

SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN (NGS) Y ONCOLOGÍA DE PRECISIÓN

Gonzalo Recondo¹.

Resumen

La secuenciación de nueva generación es una nueva herramienta de secuenciación masiva de ADN y ARN que ha cambiado radicalmente el diagnóstico molecular del cáncer. Esta tecnología implementada de manera correcta permite seleccionar nuevos tratamientos dirigidos contra el cáncer con base en la detección de biomarcadores moleculares predictivos. En este artículo revisaremos las aplicaciones de la secuenciación de nueva generación para el diagnóstico molecular del cáncer, el monitoreo de respuesta o resistencia, así como los nuevos fármacos que se encuentran disponibles o en desarrollo para alteraciones moleculares específicas, en pro de la promoción de la oncología de precisión.

Palabras clave: *NGS; oncología; medicina de precisión.*

NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) AND PRECISION ONCOLOGY

Abstract

Next-generation sequencing is a new massive DNA and RNA sequencing tool that has radically changed cancer's molecular diagnosis. This correctly implemented technology makes it possible to select new targeted treatments against cancer-based detection of predictive molecular biomarkers. This article will review the applications of next-generation sequencing for the molecular diagnosis of cancer, the monitoring of response or resistance, and the available new drugs or in development for specific molecular alterations to promote precision oncology.

Key words: *NGS; oncology; precisión medicine.*

¹ MD PhD. Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC), Buenos Aires, Argentina.

Introducción

Por más de una década la secuenciación de nueva generación o NGS ha revolucionado el diagnóstico molecular del cáncer, abriendo nuevas oportunidades para el desarrollo de tratamientos innovadores y, como herramienta de estudio, ha permitido una mayor comprensión de la gran mayoría de los tipos de cáncer con proyectos como The Cancer Genome Atlas (TCGA) (1). También la integridad de los datos de NGS en plataformas de uso público como cBioportal y otras plataformas para clasificación de variantes y su accionabilidad como OncoKB, ClinVar y COSMIC ha facilitado el acceso a información ya curada y ordenada para la interpretación de datos (2). NGS comprende diferentes tecnologías y técnicas entre las que se incluyen la secuenciación de pequeños fragmentos en paneles génicos, la secuenciación de ARN del exoma o genoma. En este artículo nos referiremos a tecnologías de secuenciación de fragmentos cortos, tanto por métodos de secuenciación por síntesis como por ligación (3). En este proceso revisaremos las aplicaciones que tiene NGS en la oncología de precisión para el diagnóstico, monitoreo de sensibilidad y resistencia, así como las alteraciones moleculares más relevantes detectadas por NGS y las terapias dirigidas desarrolladas.

Aplicaciones de NGS en la oncología de precisión

La secuenciación de nueva generación ha impulsado el desarrollo de nuevos tratamientos con base en biomarcadores para múltiples tipos de tumores pediátricos y adultos. Con el tiempo NGS se ha convertido en una herramienta de menor costo y mayor accesibilidad para los pacientes, gracias al desarrollo de plataformas centralizadas de tests moleculares y al impulso de plataformas de secuenciación que se pueden realizar en el sitio de atención de los pacientes como hospitales académicos (3). Utilizando bajas cantidades de ADN

y ARN las diferentes plataformas de NGS permiten estudiar en simultáneo múltiples alteraciones moleculares que son potenciales blancos terapéuticos (4). Esto ha sido de especial relevancia en el tratamiento del cáncer de pulmón no escamoso, en el que el desarrollo de la medicina de precisión ha evolucionado desde el entendimiento de las mutaciones activadoras de EGFR en el 2004 hasta la actualidad en la cual se encuentran en desarrollo fármacos para alrededor de una decena de alteraciones moleculares (5,6). Adicionalmente, la secuenciación de nueva generación ha facilitado el desarrollo de tratamientos basados en alteraciones moleculares en colangiocarcinoma, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de ovario, mama, y biomarcadores llamados “tumor agnostic” o agnósticos que pueden estar presentes en diferentes tumores y son predictivos de respuesta a un tipo de fármacos.

La utilidad de la NGS tanto en tejido como en plasma es versátil, y con el solo fin de resumir algunas de sus aplicaciones hemos clasificado las instancias donde se presenta la oportunidad para estudios moleculares en cáncer en el diagnóstico, monitoreo de eficacia o progresión a tratamientos y detección de alteraciones que conllevan a resistencia a terapias dirigidas.

El estudio molecular en la práctica diaria es un hito fundamental para orientar el diagnóstico en algunos tumores como los del sistema nervioso central y sarcomas. Sin embargo, presenta una gran importancia como biomarcador para guiar el tratamiento de varios tumores. Muchos de los biomarcadores que se conocen han sido descubiertos utilizando técnicas de biología molecular de menor complejidad como pueden ser las mutaciones de *EGFR*, *BRAF* y *KIT*. Hasta hace relativamente poco tiempo, el diagnóstico de mutaciones activadoras de *EGFR* en cáncer de pulmón se hacía mediante PCR y secuenciación Sanger, lo mismo que las mutaciones de BRAF V600X en melanoma. Si bien ha sido considerado el *gold standard*, la sensibilidad de este método es baja, requiriendo que estas

alteraciones estuvieran presentes en el 20% de las células tumorales en la muestra, siendo de crucial importancia la selección de la muestra (7). Métodos más sensibles se desarrollaron luego como kits de PCR en tiempo real para detección de mutaciones puntuales e inserciones y deleciones (indels) con una sensibilidad del 5% (8). Otras alteraciones moleculares como fusiones de genes como ALK, ROS1, RET o NTRK pueden ser detectadas por otros métodos como la combinación de inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH) dependiendo del caso (9). Las alteraciones moleculares que conllevan a splicing alternativo patogénico del exón 14 del oncogén MET son más complejas de detectar por secuenciación sanger, y métodos como PCR de tiempo real (qPCR) son opciones no validadas para la identificación de pacientes que podrían beneficiarse de inhibidores selectivos de MET (10,11). Adicionalmente, con el desarrollo de inhibidores selectivos de KRAS G12C, e inhibidores potentes de EGFR/HER2 en el contexto de inserciones en el exón 20, el espectro de blancos moleculares accionables se amplía a casi el 40% de los tumores no escamosos de pulmón. La aplicación de NGS en el diagnóstico de cáncer de pulmón permite interrogar todos estos biomarcadores y otros con potenciales implicancias en un solo estudio y utilizando pequeñas cantidades de ADN. Dado que todos estos biomarcadores son necesarios en el diagnóstico molecular de pacientes con cáncer de pulmón, realizar estas determinaciones por separado consume tiempo, tejido y es más costoso. Un estudio realizado en Estados Unidos ha revelado que el uso de NGS permite ahorrar tiempo y costos en los centros que trabajan con Medicare o Medicaid y pagadores privados en ese país (12).

El beneficio de utilizar NGS y su impacto en la oncología de precisión no se traslada necesariamente a todos los tipos tumorales ni pacientes cuando se utiliza de manera global. Varios estudios han demostrado que un pequeño subgrupo de pacientes se benefician de la secuenciación masiva sin selección clínica. En el estu-

dio MOSCATO-01 del Instituto Gustave Roussy se incluyeron pacientes con cáncer avanzado que hubieran experimentado progresión de enfermedad al menos a una línea de tratamiento con biopsia suficiente para realizar NGS con panel multigénico, secuenciación de ARN (RNAseq) e hibridación genómica comparativa (aCGH) (13).

De manera similar, el estudio WINTHER exploró la utilización de NGS basado en ADN y ARN para la selección de tratamiento en pacientes con cáncer avanzado (14). Se incluyeron 303 pacientes de los cuales 107 (35%) fueron evaluables para tratamiento. De los 107 pacientes, 69 (22% del total consentido) recibieron un tratamiento basado en resultados de NGS con ADN, y 38 pacientes (12,5%) recibieron tratamiento basado en selección por NGS en ARN. Este estudio incluyó principalmente pacientes con tumores gastrointestinales, tumores de cabeza y cuello y cáncer de pulmón. La tasa de pacientes con enfermedad estable mayor a 6 meses fue del 26,2%, y 11,2% de los pacientes tratados experimentaron una respuesta parcial o completa. La mediana de sobrevida en los 107 pacientes fue de 5,9 meses (14).

Asimismo, el estudio multicéntrico I-PREDICT también evaluó la selección de tratamientos dirigidos basados en el perfil molecular de tumores de pacientes con diferentes tipos de cáncer, principalmente tumores gastrointestinales, ginecológicos y mamarios (15). En este estudio se realizó NGS a partir de tejido, plasma y expresión tisular de PD-L1. De un total de 149 pacientes incluidos, con enfermedad avanzada y progresión a tratamiento estándar, 83 recibieron tratamiento y fueron incluidos en el análisis. De ellos, 73 pacientes recibieron una terapia personalizada de acuerdo con el perfil molecular del tumor, representando el 49% de los pacientes enrolados en el estudio. Los tratamientos que fueron administrados incluyeron inmunoterapia, terapia dirigida contra la vía *ERBB*, la vía de las “mitogen-activated protein” (MAP) quinasas, vía de PI3K

y otros (15). En el estudio I-PREDICT, el 30% de los pacientes presentó control de enfermedad mayor o igual a 6 meses. En aquellos pacientes cuyos tumores tienen mayor cantidad de alteraciones tratables la tasa de control de enfermedad fue, como era esperado, superior.

Estos estudios demuestran que hay un subgrupo de pacientes que presentan un beneficio con tratamientos dirigidos cuando se utiliza una estrategia basada en el perfilado molecular extensivo de diferentes tipo de cáncer. Para estos pacientes, esto representa una oportunidad única de tratamiento, sin embargo, a nivel poblacional, la utilización de secuenciación de próxima generación en forma masiva impresiona tener un bajo impacto en beneficio en términos de supervivencia.

Si se orienta la utilización de secuenciación de próxima generación de acuerdo al tipo de patología y acceso a nuevas terapias, el impacto puede ser mayor. Si se tiene en cuenta que, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas de histología no escamosa, la prevalencia de alteraciones moleculares con blancos terapéuticos aprobados o en vías de desarrollo alcanza el 40% de la población (16). Si bien la prevalencia de alteraciones moleculares varían de acuerdo a la población y el sitio geográfico, en occidente las mutaciones de *EGFR* ocurren en alrededor del 14% de los pacientes, las mutaciones de *BRAF* en el 1-2%, rearrreglos de *ALK* en 3-7%, *ROS1* y *RET* en alrededor del 2%, “skipping” del exón 14 de *MET* en el 4%, mutaciones de *KRAS G12C* en 9-11%, inserciones en el exón 20 de *HER2* en el 2% y fusiones de *NTRK* en el 0.2% (16-18). Para todas estas alteraciones moleculares hay drogas aprobadas o en vías de aprobación con actividad clínica demostrada en estudios de fase I/II, y la identificación de los mismos es necesaria para poder ofrecer terapias.

Hay otros tipos tumorales en los que la prevalencia de alteraciones moleculares es significativa y ameri-

tan su estudio. En cáncer de vejiga, las mutaciones de *FGFR3* y fusiones de *FGFR2* o *FGFR3* ocurren en aproximadamente el 20% de los carcinomas uroteliales invasores, siendo reportado en 15% mutaciones de *FGFR3* y en 6% fusiones, siendo las más frecuentes la fusión de *FGFR3-TACC3* (19). En colangiocarcinomas intrahepáticos, las fusiones de *FGFR2* han sido reportadas en el 7% - 9%, las fusiones de *ROS1* en el 8% y mutaciones de *BRAF V500E* en el 5%. Existen drogas con clara actividad clínica para pacientes cuyos tumores presentan estas alteraciones (20). En cáncer de ovario las alteraciones en genes de la reparación homóloga como *BRCA1* y *BRCA2* ocurren de forma germinal en el 13-15% de las pacientes y en forma somática en el 7%, llevando a una alta proporción de pacientes que pueden recibir tratamientos con inhibidores de *PARP* (21). En cáncer de tiroides anaplásico la prevalencia de mutaciones de *BRAF* alcanza el 40% (22). En tumores papilares de tiroides también se reportan fusiones de *RET* (3%), *NTRK* (5%) y *ALK* (1%). En carcinoma endometriales, alrededor del 20-30% de los tumores presentan déficit de la reparación del ADN por la vía “mismatch repair” y en un 10% adicional presentan mutaciones en el gen de la polimerasa épsilon (*POLE*) que afecta la capacidad de corrección en la síntesis del ADN o función de “proofreading” (23). En ambos contextos, estos tumores presentan fenotipos “hipermutados” que los vuelven susceptibles a la muerte celular mediado por el sistema inmune cuando es estimulado con inhibidores de punto de control contra el eje *PD-L1/PD-1*. En estos tumores y otros, en los que la prevalencia de alteraciones moleculares con potenciales implicancias terapéuticas es alta, el uso de la secuenciación de próxima generación se vuelve necesaria.

Adicionalmente a blancos moleculares específicos para cada tipo tumoral, existen otras alteraciones moleculares –que de estar presentes en cualquier tipo tumoral– son considerados blancos terapéuticos “agnósticos” o tejido inespecífico. Las fusiones de *NTRK*, la

inestabilidad microsatelital por déficit de “mismatch repair” y, más recientemente y controversialmente, la alta tasa mutacional o “tumor mutational burden” han emergido como biomarcadores universales, independiente del tipo tumoral.

La importancia de la aplicación de NGS en el diagnóstico molecular radica en el rol predictivo de alteraciones moleculares específicas para el tratamiento con terapias dirigidas. También, los resultados obtenidos de estudios de NGS pueden dar información pronóstica acerca de la biología tumoral y, en algunos casos, proveer información predictiva negativa para ciertos tratamientos, es decir que posiblemente el paciente no responda a una terapia determinada de acuerdo con el perfil molecular.

Otra de las aplicaciones que potencialmente tendrá NGS es en el monitoreo de la carga de enfermedad mediante la secuenciación de ADN tumoral circulante en plasma. Esta no es una práctica estándar en la oncología al momento, sin embargo, la misma permite identificar mediante el monitoreo de las frecuencias alélicas de mutaciones somáticas tumorales el nivel de volumen de enfermedad, predecir respuesta o beneficio al tratamiento y recaídas previo a la evaluación mediante imágenes como la tomografía computarizada (24). Este modelo ha sido imitado a lo ya establecido en el seguimiento de leucemias y otras enfermedades hematológicas y ha sido demostrado en patologías como cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama entre otros (25–27).

La tercer aplicación que tiene una visión más asociada a la investigación y el desarrollo de fármacos es el estudio de mecanismos de resistencia utilizando NGS. De esta manera se han identificado múltiples alteraciones genómicas en genes que codifican proteínas que son blancos terapéuticos, impidiendo la unión del fármaco, o eluden la inhibición de señales intracelular, o generan resistencia a las inmunoterapias disponibles (28). Existen en modo general tres grupos de mecanismos prin-

cipales de resistencia a inhibidores de quinasas como blancos terapéuticos: la adquisición de mutaciones que impiden la unión del fármaco al blanco, o la amplificación del blanco, para lo cual la cantidad de droga es insuficiente para su inhibición; la activación de una vía de señalización intracelular paralela por mutaciones, amplificaciones o sobre expresión o sobre activación; y un tercer mecanismo menos conocido que implica modificaciones epigenéticas, alteraciones de la apoptosis o transformaciones histológicas (28).

El estudio sistemático de los mecanismos de resistencia mediante NGS es un desafío. En el estudio MATCH-R en curso en el Instituto Gustave Roussy de Francia, se busca identificar mecanismos de resistencia a una diversidad amplia de fármacos, incluyendo inhibidores de quinasas, inmunoterapia, inhibidores de ciclinas y hormonoterapia (29). En pacientes que experimentaron una respuesta parcial o estabilidad de enfermedad mayor o igual a 6 meses, al momento de la progresión se toma una muestra tumoral y muestras de plasma. La muestra de tumor es analizada mediante secuenciación con paneles a partir de ADN, secuenciación completa de ARN, secuenciación de exoma completo y también se deriva una porción de la biopsia para el desarrollo de modelos murinos. De un total de 333 pacientes incluidos, 303 tenían material suficiente para la realización de al menos un estudio molecular (90%). De estas muestras, se realizó NGS en el 92% de los casos, 72% secuenciación exomica completa y 71% secuenciación de ARN. De 127 pacientes tratados con una terapia blanco, a la resistencia se detectó una alteración molecular con potencial implicancias terapéuticas en 57 pacientes (45%) (29).

Más allá de este estudio que lo realiza en forma sistemática a través de distintos tipos tumorales, se ha generado una gran cantidad de evidencia acerca de los mecanismos genómicos de resistencia usando NGS que permitieron y aun permiten el desarrollo de nuevas drogas.

Alteraciones moleculares con implicancias terapéuticas detectables con NGS

Existen múltiples alteraciones moleculares que son biomarcadores de eficacia en los tratamientos actualmente aprobados o en desarrollo. Las guías de la Sociedad Europea de Oncología Clínica (ESMO) sobre el uso de NGS recomiendan hacer este tipo de estudio en cáncer de pulmón no escamoso, cáncer de colon si no es posible por PCR, en colangiocarcinomas, cáncer de ovario y búsqueda de TMB para un subtipo de tumores (cuello uterino, glándulas salivares, tiroides, tumores y cáncer de vulva) (30). Para todas estas enfermedades el panel de NGS debe incluir genes en la categoría I de “ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets” (ESCAT) (31). Las alteraciones categorizadas como “tier I” son blancos terapéuticos disponibles para diagnóstico de rutina con drogas disponibles y recomendadas para ser utilizadas con base en ese biomarcador. Un resumen de todas las alteraciones moleculares clasificadas como Tier I se presentan en la Tabla 1. A continuación se detallan algunas características biológicas y tratamientos para las alteraciones moleculares más frecuentemente diagnosticadas con tecnología de NGS.

EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es codificado por el gen *ERBB1* y es un receptor de tirosina quinasa de la familia de receptores de factores epidérmicos como HER2, HER3 y HER4. En condiciones fisiológicas, este receptor es activado mediante la unión de su ligando, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), estimulando la homodimerización (EGFR-EGFR) o heterodimerización del receptor con otro receptor (ej: EGFR-HER3), resultando en la fosforilación de su dominio tirosina quinasa y la señalización intracelular mediante adaptadores que conllevan a la activación de múltiples vías como la de MAPK, PI3K-

CA/AKT/mTOR, JAK/STAT entre otras (32). El receptor de EGFR se encuentra involucrado en múltiples tipos de cáncer, desde glioblastomas hasta carcinomas colorectales en varias alteraciones que incluyen la sobre-expresión, la amplificación y las más comúnmente conocida en cáncer de pulmón, la mutación del dominio tirosina quinasa del receptor. Las mutaciones del dominio tirosina quinasa de EGFR se encuentran comprendidas entre los exones 18-21 del mismo, siendo las “clásicamente” asociadas a sensibilidad con inhibidores de tirosina quinasa (ITQ) de EGFR caracterizadas en el año 2004 (33). Estas mutaciones son las deleciones en el exón 19 y la mutación puntual L858R en el exón 21. Otras alteraciones moleculares comprendidas en los exones 18 y 20 como mutaciones puntuales consideradas infrecuentes activan la quinasa en forma constitutiva y son también pasibles de inhibición con ITQ de EGFR.

Se han desarrollado varios ITQ de EGFR siendo los de primera generación erlotinib y gefitinib, inhibidores de segunda generación afatinib y dacomitinib y el inhibidor de tercera generación osimertinib los que están comercialmente disponibles y aprobados en nuestra región (34). En China, además se encuentra aprobado el Icotinib, que es un inhibidor de primera generación de EGFR (35). Los inhibidores de primera generación y afatinib tienen un espectro de actividad similar con tasas de respuesta que rondan entre el 62 y 84% de acuerdo al estudio, sobrevidas libre de progresión entre 8 y 13 meses y una sobrevida global de alrededor de 28 a 31 meses. En estudios comparativos no se observaron diferencias en eficacia entre inhibidores de primera generación erlotinib y gefitinib (CTONG 0901) ni entre gefitinib y afatinib (LUX-LUNG 7)(36,37). Dacomitinib, por el contrario, demostró mayor eficacia en términos de supervivencia libre de progresión y supervivencia global que gefitinib en el estudio ARCHER-1050, 14,7 meses comparado a 9,2 meses (HR 0,59; $P < 0,0001$) y 34,1 meses versus 26,8 meses (HR 0,76; $P = 0,0438$), respectivamente (38). En aquellos

Tabla 1. Resumen de los genes y alteraciones moleculares en diferentes tipos de cancer que son categorizados como Tier I por el ESCAT.

Tipo de Cáncer	Gen	Alteración molecular
Pulmón	EGFR	Mutación
	ALK	Fusión
	ROS1	Fusión
	BRAF	Mutación V600E
	MET	Exon 14 skipping Amplificación
	NTRK	Fusión
	RET	Fusión
Mama	ERBB2	Amplificación
	PI3KCA	Mutación
	BRCA1/2	Mutación
	MSI-H	Mutación/metilación
	NTRK	Fusión
Colon	KRAS	Mutación
	NRAS	Mutación
	BRAF V600E	Mutación
	MSI-H	Mutación/metilación
	NTRK	Fusión
Próstata	BRCA1/2	Mutación
	MSI-H	Mutación/metilación
Gástrico	ERBB2	Amplificación
	MSI-H	Mutación/metilación
	NTRK	Fusión
Páncreas	BRCA1/2	Mutación
	MSI-H	Mutación/metilación
	NTRK	Fusión
Hepatocelular	MSI-H	Mutación/metilación
	NTRK	Fusión
Colangiocarcinoma	IDH1	Mutación
	FGFR2	Fusión
	MSI-H	Mutación/metilación
	NTRK	Fusión

pacientes que progresan a un inhibidor de primera o segunda generación, con detección en plasma o tejido de la mutación de resistencia T790M, son candidatos a recibir tratamiento con osimertinib, el inhibidor de tercera generación (39). Recientemente, osimertinib pasó a ser un tratamiento estándar de primera línea basado en los resultados del estudio FLAURA que comparó osimertinib con inhibidores de primera generación erlotinib o gefitinib, demostrando mejoría en supervivencia libre de progresión y supervivencia global, 17,7 meses versus 9,7 meses (HR 0,45; $P < 0,001$) y 38,6 versus 31,8 meses (HR 0,79; $P = 0,046$) (40).

Las inserciones en el exón 20 de EGFR, también tienen un efecto oncogénico, resultando en una activación constitutiva del receptor por modificaciones estructurales que aumenta la afinidad de la quinasa por el ATP (41). Sin embargo, estas últimas no son susceptibles a los inhibidores comercialmente disponibles en las dosis recomendadas. Nuevos inhibidores como poziotinib, mobosertinib (TAK-788) y el uso de osimertinib al doble de dosis (160 mg) tienen actividad en este grupo de pacientes, aunque suele ser de menor impacto que las mutaciones clásicas o de sensibilidad (42). También se encuentran en desarrollo otras moléculas como Amivantamab, un anticuerpo monoclonal bi-específico MET-EGFR con resultados promisorios en este grupo de pacientes. Asimismo, se encuentra en proceso de ampliación el uso de inhibidores de EGFR en estadios más precoces mostrando beneficio en término de supervivencia libre de enfermedad en pacientes con cáncer de pulmón reseca EGFR mutados (43).

Si bien estas alteraciones moleculares pueden ser detectadas usando métodos que estudian solo EGFR como kits de PCR en tiempo real recomendados, el uso de NGS en este grupo de pacientes puede identificar otras alteraciones moleculares que pueden tener un rol pronóstico. Por ejemplo la detección concomitante de mutaciones en los genes RB1 y TP53 se asocian con un mayor riesgo de transformación histológica a

carcinoma de células pequeñas y con menor supervivencia libre de progresión (44). Lo mismo ha sido reportado con las mutaciones de TP53 y aquellos tumores con alta tasa mutaciones (TMB) (45). También, con la mayor profundidad de secuenciación con NGS es posible detectar al diagnóstico tumores que presentan poblaciones subclonales con comutación de EGFR T790M previo al inicio de tratamiento en primera línea, permitiendo la selección de estos pacientes a tratamiento con osimertinib.

En el monitoreo de respuesta y resistencia a estas terapias, el uso de NGS cobra nueva relevancia. La negativización de la detección de mutaciones de EGFR a los 3 y 6 meses de iniciado el tratamiento con inhibidores de EGFR en biopsia líquida ha sido asociada a mejor supervivencia (46). Esto puede tener implicancias futuras en el diseño de estudios que utilicen intensificación de tratamientos en pacientes que no presentan caída de la frecuencia alélica utilizando combinaciones con quimioterapia o antiangiogénicos entre otros tratamientos. En el estudio de la resistencia a osimertinib el uso de NGS probablemente tendrá un rol fundamental para seleccionar tratamientos subsecuentes. La amplificación de *MET* es un evento que ocurre entre el 5% y 15% de los tumores a la progresión con esta droga, y combinaciones de inhibidores de MET y EGFR como savolitinib con osimertinib han demostrado eficacia clínica en el estudio TATTON (47). Entre otras causas de resistencia que pueden ser identificadas con NGS están: mutaciones de resistencia como la *EGFR C797S* entre otras, fusiones de genes como *ALK* y *RET* entre otros, mutaciones de *BRAF* y otros oncogenes que activan vías de señalización paralelas a la inhibición de EGFR (48).

ALK

Los rearrreglos o fusiones que involucran el dominio tirosina quinasa de *ALK* ocurren en 3%-7% de los adenocarcinomas de pulmón, y en alrededor del 50% tu-

mores miofibroblástico inflamatorios pediátricos y del adulto. También las fusiones de *ALK* han sido reportadas ocasionalmente en otros tipos de tumores como adenocarcinoma de colon, tumores de ovario, tiroides, cerebro (49). Mutaciones en el dominio tirosina quinasa de *ALK* son otro mecanismo de activación constitutiva de este receptor y han sido descripta solo en neuroblastomas pediátricos.

Al momento se han desarrollado clínicamente seis inhibidores de *ALK*, crizotinib un inhibidor de primera generación, ceritinib, alectinib, brigatinib y ensartinib de segunda generación y el inhibidor de tercera generación, lorlatinib. El tratamiento con inhibidores de *ALK* es altamente efectivo, llevando la supervivencia de casi la mitad de los pacientes más allá de 4 años desde el diagnóstico de enfermedad metastásica (50). El primer tratamiento instaurado para este tipo de tumores fue el uso de crizotinib, también inhibidor de *ROS1* y *MET*, que demostró ser superior al tratamiento con quimioterapia. Gracias a la comprensión de los mecanismos biológicos de resistencia que desarrollaban las células tumorales como la mutación *ALK* L1196M o G1269A se desarrollaron inhibidores de segunda generación diseñados para unirse a la quinasa de *ALK* en presencia de estas mutaciones (51). De allí, el tratamiento con ceritinib, alectinib y brigatinib en pacientes que presentan progresión de enfermedad con crizotinib conlleva a una tasa de respuesta entre el 40% y 56% y sobrevida libre de progresión entre 8 y 16 meses (34). El tratamiento con lorlatinib en pacientes que progresaron a crizotinib y un inhibidor de segunda generación sería la tercera línea de elección confiriendo tasas de respuesta del 40% y sobrevida libre de progresión de 6 meses (52).

Más recientemente, el abordaje de los pacientes con tumores *ALK* dependientes a cambiado, con la evidencia clínica que los inhibidores de segunda generación conllevan a una mayor sobrevida libre de progresión, mayor control y menor incidencia de metástasis cerebrales (53,54). Lo mismo se observa con el trata-

miento en primera línea con lorlatinib, con una franca reducción del riesgo de progresión sistémica y cerebral comparado con crizotinib (55).

El monitoreo de respuesta y resistencia a inhibidores de *ALK* usando NGS también fue estudiado por varios grupos de investigación, dando lugar al descubrimiento de diversos mecanismos de resistencia a inhibidores de *ALK* (56). A diferencia de los inhibidores de *EGFR*, existen más de una decena de mutaciones de resistencia a ITQ de *ALK* con sensibilidad diferencial de acuerdo al tipo de mutación. Si bien el desarrollo de los inhibidores de *ALK* no requirió la selección molecular de las terapias con base en el perfil genómico del tumor a la resistencia, el conocimiento de los mismos puede dirigir mejor el tratamiento o estimar el potencial beneficio de una terapia. Por ejemplo, en aquellos pacientes en cuyos tumores o plasma se detectaron mutaciones de resistencia de *ALK*, la tasa de respuesta con lorlatinib fue del 60% comparado con 30% en el grupo de pacientes en los que no se identificaron mutaciones de resistencia de *ALK*, lo que sugiere que lorlatinib es francamente más activo contra tumores que presentan mecanismos de resistencia *ALK*-dependientes (57). La secuenciación de nueva generación también puede facilitar el entendimiento de la distribución alélica de mutaciones de resistencia cuando se encuentran dos o más mutaciones del dominio tirosina quinasa de *ALK*. Las mutaciones “compuestas” o en *cis* (presentes en el mismo alelo) son el principal mecanismo de resistencia a lorlatinib (58,59). Se pueden identificar si las dos mutaciones se encuentran próximas en el mismo amplicon secuenciado. Esta identificación puede tener implicancias en el futuro ya que se encuentran en desarrollo fármacos específicos contra mutaciones compuestas determinadas.

ROS1

Las fusiones que involucran el dominio tirosina quinasa de *ROS1* son menos frecuentes y rondan el 2% de los adenocarcinomas pulmonares (60). Como *ALK*, las fusiones de *ROS1* han sido descriptas en otros tumores

incluyendo colangiocarcinoma intrahepático, tumores del sistema nervioso central y sarcomas entre otros. El diagnóstico clásico se realiza por tamizaje con inmunohistoquímica y confirmación con FISH. El tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón con fusión de *ROS1* es con inhibidores de tirosina quinasa como crizotinib o entrectinib (61,62). En ambos casos, estos inhibidores confieren tasas de respuesta de alrededor del 72%-77% con supervivencia libre de progresión de 19 meses. Ya se han descrito varias mutaciones de resistencia que pueden ser detectadas por NGS en tejido o plasma que causan resistencia a estos inhibidores, pero que son susceptibles a inhibidores de nueva generación como Repotrectinib o DS-6051b (63). Es posible que en el futuro cercano seleccionemos el tratamiento subsecuente con base en estas mutaciones de resistencia, y el uso de NGS sea necesario para identificarlas.

BRAF

La mutación *BRAF* V600E, ya bien conocida por sus efectos en la biología tumoral del melanoma es también un blanco terapéutico en cáncer de pulmón, carcinoma anaplásico de tiroides, colangiocarcinomas, intrahepático y cáncer de colon. Esta mutación permite la fosforilación de BRAF y su señalización como un monómero, independiente de la activación de efectores que activen la vía de señalización de MAPK (64). Su identificación en diferentes tumores tiene implicancias terapéuticas, ya que se ha demostrado que el uso combinado de inhibidores de BRAF y MEK conllevan a tasas de respuesta significativas y control de enfermedad. Esto ha sido observado para la combinación de dabrafenib y trametinib en cáncer de pulmón, carcinomas anaplásico de tiroides y colangiocarcinomas (65-67). También los inhibidores de BRAF/MEK combinados con anticuerpos monoclonales contra EGFR son una opción de tratamiento en carcinomas colorectales BRAF mutados. Hay kits aprobados de PCR en tiempo real para el diagnóstico específico de la mutación *BRAF* V600E. Sin embargo, debido a

que en el cáncer de pulmón y colangiocarcinomas por ejemplo hay biomarcadores a estudiar, el uso de NGS permite optimizar el material de biopsia para estudiar múltiples biomarcadores en simultáneo.

La implementación de NGS en el estudio de resistencia a estos inhibidores también ha permitido identificar alteraciones moleculares en diversas vías como la vía de MAPK y PI3K/AKT/mTOR como principales causas de resistencia adquirida (ej: mutaciones de NRAS, PTEN, etc) (68). Si bien esto no ha guiado el desarrollo de nuevas terapias al momento, permite comprender mejor como deberán desarrollarse las nuevas estrategias terapéuticas en el futuro.

RET

La activación oncogénica del receptor RET se da por dos vías principalmente, las fusiones del dominio de tirosina quinasa de *RET* o mutaciones puntuales (69). Los rearrreglos de *RET* ocurren en el 5-10% de los carcinomas papilares de tiroides, en el 1-2% de los adenocarcinomas pulmonares, pero también han sido ocasionalmente detectados en cáncer de mama, colon, entre otros. Las mutaciones germinales puntuales en el dominio extracelular (síndrome MEN2A) o en el dominio de tirosina quinasa (síndrome MEN2B) se asocian a la génesis de tumores hereditarios. Las mutaciones somáticas son detectadas en alrededor del 65% de los carcinomas medulares de tiroides esporádicos, siendo los más comunes el *RET* M918T, E768D y A883F. Con el advenimiento de NGS, también se han detectado mutaciones de RET en feocromocitomas, paragangliomas, cáncer de mama, cáncer de colon y carcinoma de células de Merkel.

Existen varios inhibidores de tirosina quinasa no específicos de ret o también llamados “multiquinasa” utilizados en el tratamiento de los pacientes con cáncer de tiroides. Sin embargo, recientemente, se han desarrollado inhibidores específicos de RET como el selperca-

tinib (LOXO-292) y el pralsetinib (BLU-667) (70,71). Ambos inhibidores selectivos de RET han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón y rearrreglos de RET. La tasa de respuesta con estos inhibidores es de alrededor del 61% al 85%, dependiendo de si son dados en primera línea o luego de tratamiento con otros fármacos, con duraciones de respuesta prolongadas y actividad intracranial.

NTRK

Los rearrreglos de *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3* pueden ocurrir con frecuencias muy disímiles en un extenso repertorio de tumores, siendo considerado un marcador agnóstico predictor de eficacia a inhibidores de tirosina quinasa de NTRK (72). Las fusiones de *NTRK* son casi patognomónicas en carcinoma secretorio mamario de adultos e infantes (92% de los casos) y en el fibrosarcoma juvenil (91-100% de los casos) y los tumores salivares MASC (90-100%). Se encuentran también frecuentemente en tumores spitzoides (16%), nefroma congénito (83%); carcinomas de tiroides pediátricos (9-25%) y adultos (1,5-14%) y tumores del SNC pediátricos (10%). En tumores más prevalentes, las fusiones de *NTRK* son infrecuentes: cáncer de pulmón (0,2%), colon (1,5%), melanoma (0,3%), GIST (3,2%), colangiocarcinoma (3,2%), tumores de cerebro del adulto (0,4-3,1%). Estas alteraciones pueden ser tamizadas con inmunohistoquímica en la mayor parte de los tejidos y confirmado por FISH. Sin embargo, el uso de NGS con paneles que detectan estas fusiones permite incorporar el estudio de las mismas en el marco del estudio de otros oncogenes.

El desarrollo de los inhibidores de NTRK de primera generación, larotrectinib y entrectinib, involucró un diverso grupo de pacientes con diferentes tipos tumorales (73,74). Larotrectinib demostró unas tasas de respuesta en pacientes adultos y pediátricos del 81% con duraciones de respuestas prolongadas y buena

tolerancia. En pacientes adultos, la tasa de respuesta con entrectinib fue del 57,4% con sobrevida libre de progresión de 11,2 meses y sobrevida global de 20,9 meses. Interesantemente, debido al uso de NGS se han descubierto mutaciones de resistencia homólogas a otros genes similares como *ALK* y *ROS1*. Ya se encuentran en desarrollo fármacos como el seletrectinib y el repotrectinib para poder sobrellevar la resistencia, inducidos por el tratamiento con inhibidores de primera generación (63,75,76). Por ello, el uso de NGS al diagnóstico y la resistencia serán de gran importancia para guiar el tratamiento de estos pacientes.

FGFR

El gen del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR) se encuentra mutado en varios tumores siendo las mutaciones de *FGFR3* las más frecuentes en carcinomas uroteliales, en los que puede estar presente en hasta el 20% de las muestras, especialmente de estirpe papilar y bajo grado (19). También se identifican fusiones de *FGFR3* y *FGFR2* en esta patología. Erdafitinib es un inhibidor de FGFR1-4 selectivo aprobado para esta indicación en pacientes con carcinoma urotelial avanzado y alteraciones de *FGFR*. La tasa de respuesta con erdafitinib es del 40% y la sobrevida libre de progresión de 5,5 meses (77). Se estima que en otros 15 tumores se encuentran alteraciones de *FGFR* que podrían ser pasibles de tratamientos con este inhibidor, representando una prevalencia de este biomarcador en alrededor del 3,7% de los tumores (78). Pemigatinib también fue recientemente aprobado para el tratamiento de pacientes con colangiocarcinomas intrahepáticos que tienen fusiones de *FGFR2*. La prevalencia de esta alteración es de alrededor del 7-9% de los colangiocarcinomas, y el tratamiento con pemigatinib fue del 35% y la mediana de sobrevida libre de progresión fue de 6,5 meses (79). El estudio mediante NGS en plasma y tejido al momento de la progresión con inhibidores de FGFR ha identificado varias mutaciones de resistencia en el dominio tirosina quinasa (80). Hay múltiples

estudios evaluando el tratamiento con inhibidores de FGFR en distintos tipos tumorales (81).

MET

El oncogén *MET* participa del desarrollo y propagación de múltiples tipos diferentes de cáncer a través de varios mecanismos: el empalme patogénico o “skipping” del exón 14, mutaciones en el dominio de tirosina quinasa, la amplificación, la sobreexpresión y las fusiones que contienen el dominio tirosina quinasa de *MET* (82). Salvo la sobreexpresión, los demás son mecanismos que ocurren a nivel genómico y son todos detectables utilizando secuenciación de próxima generación. Las mutaciones o deleciones que afectan los sitios dadores y aceptores de empalme o “splicing” del exón 14 pueden ser detectados por NGS con paneles genómicos que comprendan toda la extensión del exón y sus intrones flanqueantes, permitiendo detectar las más de 100 variantes que dan como resultado un empalme patológico y pérdida del exón 14 (83). Esto es más fácilmente detectable utilizando NGS a partir de ARN como para la detección de fusiones. Mediante el uso de ARN por secuenciación de nueva generación puede detectarse esta fusión intragénica entre los exones 13-15 que es el reflejo de la pérdida del exón 14. El dominio juxtamembrana que es codificado parcialmente por exón 14 donde se contiene el residuo Y1003, que es clave para la unión de la proteína ubiquitinizadora CBL, participa en la degradación del receptor. Cuando se produce la pérdida del exón 14 y de este dominio juxtamembrana del receptor, la vida media del mismo se prolonga, resultando en señalización oncogénica. El skipping del exón 14 puede ser detectado por PCR real time también, sin embargo, este método no ha sido validado. El “skipping” del exón 14 de *MET* ocurre en alrededor del 4% de los pacientes con cáncer de pulmón, y es de suma importancia su detección ya que hay inhibidores selectivos de *MET* aprobados y en vías de aprobación para su uso en esta indicación como capmatinib y tepotinib (84). Ambos

fármacos han demostrado beneficio clínico para los pacientes, con tasas de respuesta que oscilan entre el 40 y 68% y sobrevida libre de progresión entre 5 y 9 meses de acuerdo con la línea de tratamiento en que fueron utilizados.

El uso de NGS a la progresión ha permitido identificar varios mecanismos de resistencia genómicos como mutaciones puntuales en el dominio tirosina quinasa (*MET* Y1230X, D1228X, L1195X) algunas siendo posibles de sobrellevar utilizando inhibidores de tipo II de *MET* como cabozantinib o merestinib (85). También ha permitido identificar mecanismos de activación alternativa de vías de señalización como amplificación de *EGFR*, *KRAS* y mutaciones de *KRAS* que puede orientar el desarrollo de fármacos como inhibidores duales *EGFR*-*MET*. Así, la amplificación de *MET* puede ser detectada mediante secuenciación de nueva generación, y en pacientes con cáncer de pulmón y amplificación de *MET* (definido como 10 o más copias de *MET*), datos iniciales con inhibidores selectivos han demostrado resultados promisorios. Para tumores con mutaciones puntuales en el dominio tirosina quinasa de *MET* como los clásicamente descritos carcinomas papilares renales, se encuentran en desarrollo tratamientos dirigidos, pero no son tratamientos estándar actualmente.

HER2

El oncogén *ERBB2* codifica para la proteína HER2 que se encuentra amplificada en alrededor del 25% de los cánceres de mama, liderando el desarrollo de las terapias dirigidas contra HER2 en esa patología. La amplificación de *HER2* es detectable por técnicas de inmunohistoquímica y FISH o ISH. La amplificación de *HER2* puede ser detectada en otros tumores como los adenocarcinomas gástricos, colangiocarcinomas intrahepáticos y adenocarcinomas de endometrio y cervix. En cáncer de pulmón, las inserciones o duplicaciones en el exón 20 conllevan a la activación cons-

titutiva de este receptor en 1-2% de los pacientes (86). Ha habido muchos intentos de trasladar el beneficio de los anticuerpos monoclonales y anticuerpos conjugados como trastuzumab y TDM1 en el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón e inserciones del exón 20 de *HER2* (87). Sin embargo, no se observó un beneficio clínico significativo con estos tratamientos. Recientemente el desarrollo de trastuzumab deruxtecan (DS-8201) ha demostrado señales de actividad en ese grupo de pacientes con tasas de respuesta del 62% y sobrevida libre de progresión de 14 meses en este grupo de pacientes (88,89).

KRAS

KRAS es uno de los oncogenes más frecuentemente mutados en cáncer y sin embargo, hasta ahora no había sido posible desarrollar tratamiento específicos contra este blanco. La mutación *KRAS* G12C, presente en 9-11% de los cánceres de pulmón no escamosos, de páncreas y colon, presenta una particularidad siendo que retiene capacidad de hidrólisis de GTP para pasar transitoriamente a una forma inactiva (90). También en este contexto se forma un bolsillo críptico con la cisteína en el codón 12 que es pasible de inducir un bloqueo de la quinasa en estado inactivo (unido a GDP) mediante un nuevo grupo de inhibidores covalentes. Fármacos como sotorasib (AMG 510) y adagrasib (MRTX-849) son inhibidores selectivos de *KRAS* G12C con tasas de respuesta del 32% y 45% respectivamente, reportados en la fase I/II de estos fármacos al momento (91,92). Las mutaciones de *KRAS* no eran rutinariamente estudiadas en cáncer de pulmón, pero se ha modificado debido al desarrollo de estos fármacos y la disponibilidad de ensayos clínicos para los pacientes. Las mutaciones de *KRAS* también sirven como un biomarcador pronóstico negativo en cáncer de colon para el tratamiento con anticuerpos monoclonales contra EGFR. Estas mutaciones pueden también estudiarse por PCR real time utilizando kits validados.

Carga mutacional tumoral (TMB)

El valor de la carga tumoral es discutida en la práctica clínica como un biomarcador aislado de beneficio al tratamiento con inmunoterapia con inhibidores de punto de control del eje PD-1/PD-L1 y de CTLA-4. El TMB es el número de mutaciones somáticas en regiones codificantes, no sinónimas, por megabase de ADN. Trabajos iniciales en cáncer de pulmón utilizando secuenciación de exomas mostraban un beneficio en pacientes cuyos tumores presentaban un valor alto de TMB (93). Sin embargo esto no se replicó de manera consistente en todos los escenarios, siendo un factor asociado a beneficio en algunos ensayos como el CheckMate-026 con nivolumab, el estudio MYSTIC con durvalumab, el estudio CheckMate 227 con ipilimumab y nivolumab y análisis *post hoc* del KEYNOTE 042 y 010 (94-96). Sin embargo, esto no se ha replicado en otros estudios de combinación de inmunoterapia con inmunoterapia.

El estudio KEYNOTE-158 es un estudio de fase 2 de múltiples brazos que revisó el rol de pembrolizumab en pacientes cuyos tumores (10 tipos tumorales) tenían una tasa mutacional mayor o igual a 10 mutaciones por megabase, utilizando la plataforma de Foundation Medicine (97). La tasa de respuesta en el grupo de TMB alto fue del 29% (30/102), incluyendo respuestas en pacientes con cáncer de cuello uterino, endometrio, neuroendocrinos de bajo o moderado grado, tumores salivares, carcinoma de células pequeñas de pulmón, cáncer de tiroides y vulva. En pacientes con tumores anales, biliares y mesotelioma la tasa de respuesta fue mayor en tumores con TMB bajo. La FDA aprobó el uso de pembrolizumab en tumores con más de 10 mutaciones por megabase de TMB independiente del tipo de tumor, si bien solo estaban incluidos ciertos subtipos tumorales en el estudio.

Uno de los principales desafíos del TMB es la falta de armonización entre las diferentes plataformas. Aunque

se están llevando a cabo esfuerzos para hacerlo, aquellos paneles que no realizan secuenciación germinal en simultáneo con el tumor tienden a reportar valores de TMB más bajos que quienes filtran por variantes germinales (98) 297. Lo que sí es consistente a través de los diferentes estudios es la pobre correlación entre el TMB y la expresión de PD-L1, lo que los convierten en biomarcadores independientes y complementarios a la hora de decidir tratamientos (99).

Desafíos para la implementación de NGS en Latinoamérica

Aun cuando todo lo anteriormente reportado denota un escenario ideal de acceso a secuenciación masiva y tratamientos innovadores, en nuestra región existen severas disparidades en el acceso a la atención oncológica, al diagnóstico histológico y tratamientos estándares (100). Las tecnologías para la implementación de secuenciación de nueva generación no está ampliamente disponible en el continente, si bien hay equipamientos distribuidos en las grandes urbes que permiten este estudio. También se encuentran disponibles plataformas internacionales de secuenciación como Foundation Medicine, Caris y otras. Sin embargo, el valor que tienen estos estudios puede rondar los USD\$3.000 - USD\$4.000, que constituyen un alto costo a pagar para la mayoría de los pacientes en países en vías de desarrollo como son la mayoría en nuestro continente. También, la interpretación de estos resultados requiere del trabajo en equipo y el desarrollo de comités moleculares para poder evaluar la patogenicidad y accionabilidad de estas alteraciones moleculares y abocar o dirigir al paciente al mejor tratamiento disponible (101).

Conflictos de interés

El autor funge como consultor/asesor de Amgen, Pfizer, Roche.

Financiación de la investigación

Amgen. Becas de viaje: AstraZeneca, Pfizer.

Conclusiones

La secuenciación de nueva generación es una herramienta fundamental para el diagnóstico molecular moderno, permitiendo identificar en los tumores o plasma de las personas con cáncer alteraciones moleculares que permiten dirigir con precisión el tratamiento oncológico. Esta implementación tecnológica debe ser hecha de manera accesible y en condiciones en las que el acceso de los pacientes a los medicamentos aprobados, a ensayo clínicos y a moléculas en uso compasivo sea posible.

Referencias

1. Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KRM, Ozenberger BA, Ellrott K et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet.* 2013;45(10):1113–20.
2. Li X, Warner JL. A Review of Precision Oncology Knowledgebases for Determining the Clinical Actionability of Genetic Variants. *Front cell Dev Biol.* 2020;8:48.
3. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333–51.
4. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med.* 2017;23(6):703–13.
5. Shames DS, Wistuba II. The evolving genomic classification of lung cancer. *J Pathol.* 2014;232(2):121–33.
6. Inamura K. Update on Immunohistochemistry for the Diagnosis of Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2018;10(3):72.
7. Tsiatis AC, Norris-Kirby A, Rich RG, Hafez MJ, Gocke CD, Eshleman JR, et al. Comparison of Sanger sequencing, pyrosequencing, and melting curve analysis for the detection of KRAS mutations: diagnostic and clinical implications. *J Mol Diagn.* 2010;12(4):425–32.
8. Normanno N, Denis MG, Thress KS, Ratcliffe M, Reck M. Guide to detecting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in ctDNA of patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(7):12501–16.

9. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the . *J Clin Oncol*. 2018;36(9):911–9.
10. Guo R, Berry LD, Aisner DL, Sheren J, Boyle T, Bunn PAJ, et al. MET IHC Is a Poor Screen for MET Amplification or MET Exon 14 Mutations in Lung Adenocarcinomas: Data from a Tri-Institutional Cohort of the Lung Cancer Mutation Consortium. *J Thorac Oncol*. 2019;14(9):1666–71.
11. Descarpentries C, Lepretre F, Escande F, Kherrouche Z, Figeac M, Sebda S et al. Optimization of Routine Testing for MET Exon 14 Splice Site Mutations in NSCLC Patients. *J Thorac Oncol*. 2018;13(12):1873–83.
12. Pennell NA, Mutebi A, Zhou Z-Y, Ricculli ML, Tang W, Wang H, et al. Economic Impact of Next-Generation Sequencing Versus Single-Gene Testing to Detect Genomic Alterations in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer Using a Decision Analytic Model. *JCO Precis Oncol*. 2019;3(3):1–9.
13. Massard C, Michiels S, Ferte C, Le Deley M-C, Lacroix L, Hollebecque A, et al. High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov*. 2017;7(6):586–95.
14. Rodon J, Soria J-C, Berger R, Miller WH, Rubin E, Kugel A, et al. Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial. *Nat Med*. 2019;25(5):751–8.
15. Sicklick JK, Kato S, Okamura R, Schwaederle M, Hahn ME, Williams CB, et al. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study. *Nat Med*. 2019;25(5):744–50.
16. Jordan EJ, Kim HR, Arcila ME, Barron D, Chakravarty D, Gao J, et al. Prospective Comprehensive Molecular Characterization of Lung Adenocarcinomas for Efficient Patient Matching to Approved and Emerging Therapies. *Cancer Discov*. 2017;7(6):596–609.
17. Sholl LM, Aisner DL, Varella-Garcia M, Berry LD, Dias-Santagata D, Wistuba II et al. Multi-institutional Oncogenic Driver Mutation Analysis in Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2015;10(5):768–777.
18. Barlesi F, Mazieres J, Merlio J-P, Debievre D, Mosser J, Lena H 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* . 2016;387(10026):1415-1426.
19. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(1):25–41.
20. Lamarca A, Kapacee Z, Breeze M, Bell C, Belcher D, Staiger H et al. Molecular Profiling in Daily Clinical Practice: Practicalities in Advanced Cholangiocarcinoma and Other Biliary Tract Cancers. *J Clin Med*. 2020;9(9):2854.
21. Konstantinopoulos PA, Norquist B, Lacchetti C, Armstrong D, Grisham RN, Goodfellow PJ et al. Germline and Somatic Tumor Testing in Epithelial Ovarian Cancer: ASCO Guideline. *J Clin Oncol*. 2020;38(11):1222–45.
22. Yoo S-K, Song YS, Lee EK, Hwang J, Kim HH, Jung G, et al. Integrative analysis of genomic and transcriptomic characteristics associated with progression of aggressive thyroid cancer. *Nat Commun*. 2019;10(1):2764.
23. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N et al. A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers. *Br J Cancer*. 2015;113(2):299–310.
24. Chang Y, Tolani B, Nie X, Zhi X, Hu M, He B. Review of the clinical applications and technological advances of circulating tumor DNA in cancer monitoring. *Ther Clin Risk Manag*. 2017;13:1363–74.
25. Jiang J, Adams H-P, Lange M, Siemann S, Feldkamp M, McNamara S et al. Plasma-based longitudinal mutation monitoring as a potential predictor of disease progression in subjects with adenocarcinoma in advanced non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2020;20(1):885.
26. Tarazona N, Gimeno-Valiente F, Gambardella V, Zuñiga S, Rentero-Garrido P, Huerta M et al. Targeted next-generation sequencing of circulating-tumor DNA for tracking minimal residual disease in localized colon cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(11):1804–12.
27. Kang J-K, Heo S, Kim H-P, Song S-H, Yun H, Han S-W et al. Liquid biopsy-based tumor profiling for metastatic colorectal cancer patients with ultra-deep targeted sequencing. *PLoS One* . 2020;15(5):e0232754.
28. Rotow J, Bivona TG. Understanding and targeting resistance mechanisms in NSCLC. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(11):637–58.
29. Recondo G, Mahjoubi L, Maillard A, Loriot Y, Bigot L, Facchinetti F et al. Feasibility and first reports of the MATCH-R repeated biopsy trial at Gustave Roussy. *NPJ Precis Oncol*. 2020;4:27.
30. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2020;(11):1491-505.
31. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol*. 2018;29(9):1895–902.

32. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;59(2 Suppl):21–6.
33. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497–500.
34. Recondo G, Facchinetti F, Olausson KA, Besse B, Friboulet L. Making the first move in EGFR-driven or ALK-driven NSCLC: first-generation or next-generation TKI? *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(11):694–708.
35. Shi Y, Zhang L, Liu X, Zhou C, Zhang L, Zhang S et al. Icotinib versus gefitinib in previously treated advanced non-small-cell lung cancer (ICOGEN): a randomised, double-blind phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(10):953–61.
36. Yang JJ, Zhou Q, Yan HH, Zhang XC, Chen HJ, Tu HY et al. A phase III randomised controlled trial of erlotinib vs gefitinib in advanced non-small cell lung cancer with EGFR mutations. *Br J Cancer*. 2017;116(5):568–74.
37. Paz-Ares L, Tan E-H, O'Byrne K, Zhang L, Hirsh V, Boyer M et al. Afatinib versus gefitinib in patients with EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer: overall survival data from the phase IIb LUX-Lung 7 trial. *Ann Oncol*. 2017;28(2):270–7.
38. Mok TS, Cheng Y, Zhou X, Lee KH, Nakagawa K, Niho S et al. Improvement in Overall Survival in a Randomized Study That Compared Dacomitinib With Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer and EGFR-Activating Mutations. *J Clin Oncol*. 2018;36(22):2244–2250.
39. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017 ;376(7):629–40.
40. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med*. 2020;382(1):41–50.
41. Robichaux JP, Elamin YY, Tan Z, Carter BW, Zhang S, Liu S et al. Mechanisms and clinical activity of an EGFR and HER2 exon 20-selective kinase inhibitor in non-small cell lung cancer. *Nat Med*. 2018;24(5):638–46.
42. Remon J, Hendriks LEL, Cardona AF, Besse B. EGFR exon 20 insertions in advanced non-small cell lung cancer: A new history begins. *Cancer Treat Rev*. 2020;90:102105.
43. Wu Y-L, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1711–23.
44. Offin M, Chan JM, Tenet M, Rizvi HA, Shen R, Riely GJ et al. Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes. *J Thorac Oncol*. 2019;14(10):1784–93.
45. Offin M, Rizvi H, Tenet M, Ni A, Sanchez-Vega F, Li BT et al. Tumor Mutation Burden and Efficacy of EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin cancer Res*. 2019;25(3):1063–9.
46. Provencio-Pulla M, Serna R, Franco F, Sanchez A, García Girón C, Domine M et al. ctDNA levels before treatment predict survival in non-small cell lung cancer patients treated with a tyrosine kinase inhibitor. *J Clin Oncol*. 2020 20;38(15_suppl):9542.
47. Sequist L V, Han J-Y, Ahn M-J, Cho BC, Yu H, Kim S-W et al. Osimertinib plus savolitinib in patients with EGFR mutation-positive, MET-amplified, non-small-cell lung cancer after progression on EGFR tyrosine kinase inhibitors: interim results from a multicentre, open-label, phase 1b study. *Lancet Oncol*. 2020;21(3):373–86.
48. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2019;121(9):725–37.
49. Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(10):685–700.
50. Solomon BJ, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E et al. Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in ALK-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(22):2251–2258.
51. Katayama R, Shaw AT, Khan TM, Mino-Kenudson M, Solomon BJ, Halmos B, et al. Mechanisms of Acquired Crizotinib Resistance in ALK-Rearranged Lung Cancers. *Sci Transl Med* Febr. 2012;8(4120):120–17.
52. Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, Felip E, Soo RA, Camidge DR et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2018;19(12):1654–1667.
53. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(9):829–38.
54. Camidge DR, Kim HR, Ahn M-J, Yang JC-H, Han J-Y, Lee J-S et al. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(21):2027–2039.
55. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, Felip E, Goto Y, Liu G, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(21):2018–29.
56. Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, Friboulet L, Leshchiner I, Katayama R, et al. Molecular Mechanisms of Resistance to First- and Second-Generation ALK Inhibitors in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(10):1118–33.

57. Shaw AT, Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, Lin C-C, Soo RA et al. ALK Resistance Mutations and Efficacy of Lorlatinib in Advanced Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2019;37(16):1370–9.
58. Yoda S, Lin JJ, Lawrence MS, Burke BJ, Friboulet L, Langenbucher A et al. Sequential ALK Inhibitors Can Select for Lorlatinib-Resistant Compound ALK Mutations in ALK-Positive Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(6):714–729.
59. Recondo G, Mezquita L, Facchinetti F, Planchard D, Gazzah A, Bigot L, et al. Diverse Resistance Mechanisms to the Third-Generation ALK Inhibitor Lorlatinib in ALK-Rearranged Lung Cancer. *Clin cancer Res.* 2020;26(1):242–55.
60. Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. *Clin cancer Res.* 2013;19(15):4040–5.
61. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(21):1963–71.
62. Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, Barlesi F, Krebs MG, Shaw AT et al. Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):261–70.
63. Drilon A, Ou S-HI, Cho BC, Kim D-W, Lee J, Lin JJ et al. Repotrectinib (TPX-0005) Is a Next-Generation ROS1/TRK/ALK Inhibitor That Potently Inhibits ROS1/TRK/ALK Solvent-Front Mutations. *Cancer Discov.* 2018;8(10):1227–36.
64. Yaeger R, Corcoran RB. Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. *Cancer Discov.* 2019;9(3):329–41.
65. Planchard D, Besse B, Groen HJM, Souquet P-J, Quoix E, Baik CS 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.* 2016;17(7):984–93.
66. Subbiah V, Kreitman RJ, Wainberg ZA, Cho JY, Schellens JHM, Soria JC et al. Dabrafenib and Trametinib Treatment in Patients With Locally Advanced or Metastatic BRAF V600-Mutant Anaplastic Thyroid Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(1):7–13.
67. Subbiah V, Lassen U, Élez E, Italiano A, Curigliano G, Javle M, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAF(V600E)-mutated biliary tract cancer (ROAR): a phase 2, open-label, single-arm, multicentre basket trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(9):1234–43.
68. Ortiz-Cuaran S, Mezquita L, Swalduz A, Aldea M, Mazieres J, Leonce C et al. Circulating Tumor DNA Genomics Reveal Potential Mechanisms of Resistance to BRAF-Targeted Therapies in Patients with BRAF-Mutant Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin cancer Res.* 2020;26(23):6242–6253.
69. Subbiah V, Cote GJ. Advances in Targeting RET-Dependent Cancers. *Cancer Discov.* 2020;10(4):498–505.
70. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(9):813–24.
71. Subbiah V, Gainor JF, Rahal R, Brubaker JD, Kim JL, Maynard M et al. Precision Targeted Therapy with BLU-667 for RET-Driven Cancers. *Cancer Discov.* 2018;8(7):836–49.
72. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(12):731–47.
73. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731–9.
74. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):271–82.
75. Fuse MJ, Okada K, Oh-Hara T, Ogura H, Fujita N, Katayama R. Mechanisms of Resistance to NTRK Inhibitors and Therapeutic Strategies in NTRK1-Rearranged Cancers. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(10):2130–43.
76. Drilon A, Nagasubramanian R, Blake JF, Ku N, Tuch BB, Ebata K et al. A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2017;7(9):963–72.
77. Loriot Y, Necchi A, Park SH, Garcia-Donas J, Huddart R, Burgess E et al. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;381(4):338–48.
78. de Almeida Carvalho LM, de Oliveira Saporì Avelar S, Haslam A, Gill J, Prasad V. Estimation of Percentage of Patients With Fibroblast Growth Factor Receptor Alterations Eligible for Off-label Use of Erdafitinib. *JAMA Netw Open.* 2019;2(11):e1916091.
79. Abou-Alfa GK, Sahai V, Hollebecque A, Vaccaro G, Melisi D, Al-Rajabi R et al. Pemigatinib for previously treated, locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2020;21(5):671–84.
80. Silverman IM, Hollebecque A, Friboulet L, Owens S, Newton RC, Zhen H, et al. Clinicogenomic analysis of FGFR2-rearranged cholangiocarcinoma identifies correlates of response and mechanisms of resistance to pemigatinib. *Cancer Discov.* 2020;:CD-20-0766.
81. Facchinetti F, Hollebecque A, Bahleda R, Loriot Y, Olausen KA, Massard C, et al. Facts and New Hopes on Selective FGFR Inhibitors in Solid Tumors. *Clin cancer Res.* 2020;26(4):764–74.
82. Recondo G, Che J, Jänne PA, Awad MM. Targeting MET Dysregulation in Cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(7):922–34.

83. Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, Chmielecki J, Lu X, Bauer TM et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* 2015;5(8):850–9.
84. Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, Savukoski DO, Hall D, Shivdasani P et al. MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. *J Clin Oncol.* 2016;34(7):721–30.
85. Fujino T, Kobayashi Y, Suda K, Koga T, Nishino M, Ohara S et al. Sensitivity and Resistance of MET Exon 14 Mutations in Lung Cancer to Eight MET Tyrosine Kinase Inhibitors In Vitro. *J Thorac Oncol.* 2019;14(10):1753–1765.
86. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Roy-Chowdhuri S, Lau C, Zaidinski M et al. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(18):4910–8.
87. Li BT, Shen R, Buonocore D, Olah ZT, Ni A, Ginsberg MS et al. Ado-Trastuzumab Emtansine for Patients With HER2-Mutant Lung Cancers: Results From a Phase II Basket Trial. *J Clin Oncol.* 2018;36(24):2532–7.
88. Tsurutani J, Iwata H, Krop I, Jänne PA, Doi T, Takahashi S et al. Targeting HER2 with Trastuzumab Deruxtecan: A Dose-Expansion, Phase I Study in Multiple Advanced Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2020;10(5):688–701.
89. Smit EF, Nakagawa K, Nagasaka M, Filip E, Goto Y, Li BT et al. Trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients with HER2-mutated metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): Interim results of DESTINY-Lung01. *J Clin Oncol.* 2020;38(15_suppl):9504.
90. Moore AR, Rosenberg SC, McCormick F, Malek S. RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nat Rev Drug Discov.* 2020;19(8):533–52.
91. Hong DS, Fakih MG, Strickler JH, Desai J, Durm GA, Shapiro GI et al. KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med.* 2020;383(13):1207–17.
92. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM et al. The KRAS(G12C) Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discov.* 2020;10(1):54–71.
93. Rizvi N a., Hellmann MD, Snyder a., Kivistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348(6230):124–128.
94. Herbst RS, Lopes G, Kowalski DM, Nishio M, Wu Y-L, de Castro Junior G et al. LBA79 - Association between tissue TMB (tTMB) and clinical outcomes with pembrolizumab monotherapy (pembro) in PD-L1-positive advanced NSCLC in the KEYNOTE-010 and -042 trials. *Ann Oncol.* 2019;30:916–7.
95. Peters S, Cho BC, Reinmuth N, Lee KH, Luft A, Ahn M-J et al. Abstract CT074: Tumor mutational burden (TMB) as a biomarker of survival in metastatic non-small cell lung cancer (mNSCLC): Blood and tissue TMB analysis from MYSTIC, a Phase III study of first-line durvalumab ± tremelimumab vs chemotherapy. *Clinical Trials*2019;.
96. Sholl LM, Hirsch FR, Hwang D, Botling J, Lopez-Rios F, Bubendorf L et al. The Promises and Challenges of Tumor Mutation Burden as an Immunotherapy Biomarker: A Perspective from the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol.* 2020;15(9):1409–24.
97. Marabelle A, Fakih M, Lopez J, Shah M, Shapira-Frommer R, Nakagawa K et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol.* 2020;21(10):1353–65.
98. Vokes NI, Liu D, Ricciuti B, Jimenez-Aguilar E, Rizvi H, Dietlein F et al. Harmonization of Tumor Mutational Burden Quantification and Association With Response to Immune Checkpoint Blockade in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precis Oncol.* 2019 12;(3):1–12.
99. Lamberti G, Spurr LF, Li Y, Ricciuti B, Recondo G, Umeton R et al. Clinicopathological and genomic correlates of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2020;S0923-7534(20):36078-6.
100. Calderón-Aparicio A, Orue A. Precision oncology in Latin America: current situation, challenges and perspectives. *Ecancermedalscience.* 2019:13.
101. Kurnit KC, Dumbrava EEI, Litzemberger B, Khotskaya YB, Johnson AM, Yap TA, et al. Precision Oncology Decision Support: Current Approaches and Strategies for the Future. *Clin Cancer Res.* 2018;24(12):2719–2731.

Recibido: Noviembre 24, 2020

Aceptado: Noviembre 24, 2020

Correspondencia:

Gonzalo Recondo
grecondoh@cemic.edu.ar