79. Mazzocato, C., T. Buclin, and C.H. Rapin, *The effects of morphine on dyspnea and ventilatory function in elderly patients with advanced cancer: a randomized double-blind controlled trial*. *Ann Oncol*, 1999. **10**(12): p. 1511-4.
80. O'Neill, P.A., P.B. Morton, and R.D. Stark, *Chlorpromazine--a specific effect on breathlessness?* *Br J Clin Pharmacol*, 1985. **19**(6): p. 793-7.
81. Woodcock, A.A., E.R. Gross, and D.M. Geddes, *Drug treatment of breathlessness: contrasting effects of diazepam and promethazine in pink puffers*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1981. **283**(6287): p. 343-6.
82. Moghissi, K., et al., *The place of bronchoscopic photodynamic therapy in advanced unresectable lung cancer: experience of 100 cases*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999. **15**(1): p. 1-6.
83. Liu, J.S., et al., *The present status of bronchoscopic Nd:YAG laser*. *J Clin Laser Med Surg*, 1991. **9**(1): p. 63-70.
84. Dutau, H., et al., *Use of the Dumon Y-stent in the management of malignant disease involving the carina: a retrospective review of 86 patients*. *Chest*, 2004. **126**(3): p. 951-8.
85. Yellin, A., et al., *Superior vena cava syndrome. The myth--the facts*. *Am Rev Respir Dis*, 1990. **141**(5 Pt 1): p. 1114-8.

86. Tanigawa, N., et al., *Clinical outcome of stenting in superior vena cava syndrome associated with malignant tumors. Comparison with conventional treatment.* Acta Radiol, 1998. **39**(6): p. 669-74.
87. Nicholson, A.A., et al., *Treatment of malignant superior vena cava obstruction: metal stents or radiation therapy.* J Vasc Interv Radiol, 1997. **8**(5): p. 781-8.
88. Kvale, P.A., M. Simoff, and U.B. Prakash, *Lung cancer. Palliative care.* Chest, 2003. **123**(1 Suppl): p. 284S-311S.
89. Mukai, K., et al., *The incidence of secondary tumors of the heart and pericardium: a 10-year study.* Jpn J Clin Oncol, 1988. **18**(3): p. 195-201.
90. Park, J.S., R. Rentschler, and D. Wilbur, *Surgical management of pericardial effusion in patients with malignancies. Comparison of subxiphoid window versus pericardiectomy.* Cancer, 1991. **67**(1): p. 76-80.
91. Carey, R.W., J.M. Sawicka, and N.C. Choi, *Cytologically negative pericardial effusion complicating combined modality therapy for localized small-cell carcinoma of the lung.* J Clin Oncol, 1987. **5**(5): p. 818-24.
92. Rusch, V.W., et al., *Induction chemoradiation and surgical resection for superior sulcus non-small-cell lung carcinomas: long-term results of Southwest Oncology Group Trial 9416 (Intergroup Trial 0160).* J Clin Oncol, 2007. **25**(3): p. 313-8.
93. Narayan, S. and C.R. Thomas, Jr., *Multimodality therapy for Pancoast tumor.* Nat Clin Pract Oncol, 2006. **3**(9): p. 484-91.
94. Munk, P.L., et al., *Pulmonary lymphangitic carcinomatosis: CT and pathologic findings.* Radiology, 1988. **166**(3): p. 705-9.
95. Merchut, M.P., *Brain metastases from undiagnosed systemic neoplasms.* Arch Intern Med, 1989. **149**(5): p. 1076-80.
96. Ceresoli, G.L., et al., *Brain metastases in locally advanced nonsmall cell lung carcinoma after multimodality treatment: risk factors analysis.* Cancer, 2002. **95**(3): p. 605-12.
97. Gandara, D.R., et al., *Long-term survival with concurrent chemoradiation therapy followed by consolidation docetaxel in stage IIIB non-small-cell lung cancer: a phase II Southwest Oncology Group Study (S9504).* Clin Lung Cancer, 2006. **8**(2): p. 116-21.
98. Sze, G., et al., *Detection of brain metastases: comparison of contrast-enhanced MR with unenhanced MR and enhanced CT.* AJNR Am J Neuroradiol, 1990. **11**(4): p. 785-91.
99. Davis, P.C., et al., *Diagnosis of cerebral metastases: double-dose delayed CT vs contrast-enhanced MR imaging.* AJNR Am J Neuroradiol, 1991. **12**(2): p. 293-300.
100. Coia, L.R., et al., *A report of the consensus workshop panel on the treatment of brain metastases.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1992. **23**(1): p. 223-7.
101. Kelly, K. and P.A. Bunn, Jr., *Is it time to reevaluate our approach to the treatment of brain metastases in patients with non-small cell lung cancer?* Lung Cancer, 1998. **20**(2): p. 85-91.

102. Fogelman, I., et al., *Positron emission tomography and bone metastases*. *Semin Nucl Med*, 2005. **35**(2): p. 135-42.
103. Haentjens, P., P.P. Casteleyn, and P. Opdecam, *Evaluation of impending fractures and indications for prophylactic fixation of metastases in long bones. Review of the literature*. *Acta Orthop Belg*, 1993. **59 Suppl 1**: p. 6-11.
104. Rosen, L.S., et al., *Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors: a randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial*. *Cancer*, 2004. **100**(12): p. 2613-21.
105. Nathanson, L. and T.C. Hall, *A spectrum of tumors that produce paraneoplastic syndromes. Lung tumors: how they produce their syndromes*. *Ann N Y Acad Sci*, 1974. **230**: p. 367-77.
106. Puccio, M. and L. Nathanson, *The cancer cachexia syndrome*. *Semin Oncol*, 1997. **24**(3): p. 277-87.
107. Holmes, D., *Metabolism: WAT browning-key feature of cancer-associated cachexia*. *Nat Rev Endocrinol*, 2014.
108. Body, J.J., *The syndrome of anorexia-cachexia*. *Curr Opin Oncol*, 1999. **11**(4): p. 255-60.
109. Loprinzi, C.L., et al., *Phase III evaluation of four doses of megestrol acetate as therapy for patients with cancer anorexia and/or cachexia*. *J Clin Oncol*, 1993. **11**(4): p. 762-7.
110. Stewart, A.F., *Clinical practice. Hypercalcemia associated with cancer*. *N Engl J Med*, 2005. **352**(4): p. 373-9.
111. Bender, R.A. and H. Hansen, *Hypercalcemia in bronchogenic carcinoma. A prospective study of 200 patients*. *Ann Intern Med*, 1974. **80**(2): p. 205-8.
112. Mundy, G.R., *Hypercalcemic factors other than parathyroid hormone-related protein*. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1989. **18**(3): p. 795-806.
113. Mundy, G.R. and T.J. Martin, *The hypercalcemia of malignancy: pathogenesis and management*. *Metabolism*, 1982. **31**(12): p. 1247-77.
114. Legrand, S.B., *Modern management of malignant hypercalcemia*. *Am J Hosp Palliat Care*, 2011. **28**(7): p. 515-7.
115. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. *Ann Surg Oncol*, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
116. Howington, J.A., et al., *Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e278S-313S.
117. Brunelli, A., et al., *Physiologic evaluation of the patient with lung cancer being considered for resectional surgery: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. *Chest*, 2013. **143**(5 Suppl): p. e166S-90S.

118. Donington, J., et al., *American College of Chest Physicians and Society of Thoracic Surgeons consensus statement for evaluation and management for high-risk patients with stage I non-small cell lung cancer*. Chest, 2012. **142**(6): p. 1620-35.
119. Boffa, D.J., et al., *Data from The Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery database: the surgical management of primary lung tumors*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008. **135**(2): p. 247-54.
120. Scott, W.J., et al., *Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 234S-242S.
121. Siemel, W., et al., *Frequency of local recurrence following segmentectomy of stage IA non-small cell lung cancer is influenced by segment localisation and width of resection margins-- implications for patient selection for segmentectomy*. Eur J Cardiothorac Surg, 2007. **31**(3): p. 522-7; discussion 527-8.
122. Narsule, C.K., M.I. Ebright, and H.C. Fernando, *Sublobar versus lobar resection: current status*. Cancer J, 2011. **17**(1): p. 23-7.
123. Allen, M.S., et al., *Morbidity and mortality of major pulmonary resections in patients with early-stage lung cancer: initial results of the randomized, prospective ACOSOG Z0030 trial*. Ann Thorac Surg, 2006. **81**(3): p. 1013-9; discussion 1019-20.
124. Darling, G.E., et al., *Randomized trial of mediastinal lymph node sampling versus complete lymphadenectomy during pulmonary resection in the patient with N0 or N1 (less than hilar) non-small cell carcinoma: results of the American College of Surgery Oncology Group Z0030 Trial*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **141**(3): p. 662-70.
125. Martins, R.G., et al., *The management of patients with stage IIIA non-small cell lung cancer with N2 mediastinal node involvement*. J Natl Compr Canc Netw, 2012. **10**(5): p. 599-613.
126. Farjah, F., et al., *Surgeon specialty and long-term survival after pulmonary resection for lung cancer*. Ann Thorac Surg, 2009. **87**(4): p. 995-1004; discussion 1005-6.
127. Albain, K.S., et al., *Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial*. Lancet, 2009. **374**(9687): p. 379-86.
128. van Meerbeeck, J.P., et al., *Randomized controlled trial of resection versus radiotherapy after induction chemotherapy in stage IIIA-N2 non-small-cell lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(6): p. 442-50.
129. Cerfolio, R.J. and A.S. Bryant, *Survival of patients with unsuspected N2 (stage IIIA) nonsmall-cell lung cancer*. Ann Thorac Surg, 2008. **86**(2): p. 362-6; discussion 366-7.
130. Higgins, K., et al., *Preoperative chemotherapy versus preoperative chemoradiotherapy for stage III (N2) non-small-cell lung cancer*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2009. **75**(5): p. 1462-7.
131. Shah, A.A., et al., *Induction chemoradiation is not superior to induction chemotherapy alone in stage IIIA lung cancer*. Ann Thorac Surg, 2012. **93**(6): p. 1807-12.

132. Rosenzweig, K.E., et al., *ACR appropriateness criteria nonsurgical treatment for non-small-cell lung cancer: poor performance status or palliative intent*. J Am Coll Radiol, 2013. **10**(9): p. 654-64.
133. Gewanter, R.M., et al., *ACR Appropriateness Criteria: nonsurgical treatment for non-small-cell lung cancer: good performance status/definitive intent*. Curr Probl Cancer, 2010. **34**(3): p. 228-49.
134. Douillard, J.Y., et al., *Impact of postoperative radiation therapy on survival in patients with complete resection and stage I, II, or IIIA non-small-cell lung cancer treated with adjuvant chemotherapy: the adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA) Randomized Trial*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2008. **72**(3): p. 695-701.
135. Lally, B.E., et al., *Postoperative radiotherapy for stage II or III non-small-cell lung cancer using the surveillance, epidemiology, and end results database*. J Clin Oncol, 2006. **24**(19): p. 2998-3006.
136. *Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. PORT Meta-analysis Trialists Group*. Lancet, 1998. **352**(9124): p. 257-63.
137. Arriagada, R., et al., *Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(4): p. 351-60.
138. Winton, T., et al., *Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2005. **352**(25): p. 2589-97.
139. Butts, C.A., et al., *Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely resected stage IB and II non-small-cell lung cancer: updated survival analysis of JBR-10*. J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 29-34.
140. Douillard, J.Y., et al., *Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(9): p. 719-27.
141. Pignon, J.P., et al., *Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group*. J Clin Oncol, 2008. **26**(21): p. 3552-9.
142. Strauss, G.M., et al., *Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups*. J Clin Oncol, 2008. **26**(31): p. 5043-51.
143. Felip, E., et al., *Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(19): p. 3138-45.
144. Westeel, V., et al., *A randomised trial comparing preoperative to perioperative chemotherapy in early-stage non-small-cell lung cancer (IFCT 0002 trial)*. Eur J Cancer, 2013. **49**(12): p. 2654-64.

145. Dillman, R.O., et al., *A randomized trial of induction chemotherapy plus high-dose radiation versus radiation alone in stage III non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 1990. **323**(14): p. 940-5.
146. Schaake-Koning, C., et al., *Effects of concomitant cisplatin and radiotherapy on inoperable non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 1992. **326**(8): p. 524-30.
147. Dillman, R.O., et al., *Improved survival in stage III non-small-cell lung cancer: seven-year follow-up of cancer and leukemia group B (CALGB) 8433 trial*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(17): p. 1210-5.
148. Le Chevalier, T., et al., *Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in nonresectable non-small-cell lung cancer: first analysis of a randomized trial in 353 patients*. J Natl Cancer Inst, 1991. **83**(6): p. 417-23.
149. Auperin, A., et al., *Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(13): p. 2181-90.
150. Azzoli, C.G., et al., *American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6251-66.
151. *Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials*. J Clin Oncol, 2008. **26**(28): p. 4617-25.
152. Ohe, Y., et al., *Randomized phase III study of cisplatin plus irinotecan versus carboplatin plus paclitaxel, cisplatin plus gemcitabine, and cisplatin plus vinorelbine for advanced non-small-cell lung cancer: Four-Arm Cooperative Study in Japan*. Ann Oncol, 2007. **18**(2): p. 317-23.
153. Scagliotti, G.V., et al., *Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2008. **26**(21): p. 3543-51.
154. Fossella, F., et al., *Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group*. J Clin Oncol, 2003. **21**(16): p. 3016-24.
155. Lilenbaum, R., et al., *Single-agent versus combination chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer and a performance status of 2: prognostic factors and treatment selection based on two large randomized clinical trials*. J Thorac Oncol, 2009. **4**(7): p. 869-74.
156. Langer, C.J., et al., *Phase III trial comparing paclitaxel poliglumex (CT-2103, PPX) in combination with carboplatin versus standard paclitaxel and carboplatin in the treatment of PS 2 patients with chemotherapy-naive advanced non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(6): p. 623-30.
157. Gridelli, C., *The ELVIS trial: a phase III study of single-agent vinorelbine as first-line treatment in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. Elderly Lung Cancer Vinorelbine Italian Study*. Oncologist, 2001. **6 Suppl 1**: p. 4-7.

158. Gridelli, C., et al., *Chemotherapy for elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: the Multicenter Italian Lung Cancer in the Elderly Study (MILES) phase III randomized trial*. J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(5): p. 362-72.
159. Quoix, E., et al., *Carboplatin and weekly paclitaxel doublet chemotherapy compared with monotherapy in elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer: IFCT-0501 randomised, phase 3 trial*. Lancet, 2011. **378**(9796): p. 1079-88.
160. Shepherd, F.A., et al., *Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 123-32.
161. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
162. Zetter, B.R., *Angiogenesis and tumor metastasis*. Annu Rev Med, 1998. **49**: p. 407-24.
163. Willett, C.G., et al., *Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer*. Nat Med, 2004. **10**(2): p. 145-7.
164. Sandler, A., et al., *Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(24): p. 2542-50.
165. Reck, M., et al., *Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAL)* . Ann Oncol, 2010. **21**(9): p. 1804-9.
166. Rosell, R., et al., *Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(3): p. 239-46.
167. Zhou, C., et al., *Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study*. Lancet Oncol, 2011. **12**(8): p. 735-42.
168. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 947-57.
169. Sequist, L.V., et al., *Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations*. J Clin Oncol, 2013. **31**(27): p. 3327-34.
170. Gridelli, C., et al., *Maintenance treatment of advanced non-small-cell lung cancer: results of an international expert panel meeting of the Italian association of thoracic oncology*. Lung Cancer, 2012. **76**(3): p. 269-79.
171. Hashemi-Sadraei, N. and N.A. Pennell, *Advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): maintenance therapy for all?* Curr Treat Options Oncol, 2012. **13**(4): p. 478-90.
172. Paz-Ares, L.G., et al., *PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2013. **31**(23): p. 2895-902.

173. Ciuleanu, T., et al., *Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study*. Lancet, 2009. **374**(9699): p. 1432-40.
174. Cappuzzo, F., et al., *Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study*. Lancet Oncol, 2010. **11**(6): p. 521-9.
175. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Modelling the molecular circuitry of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(5): p. 331-41.
176. Sanchez-Cespedes, M., et al., *Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1309-13.
177. Wong, M.P., et al., *Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers*. Cancer, 2003. **97**(5): p. 1263-70.
178. Hainaut, P., M. Olivier, and G.P. Pfeifer, *TP53 mutation spectrum in lung cancers and mutagenic signature of components of tobacco smoke: lessons from the IARC TP53 mutation database*. Mutagenesis, 2001. **16**(6): p. 551-3; author reply 555-6.
179. Lynch, T.J., et al., *Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2129-39.
180. Toyooka, S., et al., *Dose effect of smoking on aberrant methylation in non-small cell lung cancers*. Int J Cancer, 2004. **110**(3): p. 462-4.
181. Zochbauer-Muller, S., et al., *Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers*. Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 249-55.
182. Peifer, M., et al., *Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer*. Nat Genet, 2012. **44**(10): p. 1104-10.
183. *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. Nature, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
184. *Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers*. Nature, 2012. **489**(7417): p. 519-25.
185. Sun, Y., et al., *Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases*. J Clin Oncol, 2010. **28**(30): p. 4616-20.
186. Woodcock, J., *Assessing the clinical utility of diagnostics used in drug therapy*. Clin Pharmacol Ther, 2010. **88**(6): p. 765-73.
187. Felsher, D.W., *Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit?* Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3081-6; discussion 3086.
188. Pao, W., V.A. Miller, and M.G. Kris, *'Targeting' the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase with gefitinib (Iressa) in non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(1): p. 33-40.

189. Pao, W., et al., *EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(36): p. 13306-11.
190. Rosell, R., et al., *Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 958-67.
191. Giaccone, G., et al., *Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 777-84.
192. Herbst, R.S., et al., *TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 5892-9.
193. Thatcher, N., et al., *Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)*. Lancet, 2005. **366**(9496): p. 1527-37.
194. Soda, M., et al., *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 561-6.
195. Koivunen, J.P., et al., *EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(13): p. 4275-83.
196. Iwahara, T., et al., *Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system*. Oncogene, 1997. **14**(4): p. 439-49.
197. Morris, S.W., et al., *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1281-4.
198. Chiarle, R., et al., *The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(1): p. 11-23.
199. Passoni, L. and C. Gambacorti-Passerini, *ALK a novel lymphoma-associated tumor antigen for vaccination strategies*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(10): p. 1675-81.
200. Spix, C., et al., *Neuroblastoma incidence and survival in European children (1978-1997): report from the Automated Childhood Cancer Information System project*. Eur J Cancer, 2006. **42**(13): p. 2081-91.
201. Mosse, Y.P., et al., *Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 930-5.
202. George, R.E., et al., *Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma*. Nature, 2008. **455**(7215): p. 975-8.
203. Griffin, C.A., et al., *Recurrent involvement of 2p23 in inflammatory myofibroblastic tumors*. Cancer Res, 1999. **59**(12): p. 2776-80.
204. Takeuchi, K., et al., *KIF5B-ALK, a novel fusion oncokininase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 3143-9.

205. Togashi, Y., et al., *KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31323.
206. Hernandez, L., et al., *TRK-fused gene (TFG) is a new partner of ALK in anaplastic large cell lymphoma producing two structurally different TFG-ALK translocations*. Blood, 1999. **94**(9): p. 3265-8.
207. Heuckmann, J.M., et al., *Differential protein stability and ALK inhibitor sensitivity of EML4-ALK fusion variants*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4682-90.
208. Inamura, K., et al., *EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(1): p. 13-7.
209. Takeuchi, K., et al., *Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(20): p. 6618-24.
210. Inamura, K., et al., *EML4-ALK lung cancers are characterized by rare other mutations, a TTF-1 cell lineage, an acinar histology, and young onset*. Mod Pathol, 2009. **22**(4): p. 508-15.
211. Perner, S., et al., *EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event*. Neoplasia, 2008. **10**(3): p. 298-302.
212. Shinmura, K., et al., *EML4-ALK fusion transcripts, but no NPM-, TPM3-, CLTC-, ATIC-, or TFG-ALK fusion transcripts, in non-small cell lung carcinomas*. Lung Cancer, 2008. **61**(2): p. 163-9.
213. Martelli, M.P., et al., *EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues*. Am J Pathol, 2009. **174**(2): p. 661-70.
214. Wong, D.W., et al., *The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS*. Cancer, 2009. **115**(8): p. 1723-33.
215. Kwak, E.L., et al., *Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(18): p. 1693-703.
216. Camidge, D.R., et al., *Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study*. Lancet Oncol, 2012. **13**(10): p. 1011-9.
217. D.-W. Kim, et al., *Updated results of a global phase II study with crizotinib in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer (NSCLC)*. Annals of oncology, 2012. **Sept** (S).
218. Tony Mok, et al., *First-line crizotinib versus pemetrexed-cisplatin or pemetrexed-carboplatin in patients (pts) with advanced ALK-positive non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a phase III study (PROFILE 1014)*. Journal of Clinical Oncology, 2014. **32**(5s): p. suppl; abstr 8002.
219. Shaw, A.T., B. Solomon, and M.M. Kenudson, *Crizotinib and testing for ALK*. J Natl Compr Canc Netw, 2011. **9**(12): p. 1335-41.
220. Peters, S., et al., *Treatment and detection of ALK-rearranged NSCLC*. Lung Cancer, 2013. **81**(2): p. 145-54.

221. DiVito, K.A., et al., *Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays*. Lab Invest, 2004. **84**(8): p. 1071-8.
222. Mino-Kenudson, M., et al., *A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(5): p. 1561-71.
223. Friboulet, L., et al., *ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(12): p. 1101-10.
224. Yang, P., et al., *Worse disease-free survival in never-smokers with ALK+ lung adenocarcinoma*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(1): p. 90-7.
225. Rodig, S.J., et al., *Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(16): p. 5216-23.
226. Yi, E.S., et al., *Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(3): p. 459-65.
227. Jokoji, R., et al., *Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma*. J Clin Pathol, 2010. **63**(12): p. 1066-70.
228. Paik, J.H., et al., *Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2012. **76**(3): p. 403-9.
229. Kim, H., et al., *Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(8): p. 1359-66.
230. McLeer-Florin, A., et al., *Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(2): p. 348-54.
231. Lopes, L.F. and C.E. Bacchi, *Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangement in non-small-cell lung cancer in a Brazilian population*. Clinics (Sao Paulo), 2012. **67**(7): p. 845-7.
232. Sholl, L.M., et al., *Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(3): p. 322-8.
233. Camidge, D.R. and R.C. Doebele, *Treating ALK-positive lung cancer--early successes and future challenges*. Nat Rev Clin Oncol, 2012. **9**(5): p. 268-77.
234. Horn, L. and W. Pao, *EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4232-5.
235. Blackhall, F., et al., *Prevalence and clinical outcomes for patients with ALK positive adenocarcinoma in Europe: preliminary results from the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project*. Annals of oncology, 2012. **Sep** (s).
236. Li, Y., et al., *Clinical significance of EML4-ALK fusion gene and association with EGFR and KRAS gene mutations in 208 Chinese patients with non-small cell lung cancer*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52093.

237. Minca, E.C., et al., *ALK status testing in non-small cell lung carcinoma: correlation between ultrasensitive IHC and FISH*. *J Mol Diagn*, 2013. **15**(3): p. 341-6.
238. Katayama, R., et al., *Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers*. *Sci Transl Med*, 2012. **4**(120): p. 120ra17.
239. Doebele, R.C., et al., *Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(5): p. 1472-82.
240. Heuckmann, J.M., et al., *ALK mutations conferring differential resistance to structurally diverse ALK inhibitors*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(23): p. 7394-401.
241. Sasaki, T., et al., *A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors*. *Cancer Res*, 2011. **71**(18): p. 6051-60.

XVII. COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES:

- 1. ALK rearrangement in a selected population of advanced non small cell lung cancer. FISH and Inumohistochemistry diagnostic methods, prevalence and clinical outcomes.** Pablo Martínez, Javier Hernández, Josep Castellví, Natalia Tallada, Susana Cedrés, M^a Ángeles Montero, Víctor Rodríguez, Isaac Nuñez, Guillem Argilés, Nuria Mulet, Davis Yuri Torrejón, Santiago Ramón y Cajal and Enriqueta Felip. Vall d'Hebrón University Hospital. Universidad Autónoma de Barcelona. Medical Oncology Service and Pathology Department. **Poster.** Abstract 7566. ASCO Annual Meeting, Chicago, 2011.
- 2. Diagnostic methods, prevalence and clinical outcomes of patients with ALK positive Non Small Cell Lung Cancer.** Pablo Martínez, Javier Hernández, Josep Castellví, Natalia Tallada, Susana Cedrés, M^a Ángeles Montero, Víctor Rodríguez, Isaac Nuñez, Guillem Argilés, Nuria Mulet, Davis Yuri Torrejón, Santiago Ramón y Cajal and Enriqueta Felip. **Comunicación Oral.** Sesión O05-05. Word Conference in Lung Cancer. Amsterdam, 2011.
- 3. Fluorescence *In Situ* Hybridization and Immunohistochemistry as Diagnostic Methods for ALK Positive Non-Small Cell Lung Cancer Patients.** Pablo Martínez, Javier Hernández-Losa, Ma Ángeles Montero, Susana Cedrés, Josep Castellví, Alex Martínez-Martí, Natalia Tallada, Nuria Murtra-Garrell, Alejandro Navarro-Mendivill, Victor Rodríguez-Freixinos, Mercedes Canela, Santiago Ramon y Cajal, Enriqueta Felip. PLOS One, 24 Enero 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0052261. Citado en 17 ocasiones por otros autores en Scopus.