



ORIGINAL

Estudio de variantes genéticas en 169 pacientes de cáncer de pulmón no microcítico



Lydia Formanti Alonso^{a,b,*}, Lidia Atienza Cuevas^{b,c}, Raquel Romero García^{b,c},
Javier Mohigefer Barrera^{a,b}, Juan Jesús del Río Ignacio^{a,b},
Antonio Santisteban Espejo^{b,c}, Irene Bernal Florindo^{a,b},
Inmaculada Catalina Fernández^{b,c} y Marcial García Rojo^{a,b}

^a Unidad de Gestión Clínica Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Jerez de la Frontera, Jerez de la Frontera, Cádiz, España

^b Instituto de Investigación e Innovación Biomédica de Cádiz (INiBICA), Cádiz, España

^c Unidad de Gestión Clínica Anatomía Patológica, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España

Recibido el 16 de marzo de 2023; aceptado el 1 de junio de 2023

Disponible en Internet el 1 de septiembre de 2023

PALABRAS CLAVE

Carcinoma de pulmón de células no pequeñas;
Inmunohistoquímica;
NGS;
EGFR;
PD-L1

Resumen

Introducción: El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en nuestro país. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) representa el paradigma de la medicina personalizada. El objetivo principal de este trabajo es estudiar la frecuencia en nuestro medio de las variantes clínicamente significativas más frecuentemente descritas en CPCNP.

Material y métodos: Se estudia la expresión inmunohistoquímica de TTF1, p40 y PD-L1 y la frecuencia de variantes genéticas mediante secuenciación masiva (NGS) con un panel de 52 genes, en 174 muestras incluidas en parafina de CPCNP en 169 pacientes (111 hombres y 52 mujeres) de la provincia de Cádiz.

Resultados: La expresión inmunohistoquímica de TTF1, p40 y PD-L1 fue positiva en el 87%, el 0% y el 46% de los adenocarcinomas y en el 0%, el 100% y el 41% de los carcinomas escamosos. En NGS, las variantes de un solo nucleótido (SNV) más frecuentes fueron KRAS (36%), EGFR (14%), BRAF (10%), PIK3CA (8%) y MET (3%). Las variantes en el número de copias (CNV) más frecuentes fueron las amplificaciones en NF1 (30%), EGFR (18%), CCND1 (9%), MYC (9%) y KRAS (7%). En mujeres, las SNV en EGFR fueron más frecuentes que en hombres ($p < 0,0001$). El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente con SNV en KRAS ($p = 0,007361$) o en EGFR ($p < 0,0001$). En 16 pacientes (9,47%) se detectaron fusiones genéticas, 9 casos en el gen MET.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lydia.formanti@inibica.es (L. Formanti Alonso).

Conclusiones: Detectamos nuevas asociaciones entre expresión inmunohistoquímica y algunas variantes génicas, que podrían tener impacto en el tratamiento de pacientes de CPNPC.

© 2023 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Anatomía Patológica. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Non-small cell lung cancer; Immunohistochemistry; NGS; EGFR; PD-L1

Study of genetic variants in 169 non-small cell lung cancer patients

Abstract

Introduction: Lung cancer is the leading cause of cancer death in our country. Non-small cell lung cancer (NSCLC) represents the paradigm of personalized medicine. The main objective of this study is analysing the distribution of the most frequently described clinically significant variants in NSCLC, in our environment.

Material and methods: We studied the immunohistochemical expression of TTF1, p40 and PD-L1 and the genetic variants frequency using Next-Generation Sequencing (NGS) with a panel of 52 genes, in 174 NSCLC paraffin-embedded samples in 169 patients (111 men and 52 women) from the province of Cádiz.

Results: The immunohistochemical expression of TTF1, p40 and PD-L1 was positive in 87%, 0% and 46% in adenocarcinoma, and 0%, 100% and 41% in squamous cell carcinoma. In NGS, the most common single nucleotide variants (SNVs) were KRAS (36%), EGFR (14%), BRAF (10%), PIK3CA (8%), and MET (3%). The most frequent copy number variants (CNVs) were amplifications in NF1 (30%), EGFR (18%), CCND1 (9%), MYC (9%) and KRAS (7%). In women, SNV in EGFR are more frequent than in men ($P < .0001$). Adenocarcinoma is the most frequent histological type with SNV in KRAS ($P = .007361$) or in EGFR ($P < .0001$). Gene fusions were detected in 16 patients (9.47%), in 9 cases in the MET gene.

Conclusions: We detected associations, not described so far, between immunohistochemical expression and specific gene variants, which could have an impact on the treatment of NSCLC patients.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Anatomía Patológica. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer, con una estimación de 1,79 millones de muertes por año en todo el mundo¹. La incidencia del cáncer de pulmón está influida por factores ambientales y de estilo de vida, como puede ser el consumo de tabaco y de alcohol, la polución del aire y la dieta. Se ha visto que también existe una susceptibilidad genética, de manera que se describe un riesgo aumentado de desarrollar cáncer de pulmón en fumadores que son portadores de ciertas variantes de genes². El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNPC) y, dentro de este, el adenocarcinoma, es el tipo histológico de cáncer de pulmón más frecuente hoy en día, ya que engloba más del 50% de todos los casos de cáncer de pulmón^{3,4,5}.

En España, la incidencia es de 29.188 casos nuevos, con 22.930 muertes al año, siendo la principal causa de muerte por cáncer¹.

Históricamente, el tratamiento se basaba en distintas combinaciones de fármacos quimioterápicos. Sin embargo, el estudio a nivel molecular del CPNPC ha permitido desarrollar fármacos dirigidos contra dianas terapéuticas concretas, como erlotinib para EGFR y crizotinib para ALK, que han permitido aumentar la supervivencia de estos pacientes⁶. También la inmunoterapia tiene su papel dentro

del abanico terapéutico, pues fármacos como el pembrolizumab permiten el tratamiento en pacientes con alta expresión inmunohistoquímica de PD-L1. Por tanto, a día de hoy, el CPNPC representa el paradigma de la medicina personalizada, y el estudio inmunohistoquímico y molecular se ha vuelto hoy en día un procedimiento de vital importancia antes de decidir cualquier tipo de tratamiento⁷.

En *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) se publicaron los resultados del análisis molecular de 1.144 casos de carcinoma de pulmón (660 adenocarcinomas y 484 carcinomas escamosos), realizando técnicas de secuenciación de ácido desoxirribonucleico (ADN), incluyendo el análisis del número de copias de genes y el análisis proteómico. Se observó que las variantes de un solo nucleótido (SNV) más frecuentes que aparecen en estos tumores están en los genes TP53 (67,7%) y TTN (59,6%). En este estudio se encontraron alteraciones moleculares comunes en el adenocarcinoma y en el carcinoma escamoso de pulmón en solo 6 genes (TP53, RB1, ARID1A, CDKN2A, PIK3CA y NF1), destacando una frecuencia mucho más alta de alteraciones en TP53 (86%), en CDKN2A (16%) y en PIK3CA (11%) en el carcinoma escamoso. En el adenocarcinoma se describieron frecuencias altas de mutaciones en KRAS (32%), EGFR (16%) y MET (4%)⁸.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico, o EGFR, es un receptor tirosín-quinasa que pertenece a la

familia de receptores de clase I⁹. Su activación provoca la proliferación, la diferenciación, la adhesión celular y la protección frente a la apoptosis¹⁰, y también está relacionado con la capacidad invasora tumoral¹¹. Según los datos recogidos en el TCGA, las variantes en el gen EGFR se dan con mayor frecuencia en mujeres (67%) que en hombres (33%)⁸.

Se han identificado otros genes que son relevantes para el tratamiento en el CPNCP. En algunos casos, con eficacia contrastada pero con una baja frecuencia en las variantes (ALK, ROS1), y en otros casos, aunque son variantes que se presentan con mayor frecuencia (KRAS, BRAF, PICK3CA, MET), su impacto terapéutico aún está en estudio o se desconoce¹²⁻¹⁵.

El objetivo principal del presente estudio es analizar la frecuencia observada de las variantes detectadas en el tumor primario en CPNCP en pacientes de la provincia de Cádiz, utilizando un panel de 52 genes, mediante secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS), incluyendo su potencial clasificación terapéutica.

Material y métodos

Se seleccionan pacientes con el diagnóstico de carcinoma de pulmón en el Hospital Universitario Puerta del Mar y en el Hospital Universitario de Jerez de la Frontera mediante una búsqueda, en el sistema de información VitroPath[®], de biopsias, piezas quirúrgicas o citologías, entre octubre de 2020 y abril de 2022, de pacientes con diagnóstico de carcinoma de pulmón, excluyendo el carcinoma de células pequeñas, en las que se hubieran realizado estudio de NGS. Se excluyeron dos casos con diagnósticos de sarcoma indiferenciado de célula pequeña de pulmón y linfoma de Hodgkin de afectación pulmonar.

Se obtuvieron un total de 174 muestras de CPNCP en las que se había realizado NGS. De ellas, se excluyeron 3 muestras en las que el estudio molecular fue no valorable. De esta forma, se obtuvieron resultados técnicamente satisfactorios en la NGS de 171 muestras de 169 pacientes distintos.

El estudio fue aprobado por el comité de ética de investigación clínica (CEIC) de la provincia de Cádiz, con fecha de 25 de septiembre de 2020, número de protocolo 96.20/129-N-20.

Estudio inmunohistoquímico

Se realizó un estudio inmunohistoquímico (IHC) en muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFIP). De cada bloque de parafina se obtuvieron secciones de 3 µm de espesor que se colocaron en portaobjetos Super Frost[®] para tinción IHC estándar.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios, siguiendo las recomendaciones de la OMS^{16,17}:

- TTF1 (Clona SPT24, Master Diagnóstica[®], Granada). Se realizó en 159 muestras. Tiempo de incubación: 24 min. La expresión de este marcador se evaluó como positiva o negativa según su expresión nuclear en las células tumorales.
- P40 (Clona ZR8, Master Diagnóstica[®], Granada). Se realizó en 120 muestras. Tiempo de incubación: 28 min. Su expresión también se evaluó como positiva o negativa, valorando los núcleos de las células tumorales.

- PD-L1 (Clona SP263, Roche Diagnostics, Barcelona). Se estudió la expresión en 157 muestras. Tiempo de incubación: 36 min. Su expresión se evaluó siguiendo la guía de interpretación de «VENTANA PD-L1 (SP263) Assay[®]»¹⁸, indicando el porcentaje de células tumorales con una clara tinción de membrana de cualquier intensidad en la señal del cromógeno. Se agruparon como casos positivos para PD-L1 todos los que tenían expresión igual o mayor del 1% en las células tumorales, y negativos, aquellos con una expresión menor del 1%.

Las técnicas inmunohistoquímicas se automatizaron completamente en un instrumento Roche Ventana BenchMark ULTRA IHC/ISH[®] (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, EE.UU.), utilizando el kit de detección DAB Optiview[®] (Roche Diagnostics, Barcelona).

Extracción de ADN

Los estudios moleculares se realizaron en la Unidad de Gestión Clínica (UGC) de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta del Mar.

Las secciones de tejido se desparafinaron con xileno y alcohol, se hidrolizaron con 4 µl de proteasa por espécimen y se centrifugaron 30 segundos a 10.000 g. El ADN y el ácido ribonucleico (ARN) se extrajeron utilizando el MagMAX[™] FFPE DNA/RNA Ultra Kit[®] (Thermo Fisher Scientific, Texas, EE.UU.), siguiendo el protocolo determinado por el fabricante. La cuantificación fluorométrica se realizó utilizando el fluorómetro Qubit 2.0[®] con los kits *Qubit ds DNA/RNA HS Assay kits[®]* y el kit *Genejet RNA Cleanup and Concentration Micro kit[®]* (Thermo Fisher Scientific, Inc.), siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante y considerándose una concentración apropiada de ácido nucleico cuando fuera mayor de 30 ng/µl.

Preparación de librerías y templado

Las librerías de ADN y ARN se construyeron con los kits *Oncomine[®] Focus Assay*, *Chef-Ready Library* y con *Ion 530[™] kit Chef* (Thermo Fisher Scientific, Texas, EE.UU.), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se utilizaron como mínimo 10 ng de ADN genómico y de ARN por microplaca. Se utilizaron los *Ion Code Barcode[®] (1-8) (DNA)* y *Ion Code Barcode[®] 9-16 (RNA)* para ligarlos y purificarlos para obtener aproximadamente 100 pM. Todos los pasos para la preparación de las librerías y el templado fueron automatizados utilizando *Ion Chef Robot[™]* (Thermo Fisher Scientific, Texas, EE.UU.).

Secuenciación NGS

Se prepararon 8 librerías de ADN y 8 de ARN por carrera en un chip *Ion 530[™]* (Thermo Fisher Scientific, Texas, EE.UU.). Después de cargar el chip, se realizó el análisis de secuencias utilizando el *Ion GeneStudio[™] S5 System* (Thermo Fisher Scientific, Texas, EE.UU.). El panel utilizado fue el *Oncomine[®] Focus Assay (OFA)* (Thermo Fisher Scientific, Texas, EE.UU.), diseñado para cubrir 52 genes, especialmente relevantes en cáncer, incluyendo: 35 genes

Tabla 1 Características de la población de estudio

Característica estudiada	Población estudiada
Edad media (rango)	65,39 años(38 a 86 años)
Hombres: número de casos (frecuencia)	Hombres: 117 (69,23%)
Mujeres: número de casos (frecuencia)	Mujeres: 52 (30,77%)
Adenocarcinoma: número de casos (frecuencia)	134 (79,29%)
Carcinoma escamoso: número de casos (frecuencia)	24 (12,24%)
Carcinoma adenoescamoso: número de casos (frecuencia)	8 (4,70%)
Carcinoma neuroendocrino: número de casos (frecuencia)	2 (1,18%)
Carcinoma PDCG: número de casos (frecuencia)	1 (0,6%)

PDCG: pobremente diferenciado de célula grande.

para SNV (*Hotspot*), e incluyendo en este grupo, además de las SNV, las variantes de múltiples nucleótidos (MNV) y las inserciones o deleciones (INDEL); 19 genes para el estudio de variantes en el número de copias (CNV), y 23 genes para el estudio de fusiones¹⁹.

Análisis bioinformático

Los archivos de secuenciación *Binary Alignment Map* (BAM) se analizaron con el software Ion Reporter™ (Versión 5.16, Thermo Fisher Scientific, Texas, EE.UU.) y se subieron anonimizadas al sistema en la nube del servidor de Ion Reporter™ bajo una licencia institucional (<https://ionreporter.thermofisher.com>). La determinación de las variantes y el análisis de datos se realizaron como describieron Park et al.²⁰. Utilizamos *Fusions-Single Sample workflow*, y el análisis inicial se realizó utilizando *OncoPrint Variant Annotator* en Ion Reporter™.

Para identificar y anotar las variantes de tipo SNV, INDEL y CNV, se aplicaron los siguientes filtros en Ion Reporter™: límite de frecuencia alélica para decidir si es una variante: SNV 0,05, INDEL 0,15, MNV 0,15; cobertura total requerida de lecturas de 500 en SNV, 1.500 lecturas en INDEL y en MNV; proporción de alelos variantes provenientes de una hebra, SNV 0,96, INDEL 0,9; media de los valores absolutos de todas las diferencias pareadas < 0,4; 5% para el intervalo de confianza en ploidias de CNV; 4,5 o más copias más de lo normal para la identificación de CNV para las amplificaciones, y número de copias < 1 para las deleciones. Para la evaluación de CNV solo se incluyeron los casos que mostraban un *Phred Quality Score* de 100.

Para la identificación detallada y la revisión manual de las variantes se seleccionó la opción de *No filter* y se descargaron los archivos *tab-separated values* (TSV) de todas las variantes del *Ion ReporterSystem* y se reanalizaron utilizando Microsoft Excel® (v16.0). Se aplicaron los siguientes filtros adicionales a los aplicados previamente en Ion Reporter™, para la exclusión de las siguientes variantes en SNV: intrónicas o en regiones no traducidas (UTR), las que tienen un valor «sinónimo» en el campo «efecto de la variante», las clasificadas como polimorfismos en la base de datos «UCSC Common SNPs», aquellas que sean clasificadas como «benignas» en ClinVar, y las que tienen una probabilidad de ser variantes reales («p-value») menor de 0,05. En las variantes en CNV no se aplicaron filtros adicionales a los descritos en Ion Reporter™.

Para la clasificación de variantes según su patogenicidad (patogénicas, probablemente patogénicas y variantes de significado incierto o VUS), se utilizó la plataforma OncoKDM® (<https://api.oncokdm.com/>) de la empresa OncoDNA® (Gosselies, Bélgica). Además, también se realizó un estudio bioinformático interno de confirmación utilizando las siguientes bases de datos para estudiar las variantes: dbNSP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), DECIPHER (<https://decipher.sanger.ac.uk/>) y ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Análisis estadístico

Se estudiaron las variables clinicopatológicas por su posible asociación con la presencia de las variantes estudiadas. Las variables categóricas se analizaron mediante el test de Fisher en tablas de contingencia. Las variables numéricas se analizaron utilizando el test de Spearman. Para analizar las asociaciones entre las variables categóricas y numéricas se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon, que compara las diferencias entre las medias. Se consideraron como significativos los valores para un p-valor menor a 0,05. Los datos fueron analizados utilizando el paquete R v.4.1.1 (R Development Core Team).

Resultados

Población estudiada

El estudio incluye 171 muestras de 169 pacientes con CPNPC, incluyendo 52 mujeres (30,77%) y 117 hombres (69,23%). La edad media de los pacientes al diagnóstico de cáncer de pulmón fue de 65,29 años (rango: 38 a 86 años), con una edad media de 63,94 años en mujeres (rango: 43 a 85 años) y de 65,89 años en varones (rango: 38 a 86 años). No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en la edad, al diagnóstico de los pacientes, entre hombres y mujeres ($p=0,2368$).

La **tabla 1** resume las características de la población estudiada.

Estudio histopatológico

El tipo histológico de la neoplasia de pulmón más frecuente fue el adenocarcinoma (79,29%), estando presente en 134 pacientes con una edad media de 64,39 años (rango: 38 a 86 años), seguido de lejos por el carcinoma escamoso en 24 pacientes (14,2%), con una edad media de 68,54 años (rango: 53 a 82 años), el carcinoma adenoescamoso en 8 pacientes (4,70%), con una edad media de 71,62 años (rango: 56 a 84 años) y el carcinoma neuroendocrino de células grandes en 2 pacientes (1,18%) varones de 55 y 65 años. Finalmente, a una paciente (mujer de 68 años) se le diagnosticó carcinoma pobremente diferenciado de célula grande (PDCG) (0,6%). A pesar de que el adenocarcinoma tiene tendencia a presentarse a una edad más joven, mientras que el carcinoma adenoescamoso parece presentarse en pacientes de mayor edad, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,05037$). Tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el sexo entre los distintos tipos histológicos ($p=0,2836$).

De los 134 casos de adenocarcinoma, se realizó un estudio inmunohistoquímico en 125 (93,28%), de los cuales 109 (87,2%) fueron positivos para TTF1. De los 24 casos de carcinoma escamoso, se realizó un estudio inmunohistoquímico en 20 (83,33%), donde la totalidad de estos casos eran positivos para p40 y negativos para TTF1. Los 8 casos de carcinoma adenoescamoso eran positivos tanto para TTF1 como para p40. En el carcinoma neuroendocrino de célula grande, uno de los casos era positivo para TTF1 y negativo para p40, mientras que el otro caso era negativo para ambos marcadores. El único caso de carcinoma pobremente diferenciado de célula grande también fue negativo para los dos marcadores.

Se estudió la expresión de PD-L1 en 131 (97,76%) de los casos de adenocarcinoma, de los cuales 71 (54,20%) casos fueron negativos, 29 (22,13%) casos tuvieron del 1% al 50% de expresión de PD-L1, 14 (10,69%) casos expresaron del 51% al 80% y 17 (12,98%) casos expresaron más del 80% de PD-L1. En los casos de carcinoma escamoso, se estudió la expresión de PD-L1 en 22 (91,67%) pacientes, de los cuales 13 fueron negativos (59,09%), 4 (18,18%) lo expresaban del 1% al 50%, 4 (18,18%) del 51% al 80% y 1 (4,54%) caso expresaba más del 80% de PD-L1. En el carcinoma adenoescamoso, la expresión de PD-L1 se estudió en 7 (87,50%) casos, de los cuales 5 (71,42%) fueron negativos, 1 (14,29%) caso expresó un 50% y el otro caso (14,29%) expresó un 95%. En ambos casos de carcinoma neuroendocrino de célula grande se estudió la expresión de PD-L1, siendo uno negativo y el otro positivo, con una expresión del 95%. En el caso de carcinoma PDCG no pudo estudiarse la expresión de PD-L1. La expresión de PD-L1 no mostró relación estadísticamente significativa con la edad ($p=0,6384$), con el sexo ($p=0,4173$), ni con el tipo histológico ($p=0,8943$).

Estudio molecular mediante *Next Generation Sequencing*

Las variantes más frecuentes del panel de 52 genes estudiados mediante *Next Generation Sequencing* (NGS), encontradas en CPNCP se muestran en la [figura 1](#). De estas variantes, describimos con mayor detalle las encontradas en los genes EGFR, KRAS, BRAF, PIK3CA y MET, ya que son las

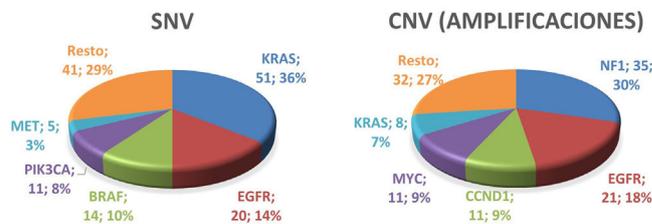


Figura 1 Variantes encontradas con mayor frecuencia (gen; número de casos; frecuencia).

que aparecen en mayor proporción en nuestra población de estudio.

SNV

El estudio de las SNV, realizado en los 169 pacientes, mostró variantes relevantes de este tipo en 108 de ellos (63,91%), siendo 68 hombres (62,96%) y 40 mujeres (37,04%). La edad media de esta población fue de 65,68 años (rango: 43 a 86 años). Se han identificado 142 mutaciones relevantes, incluyendo en este grupo SNV, INDEL y MNV, siendo en su mayoría SNV (130 variantes, 91,55%), seguido de INDEL (9 variantes, 6,34%) y de MNV (3 variantes, 2,11%).

Los genes más frecuentemente afectados por SNV fueron KRAS, EGFR, BRAF, PIK3CA y MET ([fig. 1](#)). Estos cinco genes se vieron afectados por SNV en un total de 89 pacientes (52,66%).

El adenocarcinoma fue el tipo histológico más frecuente en las neoplasias con variantes SNV de KRAS (48 casos, 94,12%), con una diferencia estadísticamente significativa respecto a los tumores sin SNV de KRAS ($p=0,007361$).

En EGFR, se identificaron 20 pacientes con variantes, y en 17 casos (85%) se detectaron en mujeres. La mayor frecuencia de mujeres en los pacientes con variantes SNV en EGFR es estadísticamente significativa ($p<0,0001$) respecto a los casos que no tienen variantes en este gen. Además, el único tipo histológico presente en tumores con SNV de EGFR fue el adenocarcinoma. El resto de los resultados de los genes quedan recogidos en la [tabla 2](#). No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el sexo, en la edad ni en el tipo histológico entre los pacientes con variantes de tipo SNV en los genes BRAF, PIK3CA y MET y los pacientes que no presentan variantes en estos genes.

La expresión inmunohistoquímica de PD-L1 fue significativamente mayor ($p=0,02797$) en las neoplasias que no presentaban variantes en EGFR respecto a las que sí presentaban variantes en ese gen. En el resto de los genes estudiados no se encontró una asociación significativa con la expresión de PD-L1 (KRAS: $p=0,8122$; BRAF: $p=0,7973$; PIK3CA: $p=0,3574$; MET: $p=0,3598$).

CNV

El estudio molecular de CNV se realizó con éxito en 169 pacientes, donde se identificaron 192 variantes relevantes en 95 (56,21%) de estos pacientes, siendo 69 (58,97%) hombres y 26 (50%) mujeres. La edad media de esta población fue de 64,94 años (rango: 46 a 86 años). De las 192 variantes

Tabla 2 Características de la población en las variantes más frecuentes detectadas

Característica / Gen	SNV (SNV + INDEL + MNV)					CNV (deleciones y amplificaciones)					
	KRAS	EGFR	BRAF	PIK3CA	MET	Deleciones (todas)	NF1 AMP	EGFR AMP	CCND1 AMP	MYC AMP	KRAS AMP
Edad media (años)	62,21	67	68,14	67,82	68,2	64,72	65,71	65,43	65	61,45	61.38
Hombres, n (%)	35 (68,6)	3 (15)	8 (87,14)	7 (63,64)	4 (80)	21 (13,21)	28 (17,72)	13 (61,9)	8 (72,7)	8 (72,7)	5 (62,5)
Mujeres, n (%)	16 (31,4)	17 ^a (85)	6 (42,86)	4 (36,66)	1 (20)	7 (9,21)	7 (9,21)	7 (38,1)	3 (27,3)	3 (27,3)	3 (37,5)
Adenocarcinoma, n (%)	48 ^a (94,12)	20 ^a (100)	13 (92,86)	9 (81,82)	4 (80)	23 (82,14)	31 (88,6)	19 (90,5)	7 (63,6)	9 (81,8)	7 (87,5)
Ca escamoso, n (%)	1 (1,96)	0 (0)	1 (7,14)	2 (18,18)	0 (0)	3 (10,71)	2 (5,7)	1 (4,8)	4 (36,4)	2 (18,2)	1 (12,5)
Ca adenoescamoso, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20)	2 (7,14)	2 (5,7)	1 (4,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ca neuroendocrino, n (%)	1 (1,96)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ca PDCG, n (%)	1 (1,96)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Patogénico. Tier I, n (%)	9 (17,65)	13 (65)	4 (28,57)	0 (0)	0 (0)	2 (7,14)	0 (0)	1 (5)	1 (9,09)	1 (9,09)	0 (0)
Patogénico. Tier II, n (%)	38 (74,51)	0 (0)	2 (14,29)	7 (63,64)	0 (0)	2 (7,14)	2 (5,71)	2 (10)	0 (0)	1 (9,09)	0 (0)
Patogénico. Tier III, n (%)	0 (0)	0 (0)	4 (28,57)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Prob. Patogén. Tier II, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10,71)	0 (0)	18 (90)	9 (81,81)	8 (72,73)	0 (0)
Prob. Patogén. Tier III, n (%)	0 (0)	1 (5)	1 (7,14)	1 (9,09)	0 (0)	1 (3,57)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
VUS. Tier III, n (%)	1 (1,96)	5 (25)	2 (14,29)	3 (27,27)	1 (20)	20 (71,43)	33 (94,29)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (100)

^a Resultados estadísticamente significativos.
PDCG: pobremente diferenciado de célula grande; VUS: variante de significado incierto.

Tabla 3 Clasificación de fusiones

Genes	Nº pacientes / Nº muestras	Sexo	Edad media	Tipo histológico	Clasificación
MET	9 / 9	5 hombres / 4 mujeres	63,94 años	Adenocarcinoma	Patogénica Tier I
RET	1 / 1	1 hombre	56 años	Carcinoma adenoescamoso	Patogénica Tier I
AKT3	1 / 1	1 hombre	66 años	Carcinoma escamoso	Patogénica Tier III
ALK	1 / 1	1 hombre	66 años	Adenocarcinoma	Patogénica Tier II
EGFR	1 / 1	1 mujer	67 años	Carcinoma escamoso	Patogénica Tier II
ROS1	1 / 2 ^a	1 mujer	72 años	Adenocarcinoma	Patogénica Tier II
NTRK	1 / 1	1 hombre	72 años	Carcinoma adenoescamoso	Patogénica Tier III
ERG	1 / 2 ^a	1 hombre	68 años	Adenocarcinoma	Patogénica Tier III

^a Dos fusiones detectadas en dos muestras del mismo paciente

detectadas, 28 (14,58%) eran deleciones y 164 (85,42%), amplificaciones.

La [tabla 2](#) recoge las características de los pacientes con CNV.

No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el sexo ($p=0,7387$), en la edad al diagnóstico ($p=0,7599$) ni en el tipo histológico ($p=0,5974$), entre los pacientes que presentaban deleciones y los que no. Los genes que presentaron deleciones con mayor frecuencia fueron JAK2 (4 casos), AR, FGFR1 y KIT (3 casos, cada uno). Solo se detectaron dos deleciones patogénicas de impacto terapéutico «Tier I», en los genes ALK y KIT.

En cuanto a las amplificaciones, se observaron en el 54,7% de los hombres (con una media de 1,84 amplificaciones/paciente) y en el 50% de las mujeres (con una media de 1,77 amplificaciones/paciente). La edad media de estos pacientes fue de 64,72 años (rango: 46 a 84 años). En las neoplasias donde se identificaron amplificaciones, también el adenocarcinoma fue el tipo histológico predominante, con 132 amplificaciones (80,49%), seguido por el carcinoma escamoso (24 amplificaciones, 14,63%), el carcinoma adenoescamoso (5 casos, 3,05%) y el carcinoma neuroendocrino de célula grande (3 amplificaciones, 1,83%).

El gen que presentó amplificaciones con mayor frecuencia fue NF1. La edad media de este grupo de pacientes fue de 65,71 años (rango: 48 a 84 años) ([tabla 1](#)). No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el sexo ($p=0,232$), en la edad ($p=0,3386$) ni en el tipo histológico ($p=0,2009$) entre los pacientes con amplificaciones en NF1 y los que no presentan amplificaciones en este gen. En NF1 se detectaron dos amplificaciones patogénicas (5,71%), ambas clasificadas como «Tier II» en su impacto terapéutico.

El resto de los genes que presentaron amplificaciones quedan recogidos en la [tabla 2](#). No se aprecian diferencias estadísticamente significativas en el sexo, en la edad ni en el tipo histológico entre los pacientes con amplificaciones en los genes EGFR, CCND1, MYC y KRAS y los que no presentan amplificaciones en estos genes.

Fusiones (translocaciones)

En 16 pacientes (9,47%) se detectaron fusiones génicas. La edad media de estos pacientes fue de 63,94 años (rango: 51 a 75 años), siendo 10 (62,5%) hombres y 6 (37,5%) mujeres. Se detectaron un total de 18 fusiones, en EGFR, MET, KT3, ALK, ROS1, NTRK, RET y TMPRSS2:ERG ([tabla 3](#)).

Asociación entre distintos tipos de mutaciones

Se han estudiado las asociaciones entre los distintos tipos de mutaciones. Las asociaciones entre SNV en distintos genes, detectadas en 28 pacientes, quedan reflejadas en la [tabla 4](#).

Las asociaciones entre variantes de tipo SNV y CNV fueron las más frecuentes (57 pacientes), destacando la asociación de SNV en KRAS con CNV en los genes AR, BIRC2, CCND1, CDK4, CDK6, DCUN1D1, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, JAK3 y KRAS; la asociación de SNV en EGFR con CNV en los genes ALK, AR, BIRC2, CCND1, CDK4, EGFR, KIT, MYC y NF1, y la asociación de SNV en PIK3CA con CNV en los genes AR, CDK4, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR3, JAK1, KRAS, MYC y NF1.

Otras asociaciones encontradas fueron entre SNV y fusiones (6 pacientes) y entre CNV y fusiones (10 pacientes). Además, en cinco pacientes se encontraron simultáneamente variantes de tipo SNV, CNV y fusiones.

Discusión

Es importante estudiar las variantes que intervienen en el desarrollo del cáncer de pulmón para poder trabajar en tratamientos efectivos. Los estudios de caracterización molecular indican que las mutaciones en los genes EGFR, PIK3CA, BRAF y KRAS se identifican en el 40% de los casos de CPNCP²¹. En nuestra serie, la frecuencia de alteraciones en esos cuatro genes fue ligeramente mayor, observándose SNV en el 50,89% de los pacientes.

Tabla 4 Asociaciones entre genes con variantes dentro de las SNV

Gen	Segundo gen afectado
BRAF	IDH1
	IDH2
	MET
	PIK3CA
CTNNB1	BRCA1
	RET
	KRAS
	FGFR3
	EGFR
EGFR	EGFR (x3)
	KRAS (x2)
	MTOR
	ERBB2
ERBB2	EGFR
	KRAS
HRAS	APC
	KRAS
	MET
IDH2	CDK4
KRAS	BRAF
	APC
	CDK4
	CTNNB1
	EGFR (x2)
	ERBB2 (x2)
	FBXW7
	FGFR3
	FGFR4
	HRAS
	JAK2
	KIT
	KRAS
	MAP2K1
	MET
PIK3CA	
MET	APC
	BRAF
	HRAS
	KRAS
NRAS	JAK1
	BRAF
PIK3CA	IDH1
	KRAS
	ROS1

Además de los datos disponibles en TCGA (1.144 casos de CPNPC)²²⁻²⁴, en 2018 se realizó un estudio, llamado *Thoracic Tumors Registry* (TTR), que incluyó 6.600 pacientes con CPNPC provenientes de 56 hospitales españoles²⁵. En ambas series, la edad media de los pacientes (66,37 y 64 años, respectivamente) fue muy similar a la de nuestra serie (65,29 años). El porcentaje de hombres en TCGA (58,8%) fue algo menor que en TTR y en nuestra serie (73,4% y 69,23%, respectivamente). La mayor proporción de adenocarcinoma fue aún más marcada en nuestra serie (79,29%) que en TCGA o en TTR (57,69% y 63,8%, respectivamente).

El panel de NGS utilizado en nuestra serie se centra en alteraciones moleculares con posible impacto terapéutico y no incluye las SNV más frecuentes detectadas en CPNPC en TCGA (TP53 y TTN)²⁴. La frecuencia de alteraciones de tipo SNV fue algo superior en nuestra serie y en TTR, respecto a TCGA, en los genes KRAS (35,9% y 28,4%, respectivamente, frente al 19,4%) y EGFR (14,1% y 18,1%, respectivamente, frente al 10,2%), debido a la mayor proporción de adenocarcinoma en ambas series. En otros genes, como BRAF, la frecuencia era similar en nuestra serie (9,86%) y en TCGA (6,1%), pero menor en TTR (3,3%). No se describen las alteraciones de PIK3CA ni MET en TTR, pero en nuestra serie (7,75%, 3,52%) y en TCGA (8,2%, 3%) presentaron proporciones muy parecidas.

Las mutaciones SNV en KRAS y en EGFR fueron mutaciones muy raras en el carcinoma escamoso, en TCGA (3,60% y 11,1%, respectivamente) y aún más infrecuentes en nuestra serie (1,96% y 0%, respectivamente). En TTR no se realizó el análisis molecular por tipo histológico.

En las CNV, la frecuencia de deleciones en nuestra serie fue similar a las encontradas en TCGA, predominando la afectación de los genes JAK2 (en torno al 2,5% en ambas series), AR (entre el 0,8% y el 1,8%, respectivamente), FGFR1 (entre el 1% y el 1,8%, respectivamente) y KIT (>0,1% en TCGA y un solo caso «Tier I» en nuestra serie). TCGA no recoge ninguna CNV de tipo deleción en ALK, pero en nuestra serie detectamos un caso de esta variante con impacto terapéutico significativo, que hasta la fecha es la primera descrita en la literatura. En TTR, no se detectaron deleciones.

La frecuencia global de las amplificaciones de nuestra serie fue superior a las observadas en TCGA, sobre todo en el gen NF1, con un 21,34% en nuestra serie frente a un 0,5% en TCGA. Por ello, es importante filtrar solo las variantes que tienen impacto terapéutico, que en nuestra serie solo fueron 2 casos clasificados como «patogénico, Tier II» en el gen NF1 (1,18%) y un caso clasificado como «patogénico, Tier I» en EGFR (0,59% en nuestra serie, frente al 6% en TCGA). La frecuencia global de otros genes (incluyendo su clasificación desde VUS hasta patogénicas) sí fue similar a la descrita en TCGA, como en CCND1 (7,80% TCGA, 6,71% nuestra serie) y en KRAS (5,10% TCGA, 4,88% nuestra serie). En otros genes, como FGFR1, la frecuencia de amplificaciones en nuestra serie fue muy inferior (3,66%) a las de TCGA y TTR (8,9% y 7,7%, respectivamente), mientras que en MET las frecuencias de amplificaciones fueron algo superiores en TTR (7,10%) respecto a TCGA (1,70%) y a nuestra serie (3,66%).

En cuanto a las fusiones, en TCGA y en TTR se han detectado en ALK (2%-11,4%), ROS1 (3%-4,3%) y RET (1%-2,3%). En nuestra serie, las fusiones en los genes ALK (0,59%) y ROS1 (1,18%) se detectaron en una menor proporción. Hay fusiones en otros genes en nuestra serie que no vienen recogidas en TTR, como MET (5,33%) o EGFR (0,59%)²²⁻²⁴.

Las fusiones descritas en la literatura de MET suelen ser con los genes CD47, KIF5B y STARD3NL^{2,3}. Se han descrito fusiones del gen EGFR con RAD51 y SHC1⁴.

En este estudio hemos encontrado la fusión de TMPRSS2:ERG, que es característica del carcinoma de próstata. En la literatura se ha descrito dicha mutación en un paciente con carcinoma de próstata y de pulmón concomitante, aunque finalmente el carcinoma de pulmón se consideró metástasis del de próstata debido a esta

mutación²⁶. Sin embargo, en nuestro estudio el paciente no tenía carcinoma de próstata.

No se ha establecido ninguna asociación estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes y la alteración genética detectada, pero sí se ha observado relación entre el sexo de los pacientes y las alteraciones en EGFR, donde, como describe la bibliografía⁸, las mujeres tienen mayor predisposición a presentar variantes en este gen. También se han detectado asociaciones entre el tipo histológico y las variantes SNV en KRAS y EGFR, pues las alteraciones en KRAS se encuentran en mayor proporción en el adenocarcinoma, y en EGFR, en nuestra serie, solo se han encontrado alteraciones moleculares en el adenocarcinoma⁸.

Aunque existe bibliografía contradictoria al respecto, se ha descrito una relación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de PD-L1 y los tumores con mutación en el gen EGFR, al igual que en los resultados de nuestro estudio. Aunque en la literatura se ha encontrado relación entre la expresión de PD-L1 y el sexo o el subtipo histológico^{27,28}, en nuestro trabajo no hemos podido confirmar estos hallazgos.

La existencia de más de una mutación en el mismo tumor es especialmente relevante hoy día en cáncer de pulmón de célula no pequeña, pues estas asociaciones tienen implicaciones terapéuticas y pronósticas. En la serie de Martorell et al.²⁹ de 326 pacientes de CPNPC, el 12% de los casos con estadio IV tenían múltiples mutaciones, destacando la coexistencia de SNV de EGFR con reordenamientos en ALK y con otras SNV en KRAS, BRAF y PIK3CA. Un ejemplo de la importancia de estas asociaciones es la coexistencia de SNV en EGFR con mutaciones en el exón 14 de MET y con amplificaciones de MET (tres casos en nuestra serie), que se asocian con una resistencia a los inhibidores EGFR³⁰.

Una de las limitaciones de este estudio es el sesgo de selección de los pacientes a los que se realizan estudios de secuenciación masiva, por lo que la distribución de algunas variables clínicas y anatomopatológicas, como el tipo histológico, no corresponden a su frecuencia real en los pacientes de cáncer de pulmón.

El panel de NGS utilizado en este estudio solo estudia las áreas de interés o *hotspots* en las SNV. En general, los paneles utilizados en la práctica clínica se centran, sobre todo, en aquellos genes que se asocian con posibles dianas terapéuticas conocidas hasta la fecha, para lo cual es necesario saber qué genes se examinan solo en las áreas más significativas (*hotspots*) y qué genes son secuenciados completamente por el panel³¹.

La utilización de las técnicas de NGS en los departamentos de anatomía patológica ha demostrado ser más coste-eficiente que las estrategias basadas en la determinación secuencial de estudios moleculares mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)^{32,33}.

Conclusiones

En este estudio hemos realizado un examen exhaustivo de las variantes génicas encontradas en los pacientes de carcinoma de pulmón de células no pequeñas de la provincia de Cádiz. Creemos que estos datos son muy relevantes para ampliar el estudio de las posibles variables génicas que pueden encontrarse en pacientes con CPNPC, pues es el primero

que se realiza de estas características en la provincia. De hecho, hemos obtenido datos no descritos con anterioridad en la literatura, como la delección en ALK, o la fusión de TMPRSS2:ERG. La descripción de nuevas variantes génicas ayudará a desarrollar nuevos tratamientos para el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Responsabilidades éticas

Este trabajo es un estudio retrospectivo que no implica modificación en el manejo clínico de los pacientes seleccionados. Se ha seguido la legislación española y europea de protección de datos y de investigación biomédica, así como los principios éticos de la Declaración de Helsinki, en su versión más reciente.

Financiación

El presente trabajo ha sido financiado parcialmente por la Convocatoria de Ayudas del Sistema Andaluz del Conocimiento para la Contratación de Jóvenes Investigadores y Personal Técnico de Apoyo de I+D+I, número de expediente: ACOJIN21-06, y la Convocatoria ITI Cádiz con Fondos FEDER, número de expediente PI-0032-2017.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. GLOBOCAN, 2022 [consultado 22 Dic 2022]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/>
2. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: Epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:584–94 <https://doi.org/10.4065/83.5.584>
3. Mitchell PLR, John T. Lung cancer in 2016: Immunotherapy comes of age. *Lancet Respir Med.* 2016;4:947–9 [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)30379-4](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)30379-4)
4. Li F, Teng H, Liu M, Liu B, Zhang D, Xu Z, et al. Prognostic value of immune-related genes in the tumor micro-environment of bladder cancer. *Front Oncol.* 2020;10:1302 <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01302>
5. Succony L, Rassl DM, Barker AP, McCaughan FM, Rintoul RC. Adenocarcinoma spectrum lesions of the lung: Detection, pathology and treatment strategies. *Cancer Treat Rev.* 2021;99:102237 <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102237>
6. Shah DR, Masters GA. Precision medicine in lung cancer treatment. *Surg Oncol Clin N Am.* 2020;29:15–21 <https://doi.org/10.1016/j.soc.2019.08.002>
7. Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F. Anti-PD1/PD-L1 immunotherapy for non-small cell lung cancer with actionable oncogenic driver mutations. *Int J Mol Sci.* 2021;22:6288 <https://doi.org/10.3390/ijms22126288>
8. Campbell JD, Alexandrov A, Kim J, Wala J, Berger AH, Pedamallu CS, et al. Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2016;48:607–16 [consultado 15 May 2023]. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ng.3564>. https://www.cbioportal.org/study/summary?id=nscl_tcga_broad_2016

9. Altuna Mariezkurrena X, Algaba Guimerá J, Wang Rodríguez J, Weisman R, Ongkeko W. Estudio por inmunohistoquímica de la expresión de EGFR en carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2005;56:143–6 [https://doi.org/10.1016/S0001-6519\(05\)78589-7](https://doi.org/10.1016/S0001-6519(05)78589-7)
10. Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;10:4227s–32s <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-040007>
11. Prieto Sánchez ME, León Fradejas M, Bautista Ojeda MD. c-kit y EGFR. Alteraciones moleculares de valor pronóstico en el cáncer de pulmón. *Rev Esp Patol.* 2007;40:23–31 [https://doi.org/10.1016/S1699-8855\(07\)70052-1](https://doi.org/10.1016/S1699-8855(07)70052-1)
12. Dankner M, Rose AAN, Rajkumar S, Siegel PM, Watson IR. Classifying BRAF alterations in cancer: New rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene.* 2018;37:3183–99 <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0171-x>
13. Yang Y, Shen S, Sun Y, Husain H, Zhou H, Lu S, et al. The relationship between different subtypes of KRAS and PD-L1 & tumor mutation burden (TMB) based on next-generation sequencing (NGS) detection in Chinese lung cancer patients. *Transl Lung Cancer Res.* 2022;11:213–23 <https://doi.org/10.21037/tlcr-22-88>
14. Wang Y, Wang Y, Li J, Li J, Che G. Clinical significance of PIK3CA gene in non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Biomed Res Int.* 2020;2020:3608241 <https://doi.org/10.1155/2020/3608241>
15. Reis D, Marques C, Dias M, Campinha S, Cirnes L, Barroso A. Mutational profile of non-small cell lung cancer patients: Use of next-generation sequencing. *Pulmonology.* 2020;26:50–3 <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2019.05.003>
16. **Classification of Tumours Editorial Board Thoracic Tumours. WHO Classification of Tumours. 5th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2021.**
17. López-Ríos F, Paz-Ares L, Sanz J, Isla D, Pijuan L, Felip E, et al. Actualización de las recomendaciones para la determinación de biomarcadores predictivos en el carcinoma de pulmón de célula no pequeña avanzado. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica. *Rev Esp Patol.* 2020;53:167–81 <https://doi.org/10.1016/j.patol.2019.11.004>
18. Roche. Ventana Medical Systems, Inc. VENTANA PD-L1 (SP263) Assay Staining of Non-Small Cell Lung Cancer. Interpretation Guide, 2019 [consultado 15 Nov 2022]. Disponible en: https://www.rochebiomarkers.be/content/media/Files/PD-L1_SP263_interpretation_guide_NSCLC.pdf
19. Thermo Fisher Scientific. OncoPrint® Focus Assay (OFA). 2022 [consultado 15 Nov 2022]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/clinical/preclinical-companion-diagnostic-development/oncomine-oncology/oncomine-focus-assay.html>
20. Park J, Sang ILL, Shin S, Hong JHEE, Yoo HMO, Kim JGOO. Genetic profiling of somatic alterations by OncoPrint Focus Assay in Korean patients with advanced gastric cancer. *Oncol Lett.* 2020;20:1–10 <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11990>
21. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: Analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol.* 2005;23:857–65 <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.08.043>
22. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, 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;350:2129–39 <https://doi.org/10.1161/01.res.37.6.733>
23. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2:401–4 <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0095>
24. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6:pl1 <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
25. Provencio M, Carcereny E, Rodríguez-Abreu D, López-Castro R, Guirado M, Camps C, et al. Lung cancer in Spain: Information from the Thoracic Tumors Registry (TTR study). *Transl Lung Cancer Res.* 2019;8:461–75 <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.08.05>
26. Giunchi F, Massari F, Altimari A, Gruppioni E, Nobili E, Fiorentino M, et al. Dual TMRSS2:ERG fusion in a patient with lung and prostate cancers. *Diagnostics (Basel).* 2020;10:1109 <https://doi.org/10.3390/diagnostics10121109>
27. Zhang M, Li G, Wang Y, Wang Y, Zhao S, Haihong P, et al. PD-L1 expression in lung cancer and its correlation with driver mutations: A meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7:10255 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10925-7>
28. Dantoing E, Piton N, Salaün M, Thiberville L, Guisier F. Anti-PD1/PD-L1 immunotherapy for non-small cell lung cancer with actionable oncogenic driver mutations. *Int J Mol Sci.* 2021;22:6288 <https://doi.org/10.3390/ijms22126288>
29. Martín Martorell P, Huerta M, Compañ Quilis A, Abellán R, Seda E, Blesa S, et al. Coexistence of EGFR, KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations and ALK rearrangement in a comprehensive cohort of 326 consecutive Spanish nonsquamous NSCLC patients. *Clin Lung Cancer.* 2017;18:e395–402 <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2017.04.006>
30. Rachiglio AM, Fenizia F, Piccirillo MC, Galetta D, Crinò L, Vincenzi B, et al. The presence of concomitant mutations affects the activity of EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancers (Basel).* 2019;11:341 <https://doi.org/10.3390/cancers11030341>
31. Cainap C, Balacescu O, Cainap SS, Pop LA. Next generation sequencing technology in lung cancer diagnosis. *Biology (Basel).* 2021;10:864 <https://doi.org/10.3390/biology10090864>
32. Arriola E, Bernabé R, Campelo RG, Biscuola M, Enguita AB, López-Ríos F, et al. Cost-effectiveness of next-generation sequencing versus single-gene testing for the molecular diagnosis of patients with metastatic non-small-cell lung cancer from the perspective of Spanish reference centers. *JCO Precis Oncol.* 2023;7:e2200546.
33. Vanderpoel J, Stevens AL, Emond B, Lafeuille MH, Hiltz A, Lefebvre P, et al. Total cost of testing for genomic alterations associated with next-generation sequencing versus polymerase chain reaction testing strategies among patients with metastatic non-small cell lung cancer. *J Med Econ.* 2022;25:457–68 <https://doi.org/10.1080/13696998.2022.2053403>