

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús estableties per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Departamento de Medicina
Programa de Doctorado en Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

**ESTUDIOS FARMACOGENÉTICOS Y FACTORES PRONÓSTICOS
EN EL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO**

Tesis doctoral

Ivana Sullivan

Directores:

Dr. Agustí Barnadas Molins

Dra. Juliana Salazar Blanco

Tutora:

Dra. Montserrat Estorch Cabrera

Servicios de Genética y de Oncología Médica
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Barcelona, 2017

El **Dr. Agustí Barnadas Molins** y la **Dra. Juliana Salazar Blanco**, en calidad de directores, y la **Dra. Montserrat Estorch Cabrera**, en calidad de tutora, certifican que:

- **Ivana Sullivan** ha realizado bajo su dirección y tutela la presente tesis doctoral: **“Estudios farmacogenéticos y factores pronósticos en el cáncer de pulmón no microcítico”** y que es apta para su defensa delante de un tribunal para optar al título de Doctor en la Universitat Autònoma de Barcelona.
- Este trabajo ha estado realizado en los Servicios de Genética y de Oncología Médica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

Dr. A. Barnadas Molins/Dra. J. Salazar Blanco

Directores

Dra. M. Estorch Cabrera

Tutora

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración desinteresada de muchas personas que han puesto su tiempo, sus conocimientos y su apoyo a mi disposición.

En primer lugar, me gustaría mostrar mi profundo agradecimiento a mis directores de tesis. Al Dr. Agustí Barnadas por depositar en mí su confianza y permitirme abrir y desarrollar una línea de investigación en Cáncer de Pulmón. A la Dra. Juliana Salazar por introducirme en el mundo del laboratorio y estar siempre a mi lado en cada proyecto.

A la Dra. Montserrat Baiget, por darme la oportunidad de entrar en el apasionante mundo de la investigación y por todo lo que me han enseñado a lo largo de estos años. Sin su aprobación no lo hubiese logrado.

A la Dra. Margarita Majem y Cinta Pallarés por ser mis mentoras y enseñarme a vivir con pasión esta patología.

A la Dra. Montserrat Estorch por aceptar amablemente ser la tutora de esta tesis.

A mis amigas y compañeras de laboratorio por tantas horas maravillosas a nivel personal y profesional. Especialmente a Elisabeth del Río por estar siempre dispuesta a ayudar en todos los proyectos, dedicarme tiempo y sobre todo por su paciencia.

Al Dr. David Páez y la Dra. Ana Sebio, por ser mis guías y ejemplos a seguir.

A Carmen Alonso, por su constante presencia y apoyo.

Gracias a todos mis compañeros de Oncología Médica, en especial a Cristina Arquerros y Marta Andrés, por contribuir de forma activa en los proyectos.

A los compañeros del Servicio de Genética por su buen humor, vitalidad y soporte, y sobre todo por su gran profesionalidad.

A mis padres y a mi hermano, con quienes pese a los más de 12.000 km que nos separan, he podido compartir cada uno de mis logros.

De forma especial a Toño, por haber sido mi soporte, mi aliento y sobre todo por su incondicional paciencia.

Finalmente, gracias a los pacientes y al mundo de la Oncología.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la ayuda del Instituto de Salud Carlos III que me otorgó un contrato Rio Hortega (CM13/00117).

A mis padres y mi hermano.

A Toño.

*“Science never solves a problem
without creating ten more”*

George Bernard Shaw

TABLA DE ABREVIACIONES

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALK	Del inglés, <i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
ARN	Ácido ribonucleico
BER	Del inglés, <i>Base Excision Repair</i>
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico
EBUS	Del inglés, <i>Endobronchial Ultrasound</i>
ECOG	Del inglés, <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGFR	Del inglés, <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EUS	Del inglés, <i>Endoscopic Ultrasound</i>
EMA	Del inglés, <i>European Medicines Agency</i>
ERCC1	Del inglés, <i>Excision Repair Cross Complementing 1</i>
ERCC2	Del inglés, <i>Excision Repair Cross Complementing 2</i>
ERCC3	Del inglés, <i>Excision Repair Cross Complementing 3</i>
ERCC4	Del inglés, <i>Excision Repair Cross Complementing 4</i>
ERCC5	Del inglés, <i>Excision Repair Cross Complementing 5</i>
FDA	Del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
FGFR	Del inglés, <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FLT1	Del inglés, <i>Fms-Like Tyrosine kinase 1</i>
IASLC	Del inglés, <i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
ITQ	Inhibidores de Tirosina Quinasa
KRAS	Del inglés, <i>Kirsten Rat Sarcoma</i>
NER	Del inglés, <i>Nucleotide Excision Repair</i>
PAHs	Del inglés, <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
PDGFR	Del inglés, <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PIK3C2A	Del inglés, <i>Phosphatidylinositol-4-Phosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Type 2 Alpha</i>
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
SNP	Del inglés, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TEMLA	Del inglés, <i>Transcervical Extended Mediastinal Lymphadenectomy</i>
TNM	Del inglés, <i>Tumor, Node, Metastasis</i>
TP53	Del inglés, <i>Tumor Protein p53</i>
VAMLA	Del inglés, <i>Video-Assisted Mediastinoscopic Lymphadenectomy</i>
VEGF	Del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	Del inglés, <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
XPA	Del inglés, <i>Xeroderma Pigmentosum Group A</i>
XRCC1	Del inglés, <i>X-ray Repair Cross Complementing protein 1</i>
XRCC2	Del inglés, <i>X-ray Repair Cross Complementing protein 2</i>

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El cáncer de pulmón

1.1.1.- Epidemiología	16
1.1.2.- Etiología: factores medioambientales	18
1.1.3.- Clasificación histológica del cáncer de pulmón	22
1.1.4.- Diagnóstico y estadificación	24
1.1.4.1.- Diagnóstico	24
1.1.4.2.- Estadificación	28
1.1.5.- Factores pronósticos y predictivos	32
1.1.5.1.- Factores pronósticos clínicos	32
1.1.5.2.- Factores predictivos moleculares	33
1.1.6.- Tratamiento de la enfermedad localizada	35
1.1.6.1.- Cirugía	35
1.1.6.2.- Tratamiento peri-operatorio	38
1.1.6.2.1.- Tratamiento neoadyuvante	38
1.1.6.2.2.- Tratamiento adyuvante	39
1.1.7.- Tratamiento de la enfermedad localmente avanzada/irresecable . . .	39
1.1.8.-Tratamiento de la enfermedad diseminada o metastásica	40

1.2.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer de pulmón

1.2.1.- Farmacogenética del tratamiento con derivados del platino	43
1.2.1.1.- Polimorfismos en genes de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (<i>NER, Nucleotide Excision Repair</i>)	44

1.2.1.2.- Polimorfismos en genes de la vía de reparación por escisión de bases (<i>BER, Base Excision Repair</i>)	48
1.2.2.- Farmacogenética del tratamiento quimio-radioterápico	49
1.3.- La vía del factor de crecimiento endotelial vascular (<i>VEGF</i>): valor pronóstico y/o predictivo de sus componentes	50
2.- OBJETIVOS	55
3.- RESULTADOS	
3.1.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer de pulmón no microcítico avanzado/metastásico	
3.1.1.- <i>“Pharmacogenetics of the DNA repair pathways in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy”</i>	59
3.2.- Estudio de la vía del <i>VEGF</i> en el cáncer de pulmón no microcítico resecable	
3.2.1.- <i>“KRAS genetic variant as a prognostic factor for recurrence in resectable non-small cell lung cancer”</i>	71
4.- DISCUSIÓN	
4.1.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer de pulmón no microcítico avanzado/metastásico	85
4.2.- Estudio de la vía del <i>VEGF</i> en el cáncer de pulmón no microcítico resecable	89
5.- CONCLUSIONES	95
6.- BIBLIOGRAFÍA	99

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- El cáncer de pulmón

1.1.1.- Epidemiología

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en ambos sexos, responsable de casi una de cada cinco muertes en 2012¹ (Figura 1). El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa aproximadamente el 90% de los diagnósticos de cáncer de pulmón y alrededor de dos tercios de los pacientes son diagnosticados en una etapa avanzada de la enfermedad.² Su pronóstico global es pobre con una supervivencia a los 5 años entorno al 15%.

En España, los tumores más frecuentemente diagnosticados para la población general en el año 2012 fueron el cáncer de colon (32.240 casos nuevos), seguido del cáncer de próstata (27.853 casos nuevos), pulmón (26.715 casos nuevos), mama (25.215 casos nuevos) y vejiga (13.789 casos nuevos). Sin embargo, si fragmentamos la incidencia de los distintos tumores por sexo, los casos que más frecuentemente se diagnosticaron en varones fueron el cáncer de próstata (27.853 casos nuevos), el cáncer de pulmón (21.780 casos nuevos), el cáncer de colon (19.261 casos nuevos), el cáncer de vejiga (11.584 casos nuevos) y el cáncer gástrico (4.866 casos nuevos). En mujeres, los tumores más frecuentemente diagnosticados fueron, por este orden, el cáncer de mama (25.215 casos nuevos), colon (12.979 casos nuevos), útero (5.121 casos nuevos), pulmón (4.935 casos nuevos) y ovario (3.236 casos nuevos) (Figura 2).¹

La incidencia de algunos tumores ha aumentado de forma progresiva en los últimos años, y se prevé que aumente aún más en los siguientes. Esta circunstancia parece fiel reflejo no sólo del aumento de la población, sino del envejecimiento de la misma (aumento del riesgo acumulado, de la acumulación de factores de riesgo y descenso de los mecanismos de reparación celular) así como por el empleo generalizado de las técnicas de detección precoz.

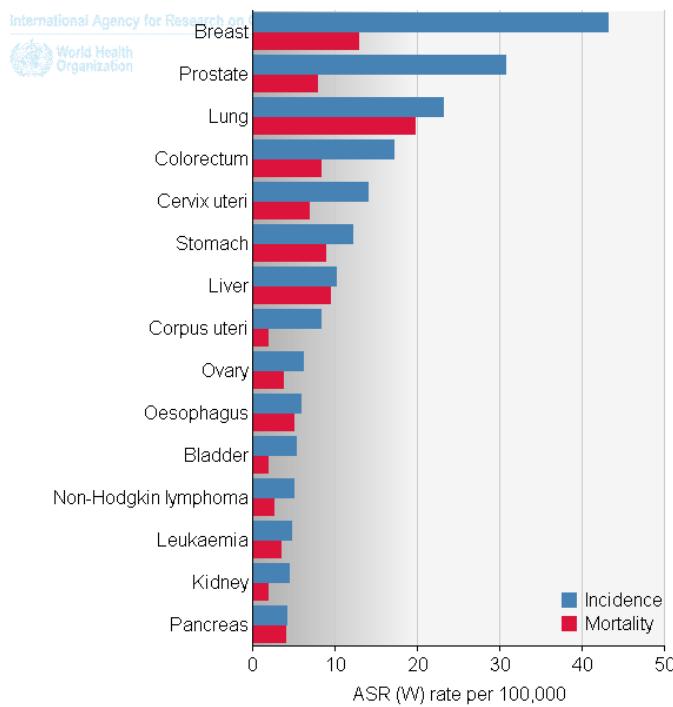


Figura 1.- Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial (ambos sexos). Datos de GLOBOCAN 2012.

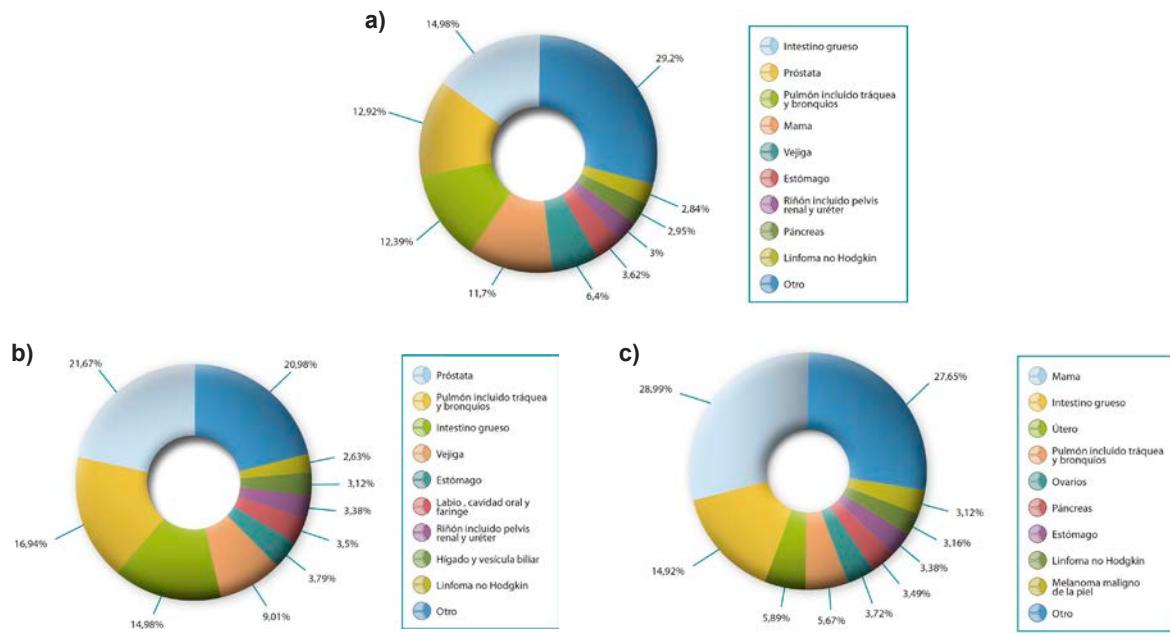


Figura 2.- Incidencia de los distintos tipos de cáncer en España. **a)** Ambos sexos **b)** Varones **c)** Mujeres. Datos de GLOBOCAN 2012.

1.1.2.- Etiología: factores medioambientales

El cáncer de pulmón se ha asociado a múltiples factores ambientales y estilos de vida, destacando el hábito tabáquico como el principal factor de riesgo para desarrollarlo. A continuación, se comentan los principales factores de riesgo.

Tabaco

Es el principal factor de riesgo para desarrollar un cáncer de pulmón (80-90% de todos los casos).³ El riesgo de padecer un cáncer de pulmón depende del número de cigarrillos fumados y de la duración del hábito tabáquico. En fumadores activos de un paquete al día durante 40 años, el riesgo es 20 veces superior comparado con el de una persona no fumadora. Asimismo, el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en aquellas personas que cesan el hábito tabáquico disminuirá gradualmente a lo largo de unos 15 años, pero este riesgo nunca se igualará y se mantendrá todavía superior al de un individuo no fumador.^{4,5} Se recomienda el cese del hábito tabáquico en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón en estadios iniciales ya que se ha demostrado mayor beneficio en los tratamientos oncológicos, disminución de las comorbilidades, de las recurrencias y de los segundos tumores primarios.⁶ Por otro lado, la reducción del número de cigarrillos fumados sin el cese total, parece tener algún efecto positivo en la reducción del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón.⁷ Los no fumadores expuestos a altos niveles de tabaco (fumadores pasivos) presentan un riesgo mayor de padecer un cáncer de pulmón comparado con los que se han expuesto a niveles bajos.⁸ La complejidad de la composición del tabaco, con más de 3000 compuestos químicos, ha dificultado una exhaustiva identificación de los agentes carcinógenos. Más de 60 compuestos pueden ser potencialmente carcinógenos y alrededor de 20 agentes han sido confirmados como carcinogénicos.⁹ Entre ellos, los hidrocarburos aromáticos polinucleares (*PAHs*) son los más estudiados, siendo el benzo(a)pireno el primero en ser detectado y en estar relacionado con el desarrollo de mutaciones en el gen supresor de tumores *TP53*.¹⁰ Otros compuestos son las N-nitrosaminas que pueden

inducir tumores de pulmón en ratones, las aminas aromáticas, los benzenos, el arsénico y el acetaldehído.

El tabaco produce sobre el tejido bronquial de pacientes fumadores la formación de aductos de ADN que conduce a replicaciones erróneas y mutaciones. Los niveles de aductos se correlacionan con la exposición tabáquica.

Polución ambiental

En los países industrializados otros agentes contaminantes ambientales han sido estudiados como posibles causas de cáncer de pulmón. Entre ellos destacan los hidrocarburos policíclicos relacionados con el uso de combustibles fósiles que se emiten en centrales eléctricas, industrias, tubos de escape de automoción, etc. La relación de las tasas de mortalidad por cáncer de pulmón ajustadas a la edad en zonas urbanas y rurales varía entre 1.1 y 2.0. Al existir una mezcla compleja de productos químicos que interactúan entre sí, así como la exposición activa o pasiva del tabaco, es complicado identificar el “factor urbano” como una causa independiente de cáncer de pulmón. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la exposición a la polución ambiental se asocia a la disminución de la función respiratoria, mayores tasas de ingreso hospitalario por patología respiratoria y aumento de la tasa de mortalidad por enfermedades cardiopulmonares.¹¹ Estudios recientes han demostrado asociación entre cáncer de pulmón y exposición al humo desprendido del tubo de escape de motores diésel.¹²

Radón

Se trata de un gas que proviene de la desintegración de uranio-238 y radio-226 con alta capacidad para dañar el epitelio de la vía respiratoria a partir de la emisión de partículas alfa. Se ha observado un efecto sinérgico entre la exposición al radón y el hábito tabáquico.¹³ Es posible encontrar radón en las rocas, suelo e incluso en aguas subterráneas, sin embargo, los resultados de los estudios que correlacionan la exposición al radón en los hogares y el cáncer de pulmón son contradictorios.^{14,15}

Asbesto

La asociación entre la exposición al asbesto y cáncer de pulmón ha sido establecida a través de estudios epidemiológicos.^{16,17} La exposición al asbesto puede dividirse en ocupacional (productos comerciales) y no ocupacional (edificios que contienen asbesto). Para la exposición ocupacional existen datos que confirman un elevado riesgo, pero no ocurre lo mismo en el caso de la exposición no ocupacional.¹⁸ Dicho riesgo depende de la dosis y del tipo de fibra de asbesto. En general, las neoplasias broncopulmonares inducidas por asbesto suelen aparecer en la periferia y en los lóbulos inferiores pulmonares.

El aumento del riesgo de padecer cáncer de pulmón por asbesto, se magnifica con el hábito tabáquico. En un estudio se objetivó que el riesgo aumentaba 6 veces con la exposición al asbesto y sin exposición tabáquica, 11 veces con la exposición tabáquica, pero sin historia de exposición al asbesto y 59 veces con la exposición a ambos.¹⁹

Una exposición prolongada a fibras de asbesto produce acumulación de macrófagos y células inflamatorias en los alvéolos, lo que se acompaña de producción de radicales libres, peroxidación de membranas celulares y daño en el ADN.²⁰

Factores dietéticos

Diversos estudios epidemiológicos han puesto en evidencia la influencia de excesos o deficiencias dietéticas sobre el desarrollo de cáncer de pulmón. La asociación más consistente es que el alto consumo de frutas y verduras frescas disminuye la incidencia de cáncer de pulmón entre fumadores, no fumadores o exfumadores para cualquier subtipo histológico.²¹

Distintos compuestos antioxidantes se han considerado como nutrientes potencialmente quimiopreventivos, especialmente los β-carotenos; sin embargo, los datos no han sido concluyentes.²²

Por otro lado, los flavonoides (cítricos, cebollas, vino tinto, chocolate negro,

etc.) y los vegetales crucíferos (col, brócoli, etc.) parecen tener un efecto protector, aunque al tratarse de estudios con poca casuística los datos no alcanzan la suficiente potencia estadística.^{23,24} También se ha investigado acerca de las vitaminas del grupo B, pero sin resultados definitivos.²⁵

Se ha descrito un aumento de riesgo de cáncer de pulmón en personas con dietas ricas en colesterol y grasas saturadas.²⁶ No obstante, un elevado índice de masa corporal no se ha asociado al desarrollo de cáncer de pulmón.²⁷

Patología inflamatoria y benigna pulmonar

Se ha asociado un aumento de riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en pacientes con patología benigna pulmonar e inflamación crónica como el antecedente de bronquitis crónica y procesos infecciosos tipo neumonía y tuberculosis. Esta relación se da en todas las histologías de cáncer de pulmón y el riesgo es similar en fumadores, no fumadores y exfumadores.²⁸

Radioterapia

El antecedente de tratamiento con radioterapia por otros tumores, como el cáncer de mama, puede aumentar el riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón.²⁹

Factores genéticos

El papel de los factores genéticos como causa de cáncer de pulmón no está claro. Varios estudios sugieren que individuos con familiares de primer grado con cáncer de pulmón, tienen un riesgo más elevado de desarrollarlo también, independientemente de la edad, sexo y hábito tabáquico.³⁰ Sin embargo, las bases moleculares de este riesgo familiar no están claramente identificadas ni definidas, aunque se cree que existe una interacción entre factores ambientales y genéticos.

1.1.3.- Clasificación histológica del cáncer de pulmón

La clasificación del cáncer de pulmón por subtipos histopatológicos es la base fundamental para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad.

La clasificación por subtipos histológicos fue publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2004. Sin embargo, fue en el año 2011 que un panel multidisciplinar representado por la *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, la *American Thoracic Society (ATS)* y la *European Respiratory Society (ERS)* propuso una revisión del sistema de clasificación,³¹ posteriormente actualizada en el año 2015.³² La Tabla 1 muestra un resumen de dicha clasificación.

Dentro de los tumores epiteliales, el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) supone aproximadamente el 90% de todos los casos e incluye fundamentalmente los siguientes subtipos histológicos: epidermoide o escamoso, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. A su presentación, sólo el 25% son estadios localizados, y un 35% corresponden a estadios localmente avanzados (estadios III). Aproximadamente el 80% de los pacientes con CPNM presentan enfermedad metastásica en alguna de sus fases evolutivas: 30-40% al diagnóstico, 50% por recidiva de los estadios I-II y 80% por progresión o recidiva de los estadios III.

El carcinoma de pulmón microcítico constituye aproximadamente el 15-20% de las neoplasias pulmonares y aproximadamente el 60-70% de los pacientes debutan con enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico.

Adenocarcinoma
<ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma lepídico, acinar, papilar, micropapilar, sólido • Adenocarcinoma mucinoso invasivo • Adenocarcinoma invasivo mixto mucinoso y no mucinoso • Adenocarcinoma coloide • Adenocarcinoma fetal • Adenocarcinoma entérico • Adenocarcinoma mínimamente invasivo no mucinoso y mucinoso • Lesiones pre-invasivas: <ul style="list-style-type: none"> - Hiperplasia adenomatosa atípica - Adenocarcinoma in situ no mucinoso y mucinoso
Carcinoma escamoso
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma escamoso queratinizante • Carcinoma escamoso no queratinizante • Carcinoma escamoso basaloide • Lesiones pre-invasivas: <ul style="list-style-type: none"> - Carcinoma escamoso in situ
Tumores neuroendocrinos
Carcinoma de células grandes
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma pleomórfico
Carcinoma fusocelular
Carcinoma de células gigantes
Carcinosarcoma
Blastoma pulmonar
Carcinoma tipo linfoepiteloma
Carcinoma NUT
Tumores tipo glándula salival
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma mucoepidermoide • Carcinoma adenoide quístico • Carcinoma epitelial-mioepitelial • Adenoma pleomórfico
Papilomas
<ul style="list-style-type: none"> • Papiloma escamoso exofítico o invertido • Papiloma glandular • Papiloma mixto escamoso y glandular
Adenomas
<ul style="list-style-type: none"> • Pneumocistoma esclerosante • Adenoma alveolar • Adenoma papilar • Cistadenoma mucinoso • Adenoma glandular mucinoso
Tumores mesenquimales
Tumores linfohistiocitarios
Tumores de origen ectópico
Tumores metastásicos

Tabla 1.- Clasificación histológica de los tumores epiteliales pulmonares. *Adaptada de la clasificación de la OMS 2015.³²*

1.1.4.- Diagnóstico y estadificación

1.1.4.1.- Diagnóstico

La sospecha clínica de un cáncer de pulmón (CP) se basa en la historia clínica y en la capacidad de reconocer signos y síntomas propios, pero poco específicos de la enfermedad.

Los síntomas y signos de debut más frecuentes son: tos (8-75%), dolor torácico (20-49%), disnea (3-60%), hemoptisis o expectoración hemoptoica (6-35%), astenia (0-10%), anorexia y pérdida de peso (0-68%), acropaquia (0-20%) y fiebre (0-20%).^{33,34}

Aunque muchos de estos signos y síntomas son los mismos que los de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), la aparición de novo, la persistencia o modificación si ya existían en personas de riesgo (varón, >50 años, antecedentes de neoplasia, fumador o ex fumador) debe alertar sobre la posibilidad de tener un CP.

La extensión locorregional puede dar lugar a un síndrome de Pancoast, dolor o palpación de una tumoración en pared torácica, dolor en hombro, disfonía por infiltración del nervio recurrente, parálisis frénica, derrame pleural, disfagia, síndrome de vena cava superior o derrame pericárdico con signos de taponamiento cardíaco.

La extensión extratorácica puede producir dolor óseo, fracturas patológicas, hepatomegalia o trastornos neurológicos focales o generalizados, entre ellos cefalea o síndrome confusional. El 10% de los pacientes desarrolla manifestaciones locales o sistémicas dentro de los llamados síndromes paraneoplásicos. Los más frecuentes son hipercalcemia o hipocalcemia, hiponatremia, anemia, trombocitosis y síndromes leucemoides, SIADH y síndrome de Cushing, osteortropatía hipertrófica, acropaquia, síndromes miasteniformes, polimiositis, dermatomiositis y tromboembolismo pulmonar, entre otros.

La valoración inicial incluye la historia clínica, la exploración física, la radiografía de tórax, la analítica básica y la Tomografía Computarizada torácica (TC torácica).

a) Radiografía de tórax (en proyección posteroanterior y lateral). En ella se valorará:

- Tamaño del tumor
- Localización: central o periférica, lóbulo
- Diafragma: alteraciones de posición, parálisis
- Derrame pleural
- Afectación ósea y de partes blandas
- Otras alteraciones

b) TC torácica:

Se hará siempre, si es posible, antes de la broncoscopia. Su realización se hará también con intención de estadificación. Se incluirá, en la misma exploración, un estudio completo del hemiabdomen superior, que abarque crestas ilíacas, incluyendo glándulas suprarrenales y la totalidad del hígado. Se debe realizar con contraste intravenoso, en una fase vascular adecuada para la detección de eventuales metástasis. Esto permite obviar, en la mayor parte de los casos, la necesidad de realizar un estudio ecográfico complementario hepático. En pacientes con alergia al contraste yodado, se puede optar por una pauta de desensibilización, o bien realizar una ecografía hepática o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en los casos con sospecha de invasión vascular. Se consideran adenopatías significativas en todas las localizaciones las que tengan un eje corto mayor de 1 cm.

c) Tomografía por emisión de positrones (PET)-TC. Esta se realizará:

- En casos subsidiarios de tratamiento con intención radical (cirugía o radio-terapia), para evaluar la estadificación mediastínica y extratorácica.
- Cuando se plantea tratamiento radical con radioterapia, la PET-TC se debe realizar en posición y con marcadores para su planificación.

d) RMN cerebral. Se llevará a cabo en:

- En pacientes sintomáticos.
- Adenocarcinoma, carcinoma de célula grande indiferenciado y carcinoma pobremente diferenciado, en estadios IIA, IIB, IIIA y IIIB.
- Carcinoma escamoso en estadios IIIA y IIIB.
- Pacientes estadio IV con metástasis única (para descartar otras metástasis).

Posteriormente, para confirmar el diagnóstico de sospecha y establecer la estirpe tumoral se dispone de varias técnicas:

a) Broncoscopia:

Constituye el procedimiento de primera elección para la obtención de material citohistológico en el CP (incluye múltiples técnicas auxiliares: aspirado, lavado alveolar, punción, cepillado, biopsia, etc.). En lesiones periféricas se puede contemplar la utilización de fluoroscopia. La realización de la TC torácica previa a la broncoscopia es recomendable, ya que incrementa significativamente el rendimiento diagnóstico de la prueba.³⁵

b) Punción aspiración con aguja fina (PAAF) endoscópica:

Ante la sospecha de CP con afectación mediastínica por técnicas de imagen y sin evidencia de enfermedad metastásica extratorácica, se recomienda establecer el diagnóstico de CP mediante procedimientos mínimamente invasivos y seguros como la punción transbronquial a ciegas (PTB), la ultrasonografía endobronquial (EBUS) o la ultrasonografía endoscópica digestiva (EUS).³⁶

- PTB a ciegas: Es una técnica que permite la obtención de muestras citológicas e histológicas de ganglios hilares y mediastínicos. Su rentabilidad diagnóstica es inferior a la del EBUS, pero aumenta si se combina con EBUS o EUS.

- EBUS y EUS: El EBUS es un procedimiento broncoscópico y mínimamente invasivo que se realiza con sedación consciente o anestesia general en las Unidades de Neumología Intervencionista. Está indicada para la valoración de los ganglios

linfáticos mediastínicos e hiliares, y son accesibles todas las regiones excepto las áreas 5, 6, 8 y 9. La sensibilidad y especificidad del *EBUS* se encuentra alrededor del 93% y del 92% según las series,³⁷ aunque depende de la experiencia del equipo de endoscopia. Para pacientes con sospecha de estación ganglionar N2-N3, se recomienda la combinación de la *EBUS/EUS* como la mejor prueba para la estadificación.³⁸

c) Punción transtorácica guiada por TC:

Siempre que se pueda, se preferirá biopsia con aguja gruesa (18-20G) que PAAF. Se considera indicada en aquellos casos en que el diagnóstico citohistológico puede influir en la estrategia terapéutica o modificar la estadificación de la enfermedad, y en casos en que no se puede establecer el diagnóstico por técnicas broncoscópicas. La complicación más frecuente es el neumotórax (21-30%), que requiere drenaje en el 30% de los casos. La hemoptisis suele ser autolimitada, y es importante en menos del 1% de los casos. Está contraindicada en caso de mala función respiratoria, pulmón único, diátesis hemorrágica, presencia de enfisema o bullas extensas en la pared del nódulo, y cuando el paciente no pueda colaborar (mantenimiento del decúbito seleccionado en el procedimiento, tos incontrolada, etc.).

d) Citología de esputo:

Es un método de diagnóstico sencillo y no invasivo, pero de rentabilidad muy variable.³⁹ Reservado únicamente para los pacientes que rechazan o son incapaces de tolerar otros procedimientos más agresivos.

e) Mediastinoscopia:

Del mapa ganglionar propuesto en la vigente clasificación TNM del cáncer de pulmón (ver Figura 6), la mediastinoscopia permite el acceso a las estaciones ganglionares 2R, 2L, 4R, 4L, 7, 10R y 10L.

La mediastinoscopia se realiza bajo anestesia general, con el paciente

en decúbito supino e hiperextensión cervical. Las complicaciones de la mediastinoscopia son escasas y la mortalidad es prácticamente nula. Hammoud *et al.*⁴⁰ obtuvieron una tasa de complicaciones del 0,6% y una mortalidad del 0,2% asociada fundamentalmente a comorbilidades preoperatorias, con un único caso de mortalidad atribuible a la técnica (0,05%). La mayoría de las complicaciones son leves, como la infección de la herida o el neumotórax. También pueden existir complicaciones potencialmente graves como la parálisis recurrential izquierda, la hemorragia por lesión de grandes vasos que requieren la realización de una toracotomía o una esternotomía de urgencia, la perforación traqueobronquial, la perforación esofágica o la mediastinitis.

f) Otras técnicas diagnósticas invasivas:

- **Mediastinoscopia cervical extendida.**
- **Mediastinotomia paraesternal izquierda.**
- **Mediastinopleuroscopia.**
- **Videotoracoscopia.**
- **VAMLA o linfadenectomía mediastinoscópica videoasistida.**
- **TEMLA o linfadenectomía mediastínica transcervical extendida.**
- **PAAF o biopsia de lesiones metastásicas extratorácicas.**
- **Toracocentesis.**

1.1.4.2.- Estadificación

La estadificación TNM tiene implicaciones diagnósticas, terapéuticas y pronósticas. Se basa en la extensión anatómica del tumor primario (T) (Figura 3), metástasis ganglionares (N) (Figuras 4 y 5) y metástasis a distancia (M) (Figura 6). Recientemente, la IASLC ha publicado la 8^a edición del TNM para cáncer de pulmón.⁴¹ Los tumores con un pronóstico y supervivencia similar se agrupan por estadios (I-IV) (Tabla 2) y permiten seleccionar el mejor tratamiento inicial.

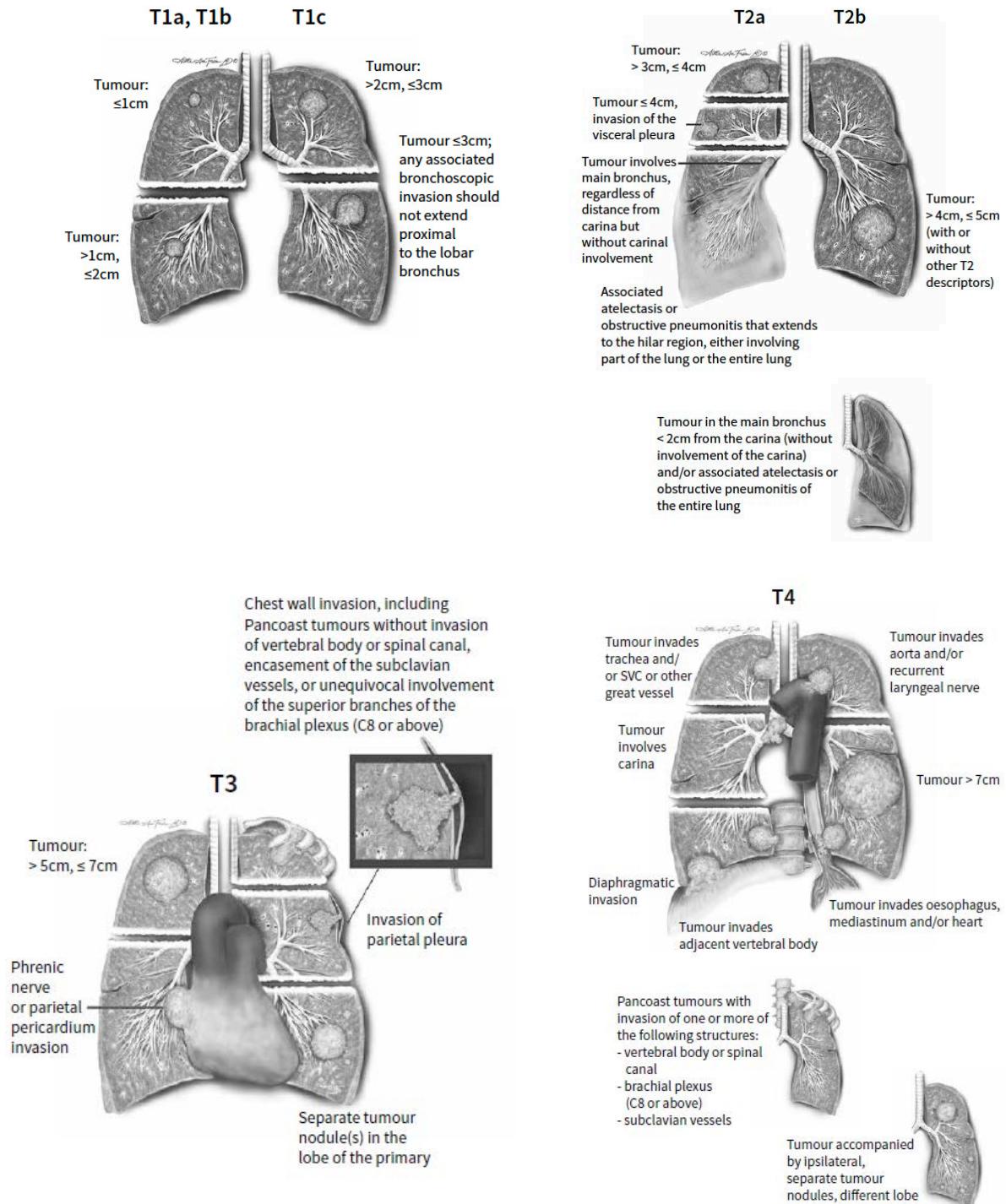


Figura 3.- Clasificación del cáncer de pulmón según las características del tumor primario. *Adaptada de Staging Handbook in Thoracic Oncology, 2nd edition.*

Introducción

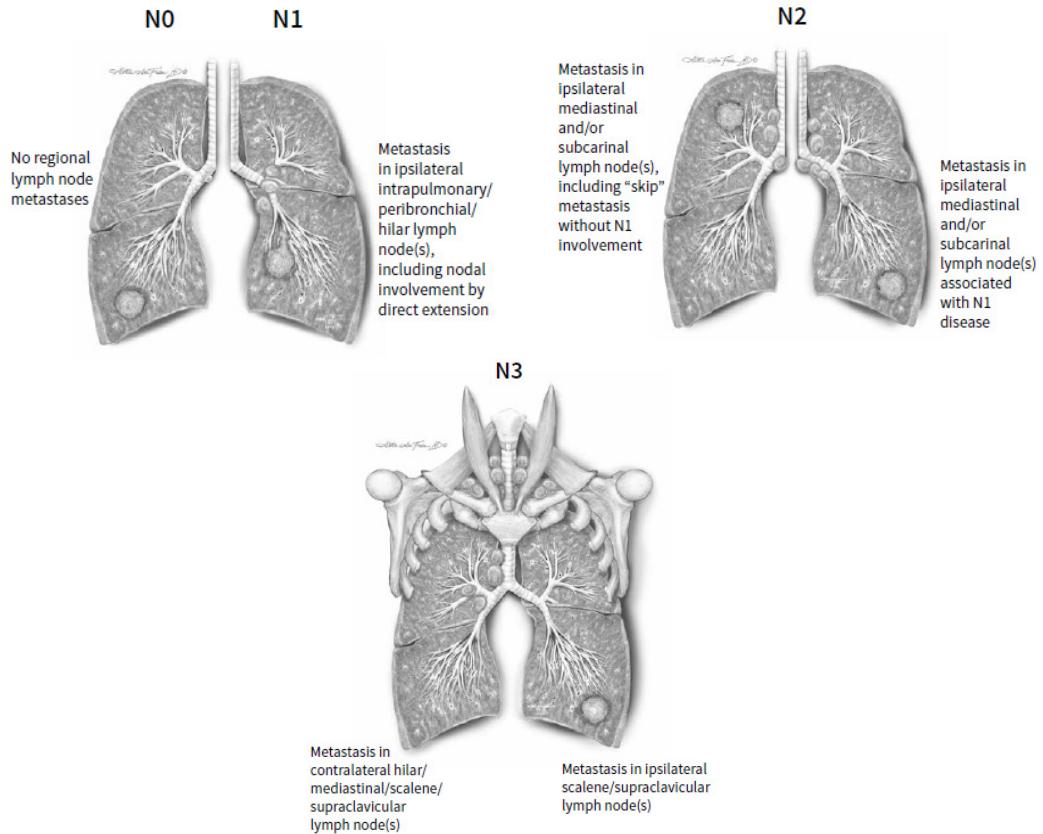


Figura 4.- Clasificación del cáncer de pulmón según las características de los ganglios. *Adaptada de Staging Handbook in Thoracic Oncology, 2nd edition.*

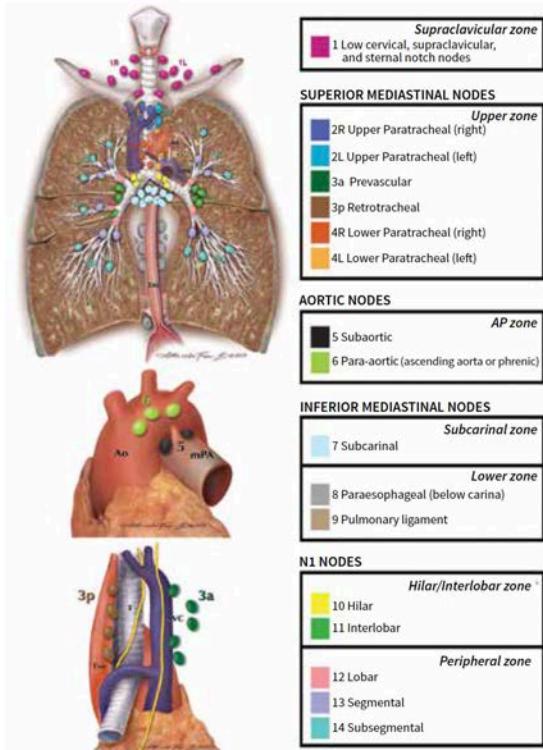


Figura 5.- Distribución ganglionar por estaciones y zonas. *Adaptada de Staging Handbook in Thoracic Oncology, 2nd edition.*

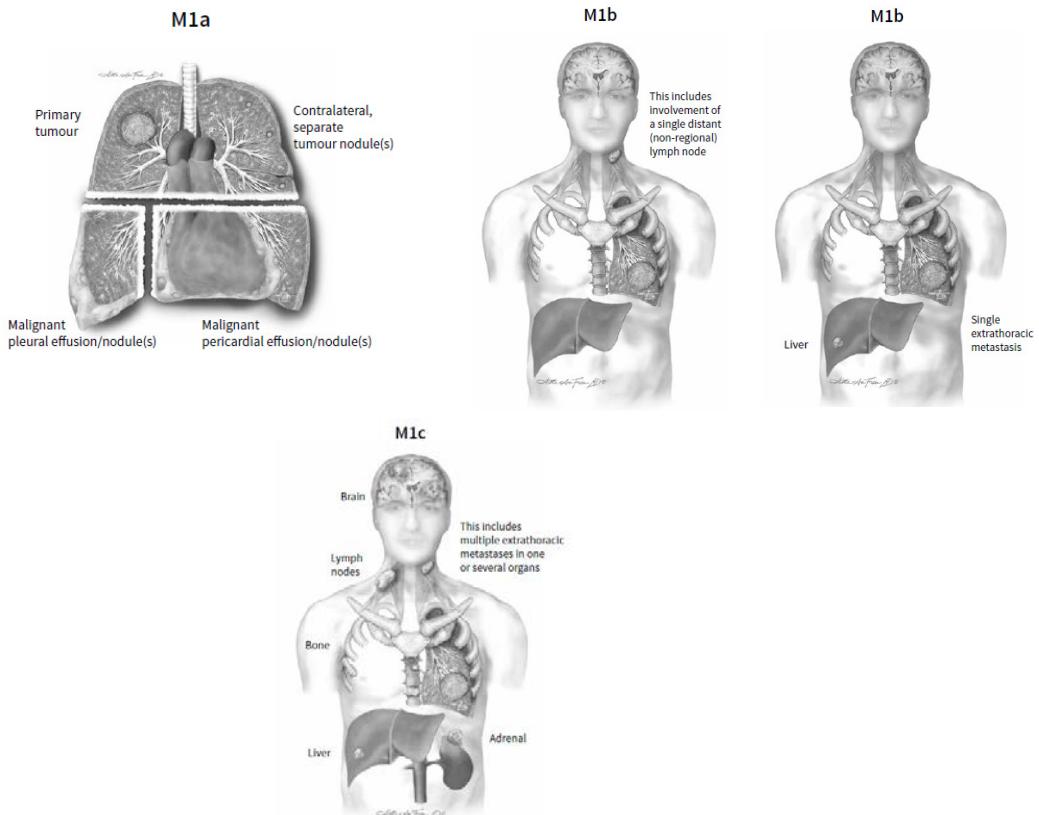


Figura 6.- Clasificación del cáncer de pulmón según la localización metastásica. *Adaptada de Staging Handbook in Thoracic Oncology, 2nd edition.*

ESTADIO	T	N	M
Oculto	TX	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA1	T1a(mi)/T1a	N0	M0
IA2	T1b	N0	M0
IA3	T1c	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T1a-T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1aT2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0/N1	M0
IIIB	T1aT2b	N3	M0
	T3/T4	N2	M0
IIIC	T3/T4	N3	M0
IVA	Cualquier T	Cualquier N	M1a/M1b
IVB	Cualquier T	Cualquier N	M1c

Tabla 2.- Clasificación TNM del cáncer de pulmón por estadios.

1.1.5.- Factores pronósticos y predictivos

A continuación, se detallan los factores pronósticos clínicos y predictivos moleculares necesarios a tener en cuenta a la hora de decidir el tratamiento de los pacientes con un CPNM.

1.1.5.1.- Factores pronósticos clínicos

Un factor pronóstico se define generalmente como un factor, medido antes del tratamiento, que tiene un impacto en el resultado de un paciente “independientemente” del tratamiento.

Uno de los factores pronósticos más reproducibles es el estadio de la enfermedad, determinado por la clasificación TNM. Según el estadio clínico, las tasas de supervivencia a los 5 años oscilan entre el 90% para los estadios IA1 y el 0% para los estadios IVB.⁴¹ Si a estos factores los analizamos por separado, cada uno de ellos es un factor pronóstico *per se*: un mayor tamaño del tumor (T) empeora el pronóstico, así como el compromiso de los ganglios linfáticos (N) y el número de órganos con compromiso metastásico (M).

El segundo factor pronóstico más reproducible, también muy útil para guiar el tratamiento, es el *performance status* del paciente medido en la escala de Karnofsky o en la escala ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), si bien su valor se ha demostrado principalmente en aquellos pacientes con tumores no resecados. Mientras que algunos autores han argumentado que la quimioterapia para los pacientes con un CPNM estadio IV debe limitarse a los pacientes con un ECOG 0-1;⁴² otros sugieren que pacientes con un ECOG de 2 también pueden beneficiarse del tratamiento.⁴³

El sexo femenino es considerado también un factor bastante reproducible y su papel como factor de mejor pronóstico se ha demostrado en un meta-análisis.⁴⁴

Si bien la histología podría considerarse un factor pronóstico independiente, ésta no ha demostrado ser altamente reproducible, excepto por el hecho de que los tumores con características neuroendocrinas tienen peor pronóstico, así como

aquellos adenocarcinomas con componente micropapilar y/o mucinoso.

En cuanto a la edad del paciente al momento del diagnóstico, ésta parece ser un factor pronóstico en los pacientes en estadio avanzado, pero no en los estadios iniciales resecados.

En los estadios iniciales, los procedimientos quirúrgicos más extendidos que la lobectomía también podrían ser indicativos de un mal pronóstico, pero esta variable podría estar correlacionada con otros factores que llevaron a la decisión del tipo de cirugía. Alternativamente, los procedimientos quirúrgicos restrictivos (cirugías “económicas”) pueden no ser suficientes y agravar el pronóstico.

Entre los parámetros biológicos de rutina, cifras normales de leucocitos, neutrófilos, lactato deshidrogenasa (LDH), calcemia, hemoglobina y albúmina han sido identificados como factores pronósticos independientes favorables.

1.1.5.2.- Factores predictivos moleculares

Un factor predictivo es un factor que se espera pueda identificar a los pacientes que se beneficiarán de un tratamiento específico.

Avances significativos en la comprensión de la biología molecular del CPNM llevaron a la identificación de ciertas alteraciones moleculares y al desarrollo progresivo de nuevas dianas terapéuticas mejorando la supervivencia de los pacientes con un CPNM en estadio IV. La mayoría de estas alteraciones ocurren en los tumores con una histología no-escamosa, principalmente adenocarcinomas. En 2004 se identificaron las mutaciones activadoras en el dominio quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) observándose respuestas dramáticas al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (ITQ).⁴⁵⁻⁴⁷ Las mutaciones en el gen *EGFR* representan entre el 10 y el 17% de los casos de CPNM en América del Norte y Europa y entre el 30 y el 50% de los CPNM en países asiáticos, siendo más comunes entre los pacientes con tumores de estirpe no-escamosa, no fumadores o con historia de tabaquismo ligero.⁴⁷⁻⁴⁹ Los ITQ de primera generación gefitinib (Iressa®) y erlotinib (Tarceva®)

y de segunda generación afatinib (Giotrif®), han mostrado superiores tasas de respuesta, mejorando la supervivencia libre de progresión y la calidad de vida en comparación con la quimioterapia estándar basada en platino en pacientes con buen *performance status* (0-2) cuyos tumores albergan una mutación activadora (exones 18, 19 y 21) en *EGFR*.⁵⁰⁻⁵⁷ Estos datos establecieron a los ITQ de *EGFR* como el tratamiento de elección en primera línea para los pacientes con un CPNM avanzado y mutaciones sensibilizadoras de *EGFR*. Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes progresan después de una mediana de tratamiento de ~12 meses debido a la aparición de múltiples mecanismos de resistencia adquirida. Entre ellos, el mecanismo más común (~50% de los casos) es la adquisición de una mutación *missense* en el exón 20 del gen *EGFR* (T790M, p.Thr790Met), entre otros.⁵⁸⁻⁶⁰

Posteriormente, el descubrimiento en 2007 del gen de fusión *EML4-ALK* (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4 - anaplastic lymphoma kinase*) implicó un cambio significativo en la estrategia terapéutica para los pacientes con un CPNM que albergan este reordenamiento *EML4-ALK*.⁶¹ Dicho reordenamiento se detecta en aproximadamente un 3-7% de los pacientes con CPNM, predominantemente en pacientes con histología de adenocarcinoma, nunca fumadores o fumadores ligeros y pacientes jóvenes.⁶²⁻⁶⁶ Crizotinib (Xalkori®), un ITQ de *ALK*, *ROS1* y *MET*,⁶⁷⁻⁶⁹ fue el primer ITQ aprobado por la *Food and Drug Administration (FDA)* y la *European Medicine Agency (EMA)* para el tratamiento de aquellos pacientes con un CPNM que albergan un reordenamiento del gen *ALK*, ya que induce una regresión tumoral rápida y respuestas objetivas de alrededor del 70% en la mayoría de estos pacientes, tanto en la primera como en la segunda línea.^{70,71} Como ocurre con otros ITQ, la enfermedad progresiva dentro de los primeros 12 meses de tratamiento, siendo el sistema nervioso central uno de los sitios más frecuentes. Dentro de los diferentes mecanismos de resistencia, la aparición de ciertas mutaciones adquiridas en el gen *ALK*, como por ejemplo L1196M, G1269A, C1156Y, G1202R y F1174L/V entre otras, es la principal causa.⁷²⁻⁷⁷ En vista de sus limitaciones, diferentes ITQ se han ido desarrollando. Ceritinib (Zykadia™) fue el

primer ITQ aprobado tanto por la *FDA* como por la *EMA* para aquellos pacientes que progresan o no toleran crizotinib,⁷⁸⁻⁸² seguido de alectinib (Alecensa™) que dispone a día de hoy de la aprobación de la *FDA* pero no así de la *EMA*.

Existen además otras alteraciones moleculares, todas ellas con una frecuencia menor al 5%, algunas de las cuales disponen de un tratamiento dirigido eficaz.⁸³⁻⁸⁶

1.1.6.- Tratamiento de la enfermedad localizada

Actualmente se sigue considerando la cirugía de resección pulmonar como el mejor tratamiento para los pacientes con CPNM en estadios localizados o localmente avanzados tras un tratamiento de inducción efectivo. No obstante, si bien la cirugía ofrece beneficios, los riesgos de complicaciones inmediatas, de mortalidad, aunque sea en un porcentaje reducido y las secuelas a largo plazo, existen. Por este motivo, la selección estricta de pacientes es necesaria mediante una valoración quirúrgica correcta, discutiendo cada caso individualmente en un comité multidisciplinar.

Sólo en los pacientes con un CPNM en estadios iniciales (T1N0 y T2aN0) con contraindicación quirúrgica o en las situaciones en las que el paciente rechace la cirugía, las técnicas de radioterapia (RT) estereotáctica pueden ser una alternativa (*SBRT, Stereotactic Body Radiotherapy; SABR, Stereotactic Ablative Radiotherapy*). La RT estereotáctica es un tipo específico de radioterapia externa altamente precisa, realizada con control del movimiento respiratorio y que permite administrar de forma segura elevadas dosis de RT en un número pequeño de fracciones.

1.1.6.1.- Cirugía

Se recomienda la cirugía radical en los pacientes operables con CPNM en estadios I y II. En pacientes con enfermedad mediastínica oculta, la resección del tumor y de las adenopatías está indicada si la resección pulmonar y mediastínica pueden ser completas. En los pacientes con CPNM en estadio IIIA con afectación

N2 discreta identificada preoperatoriamente, la cirugía como primer tratamiento no está indicada fuera del escenario de ensayos clínicos. En estos pacientes se puede proponer terapia de inducción con evaluación posterior y cirugía radical si toda la enfermedad intratorácica es resecable, evitando la neumonectomía. En tumores localizados en sulcus pulmonar se recomienda que la cirugía completa, mediante parietolobectomía, sea precedida por un tratamiento de inducción. La cirugía, dentro de un esquema multidisciplinar, puede ofrecerse a pacientes con CPNM potencialmente resecable, sin afectación mediastínica y con metástasis cerebrales sincrónicas tributarias de resección quirúrgica completa. Otros escenarios deben plantearse siempre dentro de un comité multidisciplinar.⁸⁷

La cirugía toracoscópica (VATS, *video-assisted thoracoscopic surgery*) en el tratamiento del CPNM disminuye la mortalidad, la morbilidad y la estancia hospitalaria, sin comprometer el intervalo libre de enfermedad ni la supervivencia en comparación con la cirugía abierta.⁸⁸⁻⁹³

Tipos de resección:

- Resecciones sublobares:

La resección pulmonar sublobar consiste en la exéresis de uno o más segmentos anatómicos (segmentectomía) o de una resección no anatómica, transegmentaria o en cuña. La justificación para la realización de resecciones sublobares obedece, generalmente, a dos razones:

- Pacientes que no tolerarían una lobectomía.
- Tumores que por sus características no precisarían una lobectomía.

La eficacia de las resecciones sublobares no está definitivamente determinada. El primer estudio controlado mostró que en el estadio IA, la recidiva local era tres veces más frecuente y la mortalidad un 30% mayor en la resección sublobar que en la lobectomía, sobre todo en tumores de histología no-escamosa.⁹⁴ En cambio, varios estudios prospectivos no encontraron diferencias respecto a recidiva local y supervivencia entre estas dos técnicas en tumores N0 de hasta

2 cm de diámetro.^{95,96} La segmentectomía anatómica se ofrece, cada vez más frecuentemente, como alternativa a la lobectomía en el estadio I. Los resultados obtenidos con segmentectomía anatómicas en instituciones únicas no difieren de las de series históricas y actuales tras lobectomía, si bien un reciente meta-análisis sugiere que la equivalencia sólo es válida en lesiones de hasta 2 cm de diámetro.⁹⁷

- Lobectomía:

La lobectomía es la técnica de elección en estadios iniciales, al permitir una resección oncológica del tumor y de su componente linfático. A la espera de los datos provenientes de ensayos clínicos en curso que comparan los resultados en supervivencia de la lobectomía con las resecciones sublobares, la lobectomía sigue siendo la indicación estándar en pacientes que pueden tolerarla funcionalmente y siempre que el tumor pueda ser resecado completamente con esta técnica.⁹⁸⁻¹⁰¹

- Neumonectomía:

La neumonectomía está indicada en tumores centrales o que se extienden a través de las cisuras y que no pueden ser resecados mediante otras técnicas menos cruentas.¹⁰² La neumonectomía se asocia a cambios anatómicos torácicos importantes, disminución significativa de la función pulmonar y a numerosas complicaciones potenciales. La mortalidad operatoria actual se aproxima al 8%.¹⁰³⁻¹⁰⁵ La neumonectomía derecha se asocia a una mortalidad más alta que la izquierda, 10-12% frente al 1-3,5%, respectivamente.¹⁰⁶ La supervivencia a 10 años después de una neumonectomía en el CPNM oscila entre el 67 y el 85%.¹⁰⁷ La resección mediante técnicas broncoangioplásticas, cuando es factible, ofrece resultados oncológicos similares, con una mayor preservación de la función pulmonar y con menos complicaciones y mortalidad.^{108,109}

- Resecciones extensas:

Con la mejora en el diagnóstico por imagen, en las técnicas quirúrgicas y en los cuidados peri-operatorios, los pacientes cuidadosamente seleccionados que

presentan afectación de carina,¹¹⁰ vena cava superior, aurícula izquierda, arteria pulmonar intrapericárdica, aorta, esófago y cuerpos vertebrales¹¹¹⁻¹¹⁴ pueden beneficiarse de la cirugía, en el contexto de un tratamiento multidisciplinar, siempre en centros con experiencia, obteniéndose una supervivencia de hasta el 50% a 5 años.¹¹² Es importante la correcta estadificación mediastínica previa a la cirugía dado que las mejoras de los resultados se obtienen en pacientes N0-1 y el tratamiento de inducción puede incrementar la supervivencia.¹¹⁴

Uno de los conceptos que se relaciona con la calidad de la resección quirúrgica es el margen de resección:

Resección “R0” indica la remoción microscópica completa de todo el tumor (márgenes libres de células tumorales).

Resección “R1” indica que los márgenes de las piezas resecadas demuestran células tumorales cuando se observan al microscopio.

Resección “R2” indica que la resección ha sido incompleta y quedan restos de tumor visible a simple vista.

1.1.6.2.- Tratamiento peri-operatorio

Se entiende por tratamiento peri-operatorio a aquel que se administra antes o después de una cirugía y comprende quimioterapia (QT), radioterapia (RT) o bien la combinación de ambos.

1.1.6.2.1.- Tratamiento neoadyuvante

En pacientes con CPNM en estadio IIIA, potencialmente resecable (N2), se ha demostrado una tendencia a un beneficio del tratamiento neoadyuvante con QT previo a la cirugía.¹¹⁵

Asimismo, hay estudios que demuestran que la cirugía después de un tratamiento combinado de QT-RT mejora la supervivencia libre de progresión sin un beneficio en supervivencia global, excepto en los pacientes sometidos a una lobectomía.¹¹⁶

El esquema de QT recomendado es un doblete basado en platino. Por lo

tanto, estos pacientes pueden ser tratados con QT +/- RT seguido de cirugía, y la inducción con QT-RT es preferible sólo si la cirugía prevista es una lobectomía.

1.1.6.2.2.- Tratamiento adyuvante

- Quimioterapia:

La QT adyuvante basada en platino (preferentemente cisplatino) está indicada en pacientes operados estadios II-III con cirugía R0 y buen estado general.¹¹⁷ No se recomienda la QT complementaria en pacientes operados estadio IA y cirugía R0, y es controvertido en pacientes estadio IB con tumores ≥ 4 cm.

- Radioterapia:

Hay situaciones en las que la RT juega un papel y estas son, por un lado, en los tumores T3 y T4 (según márgenes de resección) y en los casos de afectación ganglionar N1 (hiliar múltiple y/o rotura capsular), así como en los casos de N2 independientemente de si existe o no rotura capsular, así como en los casos de resección R1-R2.

1.1.7.- Tratamiento de la enfermedad localmente avanzada/irresecable

Se considera enfermedad localmente avanzada o irresecable, aquellos pacientes con un CPNM en estadios IIIA (N2 “bulky”, afectación de múltiples estaciones mediastínicas) y IIIB.

En pacientes con buen estado general, *performance status* 0-1 y pérdida de peso $<10\%$, la QT-RT concomitante es el tratamiento de elección, tal y como se ha demostrado en varios ensayos clínicos fase III y un meta-análisis donde se demuestra un beneficio en supervivencia global del 4,5% a 5 años.¹¹⁸ Se recomienda administrar de 2 a 4 ciclos de QT con un doblete basado en platino (cisplatino o carboplatino) más un fármaco de 3^a generación, siendo la vinorelbina y el etopósido los más utilizados.

En pacientes no aptos para un tratamiento de QT-RT concomitante, la QT de inducción con un doblete basado en platino seguido de RT definitiva (modalidad

secuencial) es una alternativa eficaz.¹¹⁹

1.1.8.- Tratamiento de la enfermedad diseminada o metastásica

La estrategia de tratamiento debe tener en cuenta factores como la histología, patología molecular, edad, *performance status*, comorbilidades y las preferencias del paciente. Las decisiones de tratamiento deben idealmente discutirse dentro de un comité multidisciplinar.

- Tratamiento de primera línea:

La QT con un doblete basado en platino (cisplatino o carboplatino) debe considerarse en todos los pacientes con un CPNM en estadio IV (sin mutaciones activadoras conocidas), sin comorbilidades mayores y con un *performance status* 0-2. Los beneficios de la QT frente al mejor tratamiento de soporte (*BSC, best supportive care*) se han demostrado, consiguiendo una reducción del 23% del riesgo de muerte, una ganancia de supervivencia de un año del 9% y un aumento absoluto de 1,5 meses en la supervivencia media con un incremento en la calidad de vida.¹²⁰ Ninguna combinación de cisplatino o carboplatino y un fármaco de tercera generación ha demostrado ser superior, por lo que la elección del doblete se basará en el perfil de toxicidad y las comorbilidades de los pacientes. Un meta-análisis ha demostrado un beneficio significativo en tasa de respuesta y supervivencia global para los pacientes que reciben cisplatino *versus* carboplatino.¹²¹

En aquellos pacientes con un CPNM de histología no-escamosa, la combinación de cisplatino y pemetrexed demostró una mayor eficacia y menor toxicidad comparado con cisplatino y gemcitabina.¹²² Mantener el tratamiento con pemetrexed después de 4 ciclos de cisplatino y pemetrexed mejora la supervivencia global.¹²³ En pacientes ancianos o con contraindicación para recibir cisplatino, la combinación de carboplatino y pemetrexed es una alternativa válida.¹²⁴

La adición de bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF (*vascular endothelial growth factor*), a un esquema de QT basado en platino, ha demostrado un

beneficio tanto en supervivencia libre de progresión como en supervivencia global.¹²⁵ Su uso está limitado a pacientes con CPNM de histología no-escamosa, *performance status* 0-1 y sin contraindicaciones para recibir fármacos antiangiogénicos.

- Tratamiento de segunda línea:

Los pacientes que presenten una progresión clínica o radiológica de la enfermedad y con buen estado general son candidatos a un tratamiento de segunda línea.

Docetaxel y pemetrexed (en histología no-escamosa) han demostrado un beneficio en supervivencia global y calidad de vida.^{126,127} Las combinaciones de quimioterapia no han demostrado ningún beneficio respecto a la monoterapia.¹²⁸

Nintedanib, un inhibidor de tirosina quinasa que actúa simultáneamente sobre los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor*) y sobre las vías de señalización del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGFR, *fibroblast growth factor receptor*) ha sido aprobado por la *EMA* en combinación con docetaxel para aquellos pacientes con un CPNM de histología adenocarcinoma y *performance status* 0-1, mostrando un mayor beneficio en aquellos que progresan antes de 9 meses desde el inicio de la primera línea de QT.¹²⁹

Nivolumab, un anticuerpo anti-PD-1 (*programmed death 1*), mejora la supervivencia global, la calidad de vida y la tasa de respuesta en pacientes con un CPNM de histología escamosa independientemente de la expresión de PD-L1 (*programmed death-ligand 1*).¹³⁰ En pacientes con un CPNM de histología no-escamosa y expresión de PD-L1, nivolumab es superior a docetaxel en supervivencia global y tasa de respuesta.¹³¹ Pembrolizumab, otro anticuerpo anti-PD-1, mejora las supervivencias global, libre de progresión, la tasa de respuesta y la calidad de vida en pacientes con CPNM y expresión de PD-L1 respecto a docetaxel.¹³²

Atezolizumab, un anticuerpo anti-PD-L1, mejora la supervivencia global y la

Introducción

tasa de respuesta en pacientes con un CPNM, independientemente de la expresión de PD-L1, respecto a docetaxel.¹³³

1.2.- Estudios farmacogenéticos en cáncer de pulmón

La *EMA* ha definido Farmacogenética como la disciplina que estudia la relación entre las diferencias en la secuencia de ADN y la respuesta que presentan los pacientes a los fármacos. Con el abordaje farmacogenético se pretende la sustitución del actual sistema de “ensayo y error” en la selección y dosificación de los medicamentos por otro en el cual, partiendo de un correcto diagnóstico clínico, sea posible evaluar el genotipo del paciente y determinar qué medicamento y a qué dosis conseguirá un balance más adecuado entre su nivel de eficacia y el riesgo de producir reacciones adversas en ese paciente en concreto.

La individualización del tratamiento basada en la búsqueda de marcadores genéticos como factores de sensibilidad o resistencia a los distintos agentes quimioterápicos es uno de los objetivos prioritarios de la investigación aplicada al enfermo oncológico. Esta búsqueda está basada en el análisis de ADN, ARN y proteínas. La escasa disponibilidad y baja calidad de las muestras tumorales son las limitaciones más importantes para estos estudios: en el cáncer de pulmón avanzado, no tributario a tratamiento quirúrgico, únicamente se dispone de material tumoral procedente de la biopsia en un 60% de los pacientes y, además, este material obtenido de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina contiene un número muy bajo de células tumorales. Por este motivo se han desarrollado nuevas técnicas para la búsqueda y el análisis de diferentes polimorfismos y en concreto de *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms*) a partir del ADN obtenido de células nucleadas de sangre periférica.

1.2.1.- Farmacogenética del tratamiento con derivados del platino

Conocer los factores moleculares pronósticos y predictivos de respuesta podría ayudar a una mejor individualización del tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón. Se ha descrito que los polimorfismos en ciertos genes, especialmente en los genes reparadores del ADN juegan un papel importante tanto en la respuesta

tumoral a la quimioterapia como en la evolución de los pacientes.¹³⁴ Los genes conocidos que podrían estar relacionados con la respuesta o la toxicidad al tratamiento quimioterápico con derivados del platino son aquellos involucrados en la reparación del ADN.

1.2.1.1.- Polimorfismos en genes de la vía de reparación por escisión de nucleótidos (*NER*, *Nucleotide Excision Repair*)

Este proceso de reparación de la molécula de ADN es un mecanismo de defensa celular contra distintos agentes citotóxicos. En el caso de la quimioterapia basada en derivados de platino, la vía *NER* es la que se encarga de la reparación de los aductos que distorsionan la doble hélice de ADN causados por el tratamiento.¹³⁵ El complejo proteico reparador responsable para la escisión está codificado por distintos genes, incluyendo el “excision repair cross complementing 1” (*ERCC1*) que forma un heterodímero con el “xeroderma pigmentosum grupo F” (*XPF*) para crear una incisión en la posición 5' de la hebra de ADN dañada. Existe también una expresión coordinada del “xeroderma pigmentosum grupo D” (*XPD*) con *ERCC1* y otros genes del complejo reparador *NER* (Figura 7).

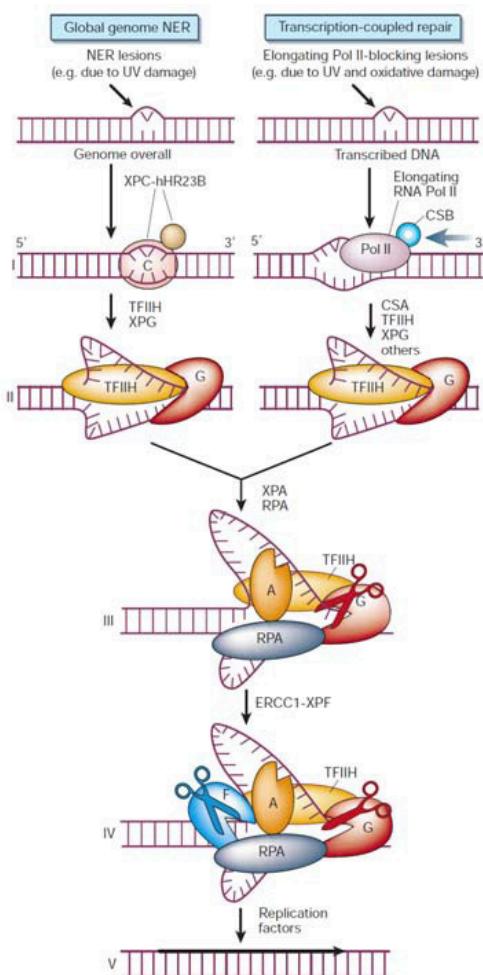


Figura 7.- Esquema del funcionamiento del complejo reparador por escisión de nucleótidos (NER). Hay dos formas distintas de NER: NER genómico global (GG-NER), que corrige el daño en zonas del genoma transcripcionalmente silenciadas, NER acoplado a transcripción (TC-NER), que repara lesiones en la hebra transcripcionalmente activa del ADN. Exceptuando el mecanismo de reconocimiento del daño, las dos rutas son idénticas. *Adaptada de Jan H. J. Hoeijmaker. Nature 2001.*

El gen *ERCC1* se localiza en el cromosoma 19q13.2-q13.3 y codifica una proteína de 297 aminoácidos. Se han identificado diversos polimorfismos en este gen, entre los que destacan: i) un polimorfismo de un solo nucleótido en el codón 118, posición 19007 que provoca un cambio C>T y no modifica el aminoácido codificado, la asparragina; ii) un segundo SNP, localizado en la posición 8092 de la región no traducida 3' que provoca un cambio C>A y, iii) un SNP localizado en el intrón 3, posición 19716 que implica un cambio G>C.

(I) *El complejo XPC-hHR23B es el primero en detectar el daño en el ADN.*

(II) *El complejo TFIID, formado por las helicasas XPB y XPD, es reclutado para desenrollar aproximadamente unos 30 pares de bases alrededor del ADN dañado.*

(III) *XPA confirma la presencia del daño y la proteína de replicación A (RPA) estabiliza la estructura abierta.*

(IV) *Las endonucleasas XPG y ERCC1/XPF, rompen los extremos 3' y 5' de la cadena dañada generando un oligonucleótido de ~24-32 bases que contiene la lesión.*

(V) *La maquinaria de replicación normal del ADN completa la reparación.*

Se ha evidenciado que unos niveles bajos de expresión del gen *ERCC1* se asocian a alteraciones en la capacidad reparadora del ADN. Este hecho conlleva un incremento en la respuesta y una mayor tolerancia a esquemas terapéuticos basados en derivados de platino.^{136,137} En la actualidad no existe aún una correlación bien establecida entre los diferentes *SNPs* del gen *ERCC1* y su capacidad para modificar los niveles de expresión del mismo.

El gen *XPD* (también conocido como *ERCC2*) se encuentra en el cromosoma 19q13.3 y codifica para la proteína que lleva el mismo nombre. Esta proteína es una parte esencial (subunidad) de un grupo de proteínas conocido como el complejo de factor de transcripción general IIH (*TFIIH*). El complejo *TFIIH* tiene dos funciones principales: está involucrado en la transcripción de genes, y ayuda a reparar el ADN dañado.

La transcripción de genes es el primer paso en la producción de proteínas. Controlando la transcripción de genes, el complejo *TFIIH* regula la actividad de diferentes genes de la vía *NER*. La proteína XPD parece estabilizar el complejo *TFIIH*. Algunos estudios sugieren que la proteína XPD trabaja junto con XPB, otra proteína en el complejo *TFIIH* que se produce a partir del gen *ERCC3*, para iniciar la transcripción de genes.

Entre los polimorfismos descritos en el gen *XPD*, el *SNP* A751C es uno de los que aparece con una mayor frecuencia y, por ello, uno de los más analizados. Este cambio conlleva una sustitución de un residuo lisina (Lys) por una glutamina (Gln) en la proteína final. Otro *SNP* bien estudiado es el Asp312Asn. Las variantes genéticas p.Lys751Gln y p.Asp312Asn podrían alterar la producción proteica y por ende su capacidad de reparar los daños inducidos por las radiaciones ionizantes y/o la quimioterapia.^{138,139}

El gen *XPB* (también conocido como *ERCC3*) se localiza en el cromosoma 2q14.3 y codifica para la proteína que lleva el mismo nombre. Al igual que la proteína precedente, es una subunidad del complejo *TFIIH*.

El gen *XPF* (también conocido como *ERCC4*) se localiza en el cromosoma 16p13.12. La proteína codificada por este gen forma un complejo con *ERCC1* cuya función de endonucleasa está implicada en la incisión de 5' realizada durante la reparación de la escisión de nucleótidos. Distintas mutaciones en este gen son la causa de una patología hereditaria muy heterogénea denominada xeroderma pigmentosum tipo VI.

El gen *XPG* (también conocido como *ERCC5*) se localiza en el cromosoma 13q33.1. Este gen codifica una endonucleasa de moléculas de ADN de una sola hebra que provoca la incisión en 3' en el proceso de la reparación de la escisión del ADN después del daño inducido por rayos UV. La proteína también puede funcionar en otros procesos celulares, incluyendo la transcripción de la ARN polimerasa II. Las mutaciones en este gen causan un trastorno cutáneo caracterizado por hipersensibilidad a la luz UV y aumento de la susceptibilidad para el desarrollo del cáncer de piel después de la exposición UV (xeroderma pigmentosum VII).

El gen *XPA* se localiza en el cromosoma 9q22.33 y codifica para la proteína responsable de la reparación de daños inducidos por la radiación UV y de los aductos de ADN inducidos por carcinógenos químicos. Las mutaciones en este gen están asociadas con el xeroderma pigmentosum grupo de complementación A.

1.2.1.2.- Polimorfismos en genes de la vía de reparación por escisión de bases (BER, Base Excision Repair)

Este mecanismo constituye el principal sistema reparador del daño ocasionado a la molécula de ADN por las distintas reacciones intrínsecas al metabolismo celular: reacciones oxidativas, metilación, deaminación e hidroxilación. El sistema BER participa, además, en la reparación de la rotura de hebras de ADN que ocasionan los fármacos derivados de platino y las radiaciones ionizantes (Figura 8).

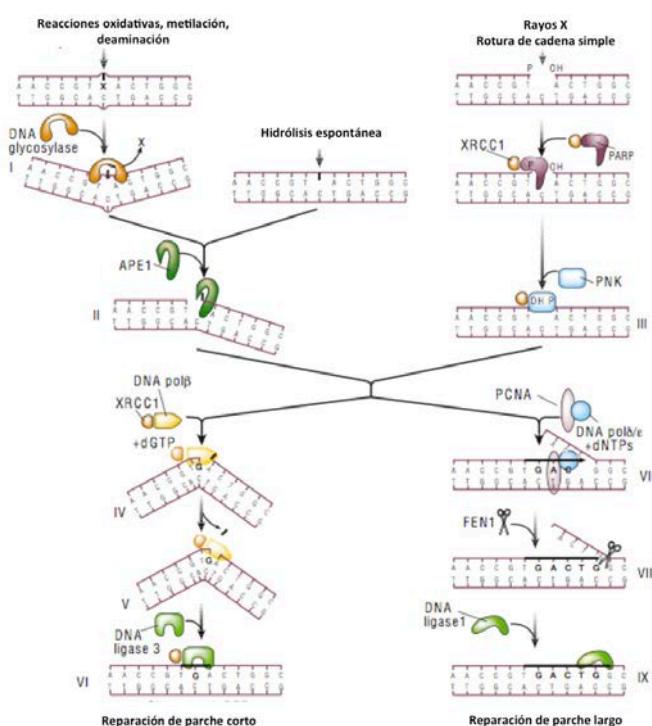


Figura 8.- Esquema del funcionamiento del complejo reparador del ADN por escisión de bases (BER).

La reparación de parche corto (80-90%) reemplaza la lesión con un solo nucleótido. La reparación de parche largo reemplaza la lesión con 2-20 nucleótidos. La vía BER de parche corto comprende diferentes pasos: (I) Una batería de glicosilasas se encarga de escindir la base dañada del esqueleto azúcar-fosfato. También se puede producir por hidrólisis espontánea. (II) La reacción principal del sistema BER se inicia por la APE1 endonucleasa. (III) La polimerasa poliADP-ribosa (PARP) se une en el punto de la lesión. Una polinucleótido quinasa (PNK) orienta los extremos de la reparación. (IV) La ADN-polimerasa B se encarga de llenar el vacío y (V) elimina el residuo de azúcar. (VI) El complejo XRCC1-ligasa sella la lesión reparada. (VII-IX) La vía larga de reparación incluye diferentes ADN polimerasas y el antígeno de proliferación celular del núcleo (PCNA), así como la endonucleasa FEN1 y la ADN-ligasa I. Adaptada de Jan H. J. Hoeijmaker. *Nature* 2001.

En este proceso de reparación del ADN participa la proteína XRCC1 (*X-ray repair cross complementing protein 1*) codificada por el gen que lleva su mismo nombre y que se localiza en el cromosoma 19q13.31. XRCC1 interactúa con la ADN ligasa III y forma un complejo con la ADN polimerasa y poliADP-ribosa polimerasa.

El gen *XRCC2* (*X-ray repair cross complementing protein 2*), localizado en el cromosoma 7q36.1, codifica un miembro de la familia de proteínas relacionadas con RecA/Rad51 que participa en la recombinación homóloga para mantener la estabilidad cromosómica y reparar el daño del ADN. Este gen está implicado en la reparación de las rupturas de la doble hebra del ADN por recombinación homóloga. XRCC1 y XRCC2 son las dos proteínas más estudiadas y diferentes trabajos han analizado la asociación entre polimorfismos en sus genes codificantes y la respuesta a la quimioterapia basada en platino en pacientes con CPNM avanzado.^{140,141}

1.2.2.- Farmacogenética del tratamiento quimio-radioterápico

Más de la mitad de los pacientes con cáncer, incluido el cáncer de pulmón no microcítico, reciben radioterapia en algún momento de la evolución de la enfermedad, ya sea como tratamiento con intención radical, asociado o no a quimioterapia, o bien como tratamiento paliativo, existiendo una amplia variabilidad entre los pacientes en cuanto a la respuesta tumoral y toxicidad.

Se ha planteado la hipótesis de que los genes que participan en las vías de reparación *NER* y *BER* podrían ser considerados como genes candidatos para la realización de estudios farmacogenéticos en pacientes que reciben un tratamiento con radioterapia. En este sentido, el genoma del paciente podría modificar la respuesta del tumor y el resultado clínico del tratamiento. Entre los genes candidatos se encuentran los de las familias *ERCC* y *XRCC*, comentados en el apartado anterior.

1.3.- La vía del factor de crecimiento endotelial vascular (*VEGF*): valor pronóstico y/o predictivo de sus componentes.

La angiogénesis, el proceso de formación de nueva vasculatura, se reconoce como un evento esencial que interviene en el crecimiento del tumor, en su progresión y en el desarrollo de metástasis en los tumores sólidos.¹⁴²⁻¹⁴⁵ Este proceso está regulado por diferentes citoquinas, la mayoría de las cuales pertenecen a la vía del *VEGF*. En CPNM, la expresión de proteínas del *VEGF* se correlaciona con la densidad de microvasos y con la diferenciación histológica del tumor¹⁴⁶ y su sobreexpresión se ha asociado con mal pronóstico en pacientes con CPNM.¹⁴⁷ Algunos agentes antiangiogénicos han demostrado actividad en CPNM, específicamente en el escenario de la enfermedad no resecable/metastásica. Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-*VEGF*, fue el primer agente aprobado en 2006 por la *FDA* y posteriormente por *EMA* para el tratamiento de primera línea del CPNM metastásico de histología no-escamosa en combinación con carboplatino y paclitaxel.^{148,149} Nintedanib es un inhibidor de la tirosina quinasa que actúa a nivel de los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Este fármaco fue recientemente aprobado por la *EMA* para su uso en combinación con docetaxel para tratar pacientes con adenocarcinoma de pulmón localmente avanzado o metastásico que progresan a una quimioterapia de primera línea.¹⁵⁰ Sin embargo, el beneficio de los agentes antiangiogénicos en el escenario del tratamiento adyuvante sigue siendo incierto. Además, no existen, en la actualidad, biomarcadores angiogénicos pronósticos ni predictivos que nos ayuden a seleccionar mejor aquellos pacientes que podrían beneficiarse de estas terapias.

El factor de crecimiento endotelial vascular A (*VEGF-A*, también conocido como *VEGF*) es un importante factor de señalización angiogénica, y el *VEGF* humano existe en 6 isoformas debido a la existencia de *splicing* alternativos.¹⁵¹ Sus

acciones están mediadas por receptores tirosina quinasa de membrana, entre ellos: i) VEGFR-1/*fms-like tyrosine kinase 1* (FLT1), ii) VEGFR-2/*kinase insert domain receptor* (KDR), ambos implicados en la vasculogénesis, y iii) VEGFR-3/FLT4 principalmente implicado en la linfangiogénesis.^{152,153} Otros miembros de la familia, incluyendo el factor de crecimiento placentario (PIGF)-1 y 2, VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, también están implicados en los procesos angiogénicos mediante la activación de cascadas de quinasas que incluyen RAS, MAPK y PI3K.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Las variaciones genéticas en estos genes pueden causar cambios en sus niveles, funciones y/o actividades, afectando el crecimiento tumoral y, en consecuencia, la supervivencia de los pacientes con cáncer.^{155,156} La mayoría de los análisis en CPNM se han centrado en *SNPs* como potenciales factores de riesgo de desarrollar la enfermedad. Otros *SNPs* se han asociado con la expresión de VEGF y los resultados clínicos de los pacientes.¹⁵⁷ En este contexto, los resultados más interesantes han surgido a partir de los estudios basados en el análisis de variantes funcionales dentro de genes implicados en la vía del VEGF como marcadores pronósticos. Se ha demostrado que algunas de estas variantes funcionales se correlacionan con los niveles plasmáticos de VEGF y con la expresión génica.^{158,159} También se han asociado con la supervivencia global en CPNM.¹⁶⁰⁻¹⁶⁴

2.- OBJETIVOS

La Farmacogenética plantea la utilización de los conocimientos derivados de los estudios genómicos para que los pacientes puedan someterse a tratamientos más eficaces y menos tóxicos.

Estos estudios tienen una especial relevancia en el ámbito de la Oncología, ya que los tratamientos quimio-radioterápicos se caracterizan por tener una ventana terapéutica muy estrecha que hace difícil establecer el equilibrio entre el incremento de la dosis (para mejorar la eficacia) y la aparición de efectos adversos.

En el ámbito de la enfermedad localizada, la cirugía radical es el tratamiento principal, si bien un tratamiento adyuvante puede estar indicado dependiendo de factores pronósticos clínicos establecidos. Sin embargo, la supervivencia puede variar entre los pacientes a pesar de unas características clínicas y patológicas similares de la enfermedad.

En base a lo expuesto, los objetivos de la presente tesis son:

- Analizar las variantes genéticas en genes implicados en las vías de reparación del ADN (*NER* y *BER*) como marcadores farmacogenéticos de respuesta y/o toxicidad en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con quimioterapia basada en platino asociada o no a radioterapia.

- Analizar las variantes genéticas en genes involucrados en la vía del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) como marcadores pronósticos de supervivencia libre de recidiva y global en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con cirugía radical.

3.- RESULTADOS

3.1.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer de pulmón no microcítico avanzado/metastásico

En este apartado se incluye la publicación que se describe a continuación:

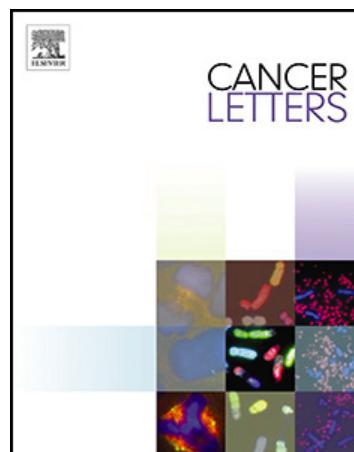
3.1.1.- *Pharmacogenetics of the DNA repair pathways in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy.*

Cancer Letters 2014;353(2):160-166.

doi: 10.1016/j.canlet.2014.07.023. PMID: 25069034

Ivana Sullivan, Juliana Salazar, Margarita Majem, Cinta Pallarés, Elisabeth del Río, David Páez, Montserrat Baiget, Agustí Barnadas.

Departments of Medical Oncology and Genetics. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.



Resumen:

Las variantes genéticas en los genes de reparación del ADN pueden desempeñar un papel en la eficacia de la quimioterapia basada en platino en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Hemos analizado 17 polimorfismos de nucleótido único (*SNPs*, por sus siglas en inglés) en ocho genes (*ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC3*, *ERCC4*, *ERCC5*, *XPA*, *XRCC1* y *XRCC2*) involucrados en los mecanismos de reparación del ADN y su asociación con la eficacia, supervivencia y la toxicidad en pacientes con CPNM. Este estudio prospectivo incluyó pacientes con estadios III y IV tratados con quimioterapia basada en platino. Todos los pacientes ($n = 161$) recibieron cisplatino o carboplatino más un fármaco de tercera generación. Adicionalmente, los pacientes con un estadio IIIA y IIIB ($n = 74$) recibieron radioterapia concomitante o secuencial. Los polimorfismos de la línea germinal se analizaron en muestras de ADN extraído de sangre periférica utilizando el sistema BioMark™. Hemos encontrado que en el estadio III la respuesta se asoció significativamente con *SNPs* en los genes *ERCC1* y *ERCC3*, mientras que la toxicidad derivada de la radioterapia se correlacionó con *SNPs* en el gen *ERCC2*. En los pacientes con un estadio IV, la respuesta se asoció con una variante genética en el gen *ERCC4* y la supervivencia con un *SNP* en el gen *XRCC1*. La complejidad de los mecanismos de reparación del ADN junto con la heterogeneidad en el tratamiento del cáncer de pulmón podrían explicar el papel de múltiples genes como biomarcadores potenciales de respuesta en este tipo de pacientes.

3.2.- Estudio de la vía del VEGF en el cáncer de pulmón no microcítico resecable.

En este apartado se incluye la publicación que se describe a continuación:

3.2.1.- *KRAS genetic variant as a prognostic factor for recurrence in resectable non-small cell lung cancer*

Clinical and Translational Oncology 2017.

doi:10.1007/s12094-017-1620-7. PMID: 28150169

Ivana Sullivan, Juliana Salazar, Cristina Arqueros, Marta Andrés, Ana Sebio, Margarita Majem, Justyna Szafranska, Elisabeth Martínez, David Páez, Antonio López-Pousa, Montserrat Baiget, Agustí Barnadas.

Departments of Medical Oncology, Genetics, Pathology and Thoracic Surgery.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona,
Spain.



Resumen:

Propósito: El papel, como factor pronóstico, de distintos marcadores angiogénicos es motivo de estudio con el objetivo de mejorar los resultados clínicos de los pacientes con cáncer de pulmón. Nosotros planteamos la hipótesis de que las variantes genéticas en la vía del VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) podrían ser utilizadas como marcadores pronósticos de supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) sometidos a resección pulmonar.

Métodos: Hemos evaluado la relación entre las variantes genéticas en la vía del VEGF y la supervivencia libre de recaída (SLR, objetivo principal) y la supervivencia global (SG, objetivo secundario) en 131 pacientes con CPNM estadios I-III tratados con resección quirúrgica entre 2009 y 2013. Los datos clínicos, patológicos y quirúrgicos se recogieron prospectivamente. Se seleccionaron y genotiparon veinticinco variantes en dieciséis genes en muestras tumorales mediante PCR en tiempo real. El método de Kaplan-Meier junto al test de log-rank y los modelos Cox de regresión se utilizaron para los análisis de SLR y SG.

Resultados: Con un seguimiento medio de 36 meses (mín = 2,8, máx = 67,4), se documentaron 31 recaídas (24%) y 31 muertes (24%). Globalmente, la mediana de SLR no se alcanzó y la mediana de SG fue de 65 meses [95% intervalo de confianza (IC) 56-75]. Las variantes *KRAS* rs1137282 y *PIK3C2A* rs4356203 se asociaron significativamente con la SLR. Para *KRAS* rs1137282, la SLR a los 3 años fue del 76% [95% IC 64-84%] en los pacientes con un genotipo A/A comparado con el 53% [95% IC 37-69%] en los pacientes con un genotipo A/G o G/G ($p = 0,02$). Para *PIK3C2A* rs4356203, los pacientes con un genotipo A/A o A/G tuvieron una SLR a los 3 años del 72% [95% IC 58-76%], mientras que en los pacientes con un genotipo G/G fue del 49% [95% IC 28-70%] ($p = 0,02$). Estas asociaciones se mantuvieron estadísticamente significativas en el análisis multivariable.

Conclusión: Determinadas variantes genéticas en la vía del VEGF pueden estar asociadas con la recaída en pacientes con CPNM estadios I-III. Específicamente, *KRAS* rs1137282 podría considerarse como un factor pronóstico de recaída en pacientes con CPNM resecable. Si bien *PIK3C2A* rs4356203 se asoció con la SLR, son necesarios estudios adicionales de validación.

4.- DISCUSIÓN

4.1.- Estudios farmacogenéticos en el cáncer de pulmón no microcítico avanzado/metastásico

La quimioterapia basada en platino continúa siendo el tratamiento estándar para la gran mayoría de los pacientes con CPNM. Tanto en la enfermedad localmente avanzada como en la enfermedad metastásica, la quimioterapia puede administrarse como tratamiento único o en combinación con radioterapia. En la actualidad, no existen biomarcadores que ayuden a predecir ni la respuesta ni la toxicidad a estos tratamientos.

En el primer trabajo de esta tesis doctoral se plantea un análisis farmacogenético prospectivo en pacientes con CPNM localmente avanzado (estadios IIIA y IIIB) o metastásico (estadio IV) tratados con quimioterapia basada en platino. Se analizaron un total de diecisiete *SNPs* en ocho genes de las vías de reparación del ADN (*NER* y *BER*).

En nuestro trabajo los resultados se analizaron por separado de acuerdo con el estadio clínico. En el grupo de pacientes en estadio III (A y B) que recibieron QRT, las variantes genéticas en los genes *ERCC1* y *ERCC3* se asociaron con la respuesta, mientras que las variantes genéticas en el gen *ERCC2* se asociaron con el desarrollo de neumonitis aguda relacionada con RT. En el grupo de pacientes en estadio IV, la respuesta se asoció con una variante genética en el gen *ERCC4* y la supervivencia con un *SNP* en *XRCC1*.

De acuerdo a nuestros resultados, la presencia de al menos un alelo T (T/T o T/C) en el *SNP* rs11615 del gen *ERCC1* se asoció con una mayor tasa de respuesta, tanto en los pacientes en estadios IIIA y IIIB tratados con QRT, independientemente de la histología tumoral, como en los pacientes con tumores de histología escamosa en estadio IV tratados con QT.

En una revisión que incluía 90 estudios publicados entre enero de 1990 y mayo de 2009,¹⁶⁵ los autores concluyeron que, aunque la calidad de los estudios de los distintos polimorfismos es variable, un pequeño grupo de genes candidatos

(*EGFR*, *XRCC1* y *ERCC1*) son biomarcadores potenciales de los resultados clínicos de los pacientes y por lo tanto requieren estudios confirmatorios.

Para evaluar el valor predictivo de los polimorfismos en *ERCC1* y *ERCC2* en pacientes con CPNM avanzado que recibían QT basada en platino se realizó una revisión sistemática y un meta-análisis que incluyó 12 estudios.¹⁶⁶ Los resultados indicaron que la sensibilidad a este tipo de QT se asoció significativamente con el polimorfismo rs11615 del gen *ERCC1*, mientras que los SNPs rs1799793 y rs13181 del gen *ERCC2* no resultaron marcadores predictivos para este tratamiento.

Ludovini *et al.*,¹⁶⁷ analizaron retrospectivamente las correlaciones entre variantes polimórficas de los genes *ERCC1*, *XRCC3* y *ERCC2* en ADN germinal de 192 pacientes con CPNM tratados con la combinación de cisplatino y gemcitabina. Estos autores no encontraron ninguna asociación significativa entre estas variantes genéticas y la respuesta, la toxicidad o la supervivencia global.

En una cohorte de pacientes chinos con CPNM avanzado tratados con QT basada en platino, Ren *et al.*¹⁶⁸ estudiaron la asociación entre supervivencia y 12 SNPs en 9 genes reparadores del ADN. La mediana de SG fue significativamente superior en los pacientes que tenían un alelo T en el SNP rs11615 del gen *ERCC1* ($p=0.014$).

En 2012, Joerger *et al.*¹⁶⁹ realizó un estudio similar y se obtuvieron resultados totalmente contradictorios: los pacientes con al menos un alelo T en este SNP del gen *ERCC1* presentaban una peor tasa de respuesta y menores supervivencias tanto libre de progresión como global.

Siguiendo con nuestros resultados, en el grupo de pacientes en estadio III que recibieron QRT, aquellos con al menos un alelo G (G/G o A/G) en el SNP rs3738948 del gen *ERCC3* presentaron mayores tasas de respuesta en comparación con los pacientes con un genotipo A/A.

La asociación entre la tasa de respuesta y las variantes en *ERCC1* y *ERCC3* en los pacientes en estadio III, pero no en estadio IV podría ser explicada en parte por el hecho de que los pacientes en estadio III recibieron un tratamiento

combinado de QRT. Con respecto al papel biológico de estas variantes: i) *ERCC1* (rs11615, p.Asn118Asn) se asocia con una baja expresión de mRNA y por ende de los niveles de proteína. Esta situación puede explicarse por la reducción del 50% en el funcionamiento del codón 118 resultante del cambio de nucleótidos en este punto;¹⁷⁰ ii) El SNP rs3738948 en el gen *ERCC3* tiene una alta puntuación en *Regulome DB* lo que indicaría que esta variante se localiza en una región no funcional. Sin embargo, el SNP está en desequilibrio de ligamiento con otro SNP intrónico (rs2134794, $r^2 = 1.0$) que es capaz de modificar la actividad de elementos que regulan el *splicing* (*ISRE, intronic splicing regulatory element*).

En nuestro grupo de pacientes en estadio III reportamos dos variantes genéticas en el gen *ERCC2* (rs1799793; p.Asp312Asn y rs13181; p.Lys751Gln) que se asociaron con el desarrollo de neumonitis aguda por RT. En el caso del SNP rs1799793, aquellos pacientes que presentaban al menos un alelo A (A/A o G/A) desarrollaron mayor toxicidad. Mientras que la presencia de al menos un alelo A (A/A o A/C) en el SNP rs13181 tuvo un efecto protector en cuanto al desarrollo de dicha toxicidad. Estudios previos sugieren que estas variantes genéticas en el gen *ERCC2* podrían alterar su producción proteica y por ende su capacidad de reparación del daño al ADN inducido por rayos X.^{138,139} Estos resultados farmacogenéticos relacionados con la toxicidad por radioterapia se describen por primera vez en el primer trabajo motivo de esta tesis.

En el grupo de pacientes en estadio IV, hemos encontrado una asociación entre polimorfismos en dos genes y los resultados clínicos: *ERCC4* (rs1799801; p.Ser835Ser) asociado con la respuesta y *XRCC1* (rs3213239) asociado con la supervivencia.

Aquellos pacientes con un genotipo T/T en el SNP rs1799801 de *ERCC4* mostraron una menor tasa de respuesta a QT que aquellos con un genotipo T/C o C/C. Si bien el SNP rs1799801 en *ERCC4* se ha relacionado con el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón,^{171,172} en nuestro trabajo lo proponemos como un biomarcador potencial de respuesta a la QT basada en platino en pacientes con

CPNM.

La variante rs3213239 en el gen *XRCC1* consiste en un polimorfismo de inserción/deleción de cuatro nucleótidos (c.-1450_-1449insGGCC) que se localiza en la región promotora del gen. El grupo de pacientes portadores del alelo de inserción (ins/ins e ins/del) presentaron una SLP y SG inferiores en comparación con aquellos pacientes que mostraban una doble delección en este SNP. Aunque el papel biológico de la variante es desconocido en seres humanos, los datos *in silico* indican que crea un dominio de unión al ADN de tipo *ROX1* (Represor de hipOXia) que es funcionalmente relevante en *Drosophila* y levadura.

Este primer trabajo pone de manifiesto la complejidad de los mecanismos involucrados en la reparación del daño del ADN ocasionado, ya sea por la quimioterapia basada en platino, por la radioterapia o por la combinación de ambos. Para definir el papel de cada uno de estos polimorfismos como potenciales biomarcadores de respuesta o toxicidad a los tratamientos es necesaria la inclusión de estudios farmacogenéticos en el diseño de los ensayos clínicos en pacientes con cáncer de pulmón.

4.2.- Estudio de la vía del *VEGF* en el cáncer de pulmón no microcítico resecable

Una escasa proporción de pacientes con CPNM se diagnostican en una etapa temprana de la enfermedad y son tributarios de un tratamiento quirúrgico con intención radical. A pesar de ello, muchos desarrollan una recidiva y acaban falleciendo como consecuencia de ello.¹⁷³ En casos seleccionados está indicado además la administración de un tratamiento complementario teniendo en cuenta factores pronósticos establecidos.^{117,174} Este suele incluir quimioterapia basada en platino asociada o no a radioterapia. Sin embargo, la supervivencia de los pacientes con una enfermedad similar varía y es por ello que existe la necesidad de hallar marcadores moleculares pronósticos con el objetivo de mejorar la supervivencia de estos pacientes.

En el segundo trabajo motivo de esta tesis, hemos seleccionado una cohorte de pacientes con CPNM que recibieron una cirugía como primer tratamiento y hemos evaluado la asociación de veinticinco variantes genéticas en dieciséis genes candidatos de la vía del *VEGF* con las supervivencias libre de recidiva (SLR) y global (SG).

Nuestros resultados indican que los SNPs rs1137282 y rs4356203, localizados en los genes *KRAS* y *PIK3C2A* respectivamente, se asociaron con la SLR.

Para la variante rs1137282 del gen *KRAS*, reportamos que aquellos pacientes con un genotipo A/A presentaron una SLR superior que aquellos pacientes con al menos un alelo G (A/G o G/G). Además, los pacientes con un genotipo A/A o A/G un el SNP rs4356203 del gen *PIK3C2A* presentaron una SLR superior que aquellos pacientes con genotipo G/G.

Los estudios que han investigado los polimorfismos de la vía del *VEGF* en relación con los resultados clínicos en pacientes con CPNM resecado son escasos y contradictorios.

Heist *et al.*¹⁶⁴ evaluaron la asociación entre tres polimorfismos en el gen *VEGF* (rs3025039, rs833061 y rs2010963) y la supervivencia en pacientes con

CPNM en estadio precoz (IA-IIB) encontrando una asociación entre uno de ellos (rs2010963) y la SG. En un estudio posterior efectuado en una cohorte de pacientes chinos con CPNM en estadios I-IV, se asociaron dos variantes en el gen *VEGF* (rs3025039 y rs3025040) con la supervivencia en el análisis univariable pero no en el multivariable.¹⁷⁵

Una revisión sistemática y meta-análisis analizando variantes de *VEGF* como factores pronósticos y farmacogenéticos en cáncer fue publicada en 2012 y actualizada al año siguiente.^{176,177} De los cinco polimorfismos más evaluados, los autores encuentran una asociación entre el rs2010963 en el gen *VEGF* y la SG. Sin embargo, debemos tener en cuenta que este resultado proviene de un análisis que incluyó diferentes tipos de cáncer y que el análisis genotípico fue realizado en ADN obtenido de diferentes tejidos. En nuestro estudio, donde hemos analizado el ADN a partir de muestras de tumor obtenidas durante el proceso quirúrgico, no hemos replicado este resultado.

Recientemente Glubb *et al.*¹⁷⁸ analizaron la asociación entre 53 polimorfismos en la vía del *VEGF* y la supervivencia en una cohorte de 150 pacientes europeos con CPNM en estadios I-III validando posteriormente los resultados en una cohorte independiente de características similares. Estos autores reportaron que dos SNPs en el gen *FLT1* (rs7996030 y rs9582036) y tres SNPs en el gen *KRAS* (rs10842513, rs12813551 y rs10505980) se asociaron con la SLR en la cohorte inicial. Solo la asociación entre la variante rs9582036 en el gen *FLT1* y la SLR fue confirmada en la cohorte de replicación. Nuestro estudio, que se llevó a cabo en pacientes de la misma raza, mismos estadios (I-III A), idéntico tratamiento inicial (cirugía) y similar análisis genotípico, no ha confirmado la asociación entre esta variante en el gen *FLT1* y las supervivencias.

En nuestro trabajo se han incluido otras tres variantes en el gen *KRAS* y los resultados obtenidos muestran la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre el SNP rs1137282 y la SLR tanto en el análisis univariable como en el multivariable. El mecanismo biológico que subyace en esta asociación es

actualmente desconocido. Sin embargo, experimentos *in vitro*, han mostrado que el alelo menor de este SNP se asocia con un aumento significativo de la actividad de la luciferasa y, además, mediante el análisis *in silico* se determinó que este SNP crea una secuencia potenciadora de *splicing* y destruye la secuencia silenciadora de dicho mecanismo.¹⁷⁹

El gen *KRAS*, miembro de la familia de oncogenes “*RAS*”, juega un papel crítico en las vías de señalización tisular y las mutaciones en este gen son, por lo tanto, cruciales en el desarrollo de varios tipos de cáncer.^{180,181} Se ha reportado la existencia de distintas mutaciones en este gen en alrededor del 30% de CPNM de histología no-escamosa.^{182,183} Si bien estas mutaciones se consideran como factores predictivos negativos de eficacia en aquellos pacientes con CPNM tratados con moléculas inhibidoras de la tirosina quinasa, su valor como factor pronóstico sigue siendo controvertido.^{184,185}

Hasta la fecha no hay estudios que relacionen polimorfismos en el gen *KRAS* con los resultados clínicos en cáncer de pulmón. Estudios previos reportaron una asociación entre los polimorfismos en el SNP rs1137282 de *KRAS* y los resultados en otros tipos de cáncer. Por ejemplo, polimorfismos en *KRAS* fueron analizados en 47 muestras quirúrgicas de pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello en estadio I-IVA y contradictoriamente a lo que observamos en nuestro estudio, aquellos pacientes con un genotipo A/G parecían tener un mejor resultado clínico.¹⁸⁶ Yuan *et al.* especularon que el polimorfismo rs1137282 en *KRAS*, así como otros SNPs en otros genes de expresión, podrían ser utilizados como biomarcadores para el diagnóstico y tratamiento en el cáncer de mama.¹⁸⁷

En este entorno de incertidumbre, la variante rs1137282 en el gen *KRAS* debería ser analizada en estudios con un mayor tamaño muestral para confirmar el posible papel como factor pronóstico en el CPNM, en particular en el escenario de la enfermedad resecable.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que existe una asociación estadísticamente significativa entre el rs4356203 en el gen *PIK3C2A* y la

supervivencia libre de recidiva en CPNM. Este hallazgo necesita confirmarse en estudios posteriores.

Las variantes en los genes relacionados con la vía del *VEGF* podrían estar asociadas con la supervivencia en CPNM en estadios I-III. La inclusión de estas variantes en estudios clínicos prospectivos sería de utilidad no sólo en la búsqueda de marcadores pronósticos, sino también de marcadores predictivos de eficacia a los fármacos antiangiogénicos en el escenario del tratamiento adyuvante en el cáncer de pulmón.

5.- CONCLUSIONES

En relación a la evaluación de las variantes genéticas en genes de las vías de reparación del ADN como marcadores farmacogenéticos de respuesta y/o toxicidad en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con quimioterapia basada en platino asociada o no a radioterapia, las conclusiones son las siguientes:

1. En los pacientes en estadio III (A y B), la respuesta se asocia con los polimorfismos rs11615 y rs3738948 en los genes *ERCC1* y *ERCC3*, respectivamente.
2. En los pacientes en estadio III (A y B), la toxicidad derivada de la radioterapia se correlaciona con los polimorfismos rs1799793 y rs13181 en el gen *ERCC2*.
3. En pacientes en estadio IV, la respuesta se asocia con la variante genética rs1799801 en el gen *ERCC4*.
4. En pacientes en estadio IV, la supervivencia global se asocia con la variante genética rs3213239 en el gen *XRCC1*.

En relación a la evaluación de las variantes genéticas en genes involucrados en la vía del factor de crecimiento endotelial vascular como marcadores pronósticos de supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico resecado, las conclusiones son las siguientes:

1. La variante genética rs1137282 del gen *KRAS* se asocia con la supervivencia libre de recidiva.
2. La variante genética rs4356203 del gen *PIK3C2A* se asocia con la supervivencia libre de recidiva.
3. No se ha evidenciado ninguna asociación estadísticamente significativa entre los 25 polimorfismos en los 16 genes analizados y la supervivencia global.

6.- BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359-386 (2015).
2. Herbst, R. S., Heymach, J. V. & Lippman, S. M. Lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1367–1380 (2008).
3. Alberg, A. J. & Samet, J. M. Epidemiology of lung cancer. *Chest* **123**, 21S–49S (2003).
4. Samet, J. M. Health benefits of smoking cessation. *Clin. Chest Med.* **12**, 669–679 (1991).
5. Newcomb, P. A. & Carbone, P. P. The health consequences of smoking. *Cancer. Med. Clin. North Am.* **76**, 305–331 (1992).
6. Parsons, A., Daley, A., Begh, R. & Aveyard, P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ* **340**, b5569 (2010).
7. Godtfredsen, N. S., Prescott, E. & Osler, M. Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *JAMA* **294**, 1505–1510 (2005).
8. Janerich, D. T. *et al.* Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N. Engl. J. Med.* **323**, 632–636 (1990).
9. Mahabir, S. *et al.* Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. *Int. J. Cancer* **120**, 1108–1115 (2007).
10. Menzies, G. E., Reed, S. H., Brancale, A. & Lewis, P. D. Base damage, local sequence context and TP53 mutation hotspots: a molecular dynamics study of benzo[a]pyrene induced DNA distortion and mutability. *Nucleic Acids Res.* **43**, 9133–9146 (2015).
11. Pope, C. A. *et al.* Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 669–674 (1995).
12. Olsson, A. C. *et al.* Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analysis from case-control studies in Europe and Canada. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 941–948 (2011).
13. Grosche, B., Kreuzer, M., Kreisheimer, M., Schnelzer, M. & Tschense, A. Lung cancer risk among German male uranium miners: a cohort study, 1946–1998. *Br. J. Cancer* **95**, 1280–1287 (2006).
14. Darby, S. *et al.* Risk of lung cancer associated with residential radon exposure in south-west England: a case-control study. *Br. J. Cancer* **78**, 394–408 (1998).
15. Torres-Durán, M. *et al.* Residential radon and lung cancer characteristics in never smokers. *Int. J. Radiat. Biol.* **91**, 605–610 (2015).
16. Hughes, J. M. & Weill, H. Asbestos exposure--quantitative assessment of risk. *Am. Rev. Respir. Dis.* **133**, 5–13 (1986).

17. Olsson, A. C. *et al.* Exposure-Response Analyses of Asbestos and Lung Cancer Subtypes in a Pooled Analysis of Case-Control Studies. *Epidemiol. Camb. Mass* **28**, 288–299 (2017).
18. Landrigan, P. J. Asbestos--still a carcinogen. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1618–1619 (1998).
19. Hammond, E. C., Selikoff, I. J. & Seidman, H. Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **330**, 473–490 (1979).
20. Mossman, B. T. In vitro studies on the biologic effects of fibers: correlation with in vivo bioassays. *Environ. Health Perspect.* **88**, 319–322 (1990).
21. Miller, A. B. *et al.* Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Cancer* **108**, 269–276 (2004).
22. Nowak, R. Cancer prevention. Beta-carotene: helpful or harmful? *Science* **264**, 500–501 (1994).
23. Cutler, G. J. *et al.* Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Int. J. Cancer* **123**, 664–671 (2008).
24. Brennan, P. *et al.* Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet* **366**, 1558–1560 (2005).
25. Johansson, M. *et al.* Serum B vitamin levels and risk of lung cancer. *JAMA* **303**, 2377–2385 (2010).
26. Shekelle, R. B., Tangney, C. C., Rossof, A. H. & Stamler, J. Serum cholesterol, beta-carotene, and risk of lung cancer. *Epidemiol. Camb. Mass* **3**, 282–287 (1992).
27. Olson, J. E. *et al.* Differential association of body mass index and fat distribution with three major histologic types of lung cancer: evidence from a cohort of older women. *Am. J. Epidemiol.* **156**, 606–615 (2002).
28. Brenner, D. R. *et al.* Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am. J. Epidemiol.* **176**, 573–585 (2012).
29. Kaufman, E. L., Jacobson, J. S., Hershman, D. L., Desai, M. & Neugut, A. I. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **26**, 392–398 (2008).
30. Matakidou, A., Eisen, T. & Houlston, R. S. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br. J. Cancer* **93**, 825–833 (2005).
31. Travis, W. D. *et al.* International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary

- classification of lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 244–285 (2011).
32. Travis, W. D. *et al.* The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1243–1260 (2015).
33. Ost, D. E., Yeung, S.-C. J., Tanoue, L. T. & Gould, M. K. Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **143**, e121S–41S (2013).
34. Buccheri, G. & Ferrigno, D. Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur. Respir. J.* **24**, 898–904 (2004).
35. Rivera, M. P., Mehta, A. C. & Wahidi, M. M. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* **143**, e142S–65S (2013).
36. Álvarez, F. V. *et al.* Recommendations of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery on the diagnosis and treatment of non-small-cell lung cancer. *Arch. Bronconeumol.* **52 Suppl 1**, 2–62 (2016).
37. Herth, F. J. F., Eberhardt, R., Vilman, P., Krasnik, M. & Ernst, A. Real-time endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for sampling mediastinal lymph nodes. *Thorax* **61**, 795–798 (2006).
38. Vilman, P. *et al.* Combined endobronchial and esophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European Respiratory Society (ERS) and the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *Endoscopy* **47**, 545–559 (2015).
39. D'Urso, V. *et al.* Sputum analysis: non-invasive early lung cancer detection. *J. Cell. Physiol.* **228**, 945–951 (2013).
40. Hammoud, Z. T. *et al.* The current role of mediastinoscopy in the evaluation of thoracic disease. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **118**, 894–899 (1999).
41. Goldstraw, P. *et al.* The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **11**, 39–51 (2016).
42. Billingham, L. J. & Cullen, M. H. The benefits of chemotherapy in patient subgroups with unresectable non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **12**, 1671–1675 (2001).
43. Sculier, J. P. *et al.* Chemotherapy improves low performance status lung cancer patients. *Eur. Respir. J.* **30**, 1186–1192 (2007).
44. Nakamura, H. *et al.* Female gender is an independent prognostic factor in non-

- small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **17**, 469–480 (2011).
45. 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.* **350**, 2129–2139 (2004).
 46. Paez, J. G. *et al.* EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* **304**, 1497–1500 (2004).
 47. 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.* **101**, 13306–13311 (2004).
 48. Kris, M. G. *et al.* Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* **311**, 1998–2006 (2014).
 49. Barlesi, F. *et al.* Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet* **387**, 1415–1426 (2016).
 50. Mok, T. S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl. J. Med.* **361**, 947–957 (2009).
 51. Han, J.-Y. *et al.* First-SIGNAL: first-line single-agent iressa versus gemcitabine and cisplatin trial in never-smokers with adenocarcinoma of the lung. *J. Clin. Oncol.* **30**, 1122–1128 (2012).
 52. Inoue, A. *et al.* Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Ann. Oncol.* **24**, 54–59 (2013).
 53. Maemondo, M. *et al.* Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N. Engl. J. Med.* **362**, 2380–2388 (2010).
 54. Mitsudomi, T. *et al.* Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **11**, 121–128 (2010).
 55. 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.* **13**, 239–246 (2012).
 56. 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.* **31**, 3327–3334 (2013).
 57. Wu, Y.-L. *et al.* Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment

- of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **15**, 213–222 (2014).
58. Yu, H. A. *et al.* Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin. Cancer Res.* **19**, 2240–2247 (2013).
 59. Gainor, J. F. & Shaw, A. T. Emerging Paradigms in the Development of Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3987–3996 (2013).
 60. Cortot, A. B. & Jänne, P. A. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur. Respir. Rev.* **23**, 356–366 (2014).
 61. Soda, M. *et al.* Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**, 561–566 (2007).
 62. Koivunen, J. P. *et al.* EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4275–4283 (2008).
 63. Shaw, A. T. *et al.* Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4247–4253 (2009).
 64. Wong, D. W.-S. *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* **115**, 1723–1733 (2009).
 65. Takahashi, T. *et al.* Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann. Surg. Oncol.* **17**, 889–897 (2010).
 66. Camidge, D. R. *et al.* Optimizing the detection of lung cancer patients harboring anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements potentially suitable for ALK inhibitor treatment. *Clin. Cancer Res.* **16**, 5581–5590 (2010).
 67. Kwak, E. L. *et al.* Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1693–1703 (2010).
 68. Ou, S.-H. I. *et al.* Activity of crizotinib (PF02341066), a dual mesenchymal–epithelial transition (MET) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor, in a non-small cell lung cancer patient with de novo MET amplification. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 942–946 (2011).
 69. Bergethon, K. *et al.* ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J. Clin. Oncol.* **30**, 863–870 (2012).
 70. Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2385–2394 (2013).
 71. Solomon, B. J. *et al.* First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2167–2177 (2014).

72. Choi, Y. L. *et al.* EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1734–1739 (2010).
73. Sasaki, T. *et al.* The neuroblastoma-associated F1174L ALK mutation causes resistance to an ALK kinase inhibitor in ALK-translocated cancers. *Cancer Res.* **70**, 10038–10043 (2010).
74. Sasaki, T. *et al.* A novel ALK secondary mutation and EGFR signaling cause resistance to ALK kinase inhibitors. *Cancer Res.* **71**, 6051–6060 (2011).
75. Katayama, R. *et al.* Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers. *Sci. Transl. Med.* **4**, 120ra17 (2012).
76. Doebele, R. C. *et al.* Mechanisms of resistance to crizotinib in patients with ALK gene rearranged non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 1472–1482 (2012).
77. Ignatius Ou, S.-H. *et al.* Next-generation sequencing reveals a Novel NSCLC ALK F1174V mutation and confirms ALK G1202R mutation confers high-level resistance to alectinib (CH5424802/RO5424802) in ALK-rearranged NSCLC patients who progressed on crizotinib. *J. Thorac. Oncol.* **9**, 549–553 (2014).
78. Shaw, A. T. *et al.* Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1189–1197 (2014).
79. Mok, T. *et al.* ASCEND-2: A single-arm, open-label, multicenter phase II study of ceritinib in adult patients (pts) with ALK-rearranged (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC) previously treated with chemotherapy and crizotinib (CRZ). *J. Clin. Oncol.* **33**, Abstract 8059 (2015).
80. Felip, E. *et al.* ASCEND-3: A single-arm, open-label, multicenter phase II study of ceritinib in ALK-naïve adult patients (pts) with ALK-rearranged (ALK+) non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* **33**, Abstract 8060 (2015).
81. Kim, D.-W. *et al.* Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 452–463 (2016).
82. Friboulet, L. *et al.* The ALK inhibitor ceritinib overcomes crizotinib resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Discov.* **4**, 662–673 (2014).
83. Rothschild, S. I. Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer-Beyond EGFR and ALK. *Cancers* **7**, 930–949 (2015).
84. Doebele, R. C. & Camidge, D. R. Targeting ALK, ROS1, and BRAF kinases. *J. Thorac. Oncol.* **7**, S375-376 (2012).
85. Planchard, D. *et al.* Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 984–993 (2016).
86. Shaw, A. T. *et al.* Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N.*

- Engl. J. Med.* **371**, 1963–1971 (2014).
87. Lim, E. *et al.* Guidelines on the radical management of patients with lung cancer. *Thorax* **65 Suppl 3**, iii1-27 (2010).
88. Scott, W. J. *et al.* Video-assisted thoracic surgery versus open lobectomy for lung cancer: a secondary analysis of data from the American College of Surgeons Oncology Group Z0030 randomized clinical trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **139**, 976-981; discussion 981-983 (2010).
89. Yan, T. D., Black, D., Bannon, P. G. & McCaughan, B. C. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2553–2562 (2009).
90. Whitson, B. A., Groth, S. S., Duval, S. J., Swanson, S. J. & Maddaus, M. A. Surgery for early-stage non-small cell lung cancer: a systematic review of the video-assisted thoracoscopic surgery versus thoracotomy approaches to lobectomy. *Ann. Thorac. Surg.* **86**, 2008-2016; discussion 2016-2018 (2008).
91. Paul, S. *et al.* Thoracoscopic lobectomy is associated with lower morbidity than open lobectomy: a propensity-matched analysis from the STS database. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **139**, 366–378 (2010).
92. Boffa, D. J., Kosinski, A. S., Paul, S., Mitchell, J. D. & Onaitis, M. Lymph node evaluation by open or video-assisted approaches in 11,500 anatomic lung cancer resections. *Ann. Thorac. Surg.* **94**, 347–353; discussion 353 (2012).
93. Paul, S., Isaacs, A. J., Treasure, T., Altorki, N. K. & Sedrakyan, A. Long term survival with thoracoscopic versus open lobectomy: propensity matched comparative analysis using SEER-Medicare database. *BMJ* **349**, g5575 (2014).
94. Ginsberg, R. J. & Rubinstein, L. V. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Ann. Thorac. Surg.* **60**, 615-622; discussion 622-623 (1995).
95. Landreneau, R. J. *et al.* Recurrence and survival outcomes after anatomic segmentectomy versus lobectomy for clinical stage I non-small-cell lung cancer: a propensity-matched analysis. *J. Clin. Oncol.* **32**, 2449–2455 (2014).
96. El-Sherif, A. *et al.* Outcomes of sublobar resection versus lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a 13-year analysis. *Ann. Thorac. Surg.* **82**, 408-415; discussion 415-416 (2006).
97. Bao, F. *et al.* Segmentectomy or lobectomy for early stage lung cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg.* **46**, 1–7 (2014).
98. Lederle, F. A. Lobectomy versus limited resection in T1 N0 lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* **62**, 1249–1250 (1996).

99. Tan, Q. *et al.* Meta-analysis for curative effect of lobectomy and segmentectomy on non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **7**, 2599–2604 (2014).
100. Zhang, Y. *et al.* Meta-analysis of lobectomy, segmentectomy, and wedge resection for stage I non-small cell lung cancer. *J. Surg. Oncol.* **111**, 334–340 (2015).
101. Shirvani, S. M. *et al.* Lobectomy, sublobar resection, and stereotactic ablative radiotherapy for early-stage non-small cell lung cancers in the elderly. *JAMA Surg.* **149**, 1244–1253 (2014).
102. James, T. W. & Faber, L. P. Indications for pneumonectomy. Pneumonectomy for malignant disease. *Chest Surg. Clin. N. Am.* **9**, 291–309, ix (1999).
103. Rosen, J. E., Hancock, J. G., Kim, A. W., Detterbeck, F. C. & Boffa, D. J. Predictors of mortality after surgical management of lung cancer in the National Cancer Database. *Ann. Thorac. Surg.* **98**, 1953–1960 (2014).
104. Thomas, P. A. *et al.* Pneumonectomy for lung cancer: contemporary national early morbidity and mortality outcomes. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **149**, 73–82 (2015).
105. Shapiro, M. *et al.* Predictors of major morbidity and mortality after pneumonectomy utilizing the Society for Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery Database. *Ann. Thorac. Surg.* **90**, 927–934; discussion 934–935 (2010).
106. Wahi, R. *et al.* Determinants of perioperative morbidity and mortality after pneumonectomy. *Ann. Thorac. Surg.* **48**, 33–37 (1989).
107. Kim, D. J., Lee, J. G., Lee, C. Y., Park, I.-K. & Chung, K. Y. Long-term survival following pneumonectomy for non-small cell lung cancer: clinical implications for follow-up care. *Chest* **132**, 178–184 (2007).
108. Ferguson, M. K. & Lehman, A. G. Sleeve lobectomy or pneumonectomy: optimal management strategy using decision analysis techniques. *Ann. Thorac. Surg.* **76**, 1782–1788 (2003).
109. Cusumano, G. *et al.* Is sleeve lobectomy comparable in terms of short- and long-term results with pneumonectomy after induction therapy? A multicenter analysis. *Ann. Thorac. Surg.* **98**, 975–983 (2014).
110. Regnard, J.-F. *et al.* Resection for tumors with carinal involvement: technical aspects, results, and prognostic factors. *Ann. Thorac. Surg.* **80**, 1841–1846 (2005).
111. Burt, M. E. *et al.* Results of surgical treatment of stage III lung cancer invading the mediastinum. *Surg. Clin. North Am.* **67**, 987–1000 (1987).
112. Yildizeli, B., Darteville, P. G., Fadel, E., Mussot, S. & Chapelier, A. Results of primary surgery with T4 non-small cell lung cancer during a 25-year period in a

- single center: the benefit is worth the risk. *Ann. Thorac. Surg.* **86**, 1065–1075; discussion 1074–1075 (2008).
113. Yang, H. *et al.* Survival and risk factors of surgically treated mediastinal invasion T4 non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* **88**, 372–378 (2009).
 114. Reardon, E. S. & Schrump, D. S. Extended resections of non-small cell lung cancers invading the aorta, pulmonary artery, left atrium, or esophagus: can they be justified? *Thorac. Surg. Clin.* **24**, 457–464 (2014).
 115. Burdett, S. S., Stewart, L. A. & Rydzewska, L. Chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006157 (2007).
 116. 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* **374**, 379–386 (2009).
 117. Burdett, S. *et al.* Adjuvant chemotherapy for resected early-stage non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD011430 (2015).
 118. Aupérin, A. *et al.* Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2181–2190 (2010).
 119. Pritchard, R. S. & Anthony, S. P. Chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone in the treatment of locally advanced, unresectable, non-small-cell lung cancer. A meta-analysis. *Ann. Intern. Med.* **125**, 723–729 (1996).
 120. Schiller, J. H. *et al.* Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **346**, 92–98 (2002).
 121. Ardizzone, A. *et al.* Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* **99**, 847–857 (2007).
 122. Scagliotti, G. V. *et al.* Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3543–3551 (2008).
 123. 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.* **31**, 2895–2902 (2013).
 124. Gervais, R. *et al.* Pemetrexed and carboplatin, an active option in first-line treatment of elderly patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase II trial. *Lung Cancer* **80**, 185–190 (2013).
 125. Soria, J.-C. *et al.* Systematic review and meta-analysis of randomised, phase

- II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **24**, 20–30 (2013).
126. Shepherd, F. A. *et al.* Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **18**, 2095–2103 (2000).
127. Hanna, N. *et al.* Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **22**, 1589–1597 (2004).
128. Di Maio, M. *et al.* Meta-analysis of single-agent chemotherapy compared with combination chemotherapy as second-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1836–1843 (2009).
129. Reck, M. *et al.* Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* **15**, 143–155 (2014).
130. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 123–135 (2015).
131. Borghaei, H. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1627–1639 (2015).
132. Herbst, R. S. *et al.* Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* **387**, 1540–1550 (2016).
133. Rittmeyer, A. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* **389**, 255–265 (2017).
134. Postel-Vinay, S. *et al.* The potential of exploiting DNA-repair defects for optimizing lung cancer treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **9**, 144–155 (2012).
135. Reed, E. ERCC1 and clinical resistance to platinum-based therapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 6100–6102 (2005).
136. Ruzzo, A. *et al.* Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **25**, 1247–1254 (2007).
137. Shirota, Y. *et al.* ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **19**, 4298–4304 (2001).
138. Lunn, R. M. *et al.* XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* **21**, 551–555 (2000).

139. Rosell, R. *et al.* Molecular predictors of response to chemotherapy in lung cancer. *Semin. Oncol.* **31**, 20–27 (2004).
140. Giovannetti, E., Toffalorio, F., De Pas, T. & Peters, G. J. Pharmacogenetics of conventional chemotherapy in non-small-cell lung cancer: a changing landscape? *Pharmacogenomics* **13**, 1073–1086 (2012).
141. Yin, J.-Y., Huang, Q., Zhao, Y.-C., Zhou, H.-H. & Liu, Z.-Q. Meta-analysis on pharmacogenetics of platinum-based chemotherapy in non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *PLoS One* **7**, e38150 (2012).
142. Folkman, J. & Shing, Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931–10934 (1992).
143. Carmeliet, P. & Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257 (2000).
144. Carmeliet, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* **9**, 653–660 (2003).
145. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
146. Stefanou, D., Goussia, A. C., Arkoumani, E. & Agnantis, N. J. Expression of vascular endothelial growth factor and the adhesion molecule E-cadherin in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* **23**, 4715–4720 (2003).
147. Zhan, P. *et al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J. Thorac. Oncol.* **4**, 1094–1103 (2009).
148. 2006 > FDA Approves New Combination Therapy for Lung Cancer. Available at: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2006/ucm108766.htm>. (Accessed: 12th June 2016)
149. European Medicines Agency - Find medicine - Avastin. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000582/human_med_000663.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. (Accessed: 12th June 2016)
150. European Medicines Agency - Find medicine - Vargatef. Available at: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/002569/human_med_001822.jsp&mid=WC0b01ac058001d124. (Accessed: 13th June 2016)
151. Guyot, M. & Pagès, G. VEGF Splicing and the Role of VEGF Splice Variants: From Physiological-Pathological Conditions to Specific Pre-mRNA Splicing. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1332**, 3–23 (2015).
152. Hicklin, D. J. & Ellis, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 1011–1027 (2005).

153. Lohela, M., Bry, M., Tammela, T. & Alitalo, K. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 154–165 (2009).
154. Koch, S. & Claesson-Welsh, L. Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a006502–a006502 (2012).
155. Jain, L. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2496–2508 (2009).
156. Maeda, A. *et al.* Influence of vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms on non-small cell lung cancer tumor angiogenesis. *Oncol. Rep.* **29**, 39–44 (2013).
157. Koukourakis, M. I. *et al.* VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **46**, 293–298 (2004).
158. Stevens, A., Soden, J., Brenchley, P. E., Ralph, S. & Ray, D. W. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res.* **63**, 812–816 (2003).
159. Gerger, A. *et al.* Pharmacogenetic angiogenesis profiling for first-line Bevacizumab plus oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5783–5792 (2011).
160. Masago, K. *et al.* Effect of vascular endothelial growth factor polymorphisms on survival in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* **100**, 1917–1922 (2009).
161. Guan, X. *et al.* Genotypes and haplotypes of the VEGF gene and survival in locally advanced non-small cell lung cancer patients treated with chemoradiotherapy. *BMC Cancer* **10**, 431 (2010).
162. Yu, W., Jiang, X., Bai, T., Lv, X. & Chang, F. Association between +936 C>T gene polymorphism of vascular endothelial growth factor and lung cancer: a meta-analysis. *Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers* **14**, 483–492 (2014).
163. de Mello, R. A. *et al.* The impact of polymorphic variations in the 5p15, 6p12, 6p21 and 15q25 Loci on the risk and prognosis of portuguese patients with non-small cell lung cancer. *PLoS One* **8**, e72373 (2013).
164. Heist, R. S. *et al.* VEGF polymorphisms and survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 856–862 (2008).
165. Horgan, A. M. *et al.* Pharmacogenetic and germline prognostic markers of lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 296–304 (2011).
166. Wei, S. *et al.* Predictive value of ERCC1 and XPD polymorphism in patients with

- advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Med. Oncol.* **28**, 315–321 (2011).
167. Ludovini, V. *et al.* Association of cytidine deaminase and xeroderma pigmentosum group D polymorphisms with response, toxicity, and survival in cisplatin/gemcitabine-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 2018–2026 (2011).
168. Ren, S. *et al.* Association between polymorphisms of DNA repair genes and survival of advanced NSCLC patients treated with platinum-based chemotherapy. *Lung Cancer* **75**, 102–109 (2012).
169. Joerger, M. *et al.* Germline polymorphisms in patients with advanced nonsmall cell lung cancer receiving first-line platinum-gemcitabine chemotherapy: a prospective clinical study. *Cancer* **118**, 2466–2475 (2012).
170. Yu, J. J. *et al.* Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int. J. Oncol.* **16**, 555–560 (2000).
171. Shi, T.-Y. *et al.* Association between XPF polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* **7**, e38606 (2012).
172. Shen, M. *et al.* Polymorphisms in the DNA nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Int. J. Cancer* **116**, 768–773 (2005).
173. Chansky, K. *et al.* The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **4**, 792–801 (2009).
174. Visbal, A. L., Leighl, N. B., Feld, R. & Shepherd, F. A. Adjuvant Chemotherapy for Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* **128**, 2933–2943 (2005).
175. Dong, J. *et al.* Polymorphisms in EGFR and VEGF contribute to non-small-cell lung cancer survival in a Chinese population. *Carcinogenesis* **31**, 1080–1086 (2010).
176. Eng, L. *et al.* Vascular endothelial growth factor pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Cancer Res.* **18**, 4526–4537 (2012).
177. Eng, L. & Liu, G. VEGF pathway polymorphisms as prognostic and pharmacogenetic factors in cancer: a 2013 update. *Pharmacogenomics* **14**, 1659–1667 (2013).
178. Glubb, D. M. *et al.* Functional FLT1 Genetic Variation is a Prognostic Factor for Recurrence in Stage I-III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 1067–1075 (2015).
179. Paré-Brunet, L. *et al.* Discovery and functional assessment of gene variants in the vascular endothelial growth factor pathway. *Hum. Mutat.* **35**, 227–235 (2014).

180. Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682–4689 (1989).
181. Vojtek, A. B. & Der, C. J. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19925–19928 (1998).
182. Rodenhuis, S. *et al.* Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N. Engl. J. Med.* **317**, 929–935 (1987).
183. Prior, I. A., Lewis, P. D. & Mattos, C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* **72**, 2457–2467 (2012).
184. Shepherd, F. A. *et al.* Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **31**, 2173–2181 (2013).
185. Wood, K., Hensing, T., Malik, R. & Salgia, R. Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA Oncol.* **2**, 805–812 (2016).
186. Wang, W.-Y., Chien, Y.-C., Wong, Y.-K., Lin, Y.-L. & Lin, J.-C. Effects of KRAS mutation and polymorphism on the risk and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* **34**, 663–666 (2012).
187. Yuan, P. *et al.* Identification of differently expressed genes with specific SNP Loci for breast cancer by the integration of SNP and gene expression profiling analyses. *Pathol. Oncol. Res.* **21**, 469–475 (2015).

