



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LOS SUBTIPOS
HISTOLÓGICOS DE ADENOCARCINOMA PULMONAR

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

CAMILO MOLINA ROMERO

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Oscar Arrieta Rodríguez
INCan

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Claudia Rangel Escareño
INMEGEN

Dr. Adrián Ochoa Leyva
IBT

Ciudad de Universitaria, CDMX.

Abril, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Resumen

La clasificación histológica actual del cáncer de pulmón de la “Asociación para el estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC)/La Sociedad Americana del Tórax (ATS)/La sociedad Europea Respiratoria (ERS)” ha cambiado considerablemente el diagnóstico patológico del carcinoma pulmonar invasivo al identificar subtipos histológicos de la enfermedad que tienen implicaciones substanciales en la practica médica, marcando diferencias clínicas, radiológicas, moleculares y pronósticas de la enfermedad. En este estudio, analizamos las diferencias en expresión génica de los subtipos de adenocarcinoma (ADC) de acuerdo con esta nueva clasificación. El estudio de expresión génica por microarreglos, se realizó en una cohorte de 29 pacientes con ADC tratados del 2008 al 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de México. Todos los pacientes tenían biopsias que fueron clasificadas dentro de 4 diferentes subtipos de ADC (Clasificación de la Organización Mundial de la Salud, 2015). El patrón de crecimiento predominantemente Lepídico de ADC fue el único que exhibió una diferencia significativa en la expresión génica ($P < 0.01$) en comparación con los demás patrones predominantes. Así mismo, se identificaron 13 genes con expresión diferencial específica que podrían ser usados como firma de expresión, biomarcadores o blancos terapéuticos para el patrón de crecimiento predominantemente Lepídico de cáncer pulmonar. Los resultados de este estudio, enfatizan la importancia de la nueva clasificación propuesta por IASLC/ATS/ERS y ejemplifican el potencial clínico de correlacionar la histopatología de la enfermedad con sus características moleculares.

Abstract

The current histological classification of lung cancer of the “Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) / The American Thorax Society (ATS) / The European Respiratory Society (ERS)” has considerably changed the pathological diagnosis of invasive lung carcinoma by identifying histological subtypes of the disease that have substantial implications in medical practice, marking clinical, radiological, molecular and prognostic differences of the disease. In this study, we analyze the differences in gene expression of adenocarcinoma subtypes (ADC) according to this new classification. The study of gene expression by microarrays was carried out in a cohort of 29 patients with ADC treated from 2008 to 2011 at the National Cancer Institute (INCan) of Mexico. All patients had biopsies that were classified within 4 different subtypes of ADC (Classification of the World Health Organization, 2015). The predominantly Lepidic growth pattern of ADC was the only one that exhibited a significant difference in gene expression ($P < 0.01$) compared to the other predominant patterns. Likewise, 13 genes with specific differential expression were identified that could be used as expression signature, biomarkers or therapeutic targets for the predominantly Lepidic growth pattern of lung cancer. The results of this study emphasize the importance of the new classification proposed by IASLC / ATS / ERS and exemplify the clinical potential of correlating the histopathology of the disease with its molecular characteristics.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Índice de Tablas	4
Índice de Figuras	4
Abreviaturas y acrónimos	5
Agradecimientos	8
Introducción	9
Generalidades del Cáncer de Pulmón	9
Diagnóstico del cáncer de pulmón	10
Recomendaciones para detección de perfil mutacional	12
Nueva Clasificación del 2015 y sus diferencias con la Clasificación de del 2004	13
Subtipos Histológicos de Adenocarcinoma según la nueva clasificación de la OMS 2015.....	15
Alteraciones genéticas en el cáncer de pulmón (CP)	22
Mutaciones del gen <i>EGFR</i>	22
Mutaciones del gen <i>HER2</i>	24
Mutaciones de K-RAS	25
Translocación del gen <i>EML4-ALK</i>	25
Fusión/reordenamiento de <i>ROS1</i>	26
JAK2 y STAT3	27
Mutaciones del gen <i>BRAF</i>	28
Inhibidores de puntos de control inmunitario (IPCI).....	28
Implicaciones de la nueva clasificación	29
Hipótesis	33
Objetivos	33
Materiales y métodos	34
Diseño experimental	34
Tamaño de Muestra	34
Pacientes y muestras de tejido	34
Extracción de ARN	37
Procesamiento de muestras para el microarreglo Human Gene 1.0 ST de Affymetrix	37
Análisis de Microarreglos	38
Perfiles de expresión génica	39
Aprobación del comité de ética y consentimiento informado	40
Resultados	41
Identificación de genes con expresión diferencial	45
Expresión diferencial de genes entre los subtipos histológicos de adenocarcinoma	48
Análisis funcional y de biomarcadores	53
Firma de expresión genética del subtipo histológico lepidico	58
Discusión	61

Conclusión.....	65
Perspectivas del trabajo.....	66
Referencias:.....	68
Artículo Publicado	78

Índice de Tablas

Tabla 1. Supervivencia por subtipo histológico.	17
Tabla 2. Clasificación del cáncer de pulmón OMS 2015	20
Tabla 3. Características inmunohistoquímicas del adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas	21
Tabla 4. Características clínico-patológicas y moleculares al diagnóstico	43
Tabla 5. Biomarcadores de la comparación PAP vs LEP.....	54
Tabla 6. Biomarcadores de la comparación SOL vs LEP.....	55
Tabla 7. Biomarcadores de la comparación ACN vs LEP	56
Tabla 8. Lista de categorías de funciones biológicas de IPA	57
Tabla 9. Función e implicaciones de los genes sobre y sub expresados únicamente en el patrón LEP vs (PAP, SOL, ACN).	59

Índice de Figuras

Figura 1. Subtipos histológicos de Adenocarcinoma (ADC)	21
Figura 2. Consort.	36
Figura 3. Comparaciones pareadas PAP vs LEP, SOL vs LEP y ACN vs LEP.....	40
Figura 4. Micrografías que muestran los 4 subtipos de adenocarcinoma estudiados	42
Figura 5. Volcano plot que muestra la expresión génica diferencial en pacientes con los subtipos de adenocarcinoma de pulmón PAP vs LEP	45
Figura 6. Volcano plot que muestra la expresión génica diferencial en pacientes con los subtipos de adenocarcinoma de pulmón SOL vs LEP	46
Figura 7. Volcano plot que muestra la expresión génica diferencial en pacientes con los subtipos de adenocarcinoma de pulmón ACN vs LEP	47
Figura 8. Heatmap con los genes sub- y sobre-expresados (P<0.05) presentes en la comparación de los subtipos histológicos PAP y LEP	49

Figura 9. Heatmap con los genes sub- y sobre-expresados ($P < 0.05$) presentes en la comparación de los subtipos histológicos SOL y LEP 50

Figura 10. Heatmap con los genes sub- y sobre-expresados ($P < 0.05$) presentes en la comparación de los subtipos histológicos ACN y LEP 51

Figura 11. Diagrama de Venn que muestra los genes sobre- y sub-expresados con un patrón único de expresión para el subtipo histológico lepidico (LEP) 52

Abreviaturas y acrónimos

ACN	Acinar
ADC	Adenocarcinoma
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIS	ADC in-situ
ALK	Cinasa del linfoma anaplásico
AMI	ADC mínimamente invasivo
APOE	Apolipoproteína E
ARN	Ácido ribonucleico
ATS	Sociedad Americana del Tórax
BRAF	Homologo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf
BRD9	Proteína con bromodominios 9
c-Kit	Receptor tirosina-cinasa de KIT
CBA	Carcinoma broncoalveolar
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCG	Carcinoma de células grandes
CCP	Carcinoma de células pequeñas
Chk1	Cinasa serina/treonina Chk1
CHL1	Molécula de adhesión celular 1
CLSPN	Claspina
CP	Cáncer de Pulmón
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
CPCP	Cáncer de pulmón de células pequeñas
CTPS1	Sintasa CTP 1
dUTPs	Deoxiuridin Trifosfato
ECOG	Eastern Cooperative Group Performance Status
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
EML4	Proteína 4 similar a los microtúbulos del equinodermo
EPGN	Epigene
ERCC1	Proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1
ERS	Sociedad Europea Respiratoria
FDA	US Food and Drug Administration (Administración de Drogas y alimentos de EU)
FDR	Tasa de falsos descubrimientos
FISH	Hibridación in situ fluorescente
fx	Función
GBAP1	Pseudogén de la glucosidasa ácida beta 1
gp130	Glucoproteína 130
H&E	Tinción con hematoxilina y eosina
HER2	Factor de crecimiento epidérmico humano 2
HIST1H2HA	Grupo de histonas 1 H2ah
IASLC	Asociación Internacional para el estudio del Cáncer de Pulmón
IL-6	Interleucina 6
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
IPCI	Inhibidores de puntos de control inmunitario
JAK	Cinasa Janus
K-RAS	Protooncogén homólogo del de Kristen de sarcoma de rata Ki-ras2
KIF5B	Miembro 5B de la familia de quinesinas
LEP	Lepídico
LINC00472	ARN largo intergénico no-codificante 472
MET	Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos
MIP	Micropapilar
mTOR	Diana de rapamicina
NCCN	Red Nacional para el Estudio Integral del Cáncer
NOS	Si no se especifica otra cosa
°C	Grados centígrados
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORR	Overall Response Rate (Tasa de respuesta global)
OS	Overall Survival (Sobrevida global)
PAP	Papilar
PD1	Proteína de muerte celular programada 1
PDL-1	Ligando de la proteína de muerte celular programada 1
PET-CT	Tomografía por emisión de positrones
PIK3CA	Subunidad catalítica de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-cinasa isoforma alfa
PPL	Periplakina

RMA	Robust Multiarray Average (Promedio Robustecido del Micro-arreglo)
ROS	Protooncogén tirosina-cinasa ROS
RT-PCR	PCR en tiempo real
RTKs	Receptores tirosina-cinasa
SCC	Carcinoma de células escamosas
SNRPNP40	Ribonucleoproteína nuclear pequeña de 40kDa (U5)
SOL	Sólido
SRC	Protooncogén tirosina-cinasa Src
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TC	Tomografía computarizada
TGF	Factor de crecimiento transformante
TK	Actividad tirosina-cinasa
TKIs	Inhibidores de TKs
TMB	Carga mutacional del tumor
TTF-1	Factor de transcripción tiroideo
Tyk2	Tirosina cinasa 2
UIMC1	Motivo de interacción con ubiquitina 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VGLL3	Gen parecido al supresor vestigial 3

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México por que me dió mi carrera, mi doctorado e incontables experiencias, amigos y trabajo. Siempre me sentiré en deuda con ella.
- Al programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas por el apoyo durante todo el doctorado.
- Al programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por las oportunidades que le dio a mi trabajo de tener exposición en congresos nacionales e internacionales.
- A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Claudia Rangel Escareño, Dr. Adrián Ochoa Leyva y al Dr. Oscar Arrieta Rodriguez. Gracias por sus comentarios y apoyo.
- A los miembros del jurado que evaluaron mi trabajo: Dra. Elizabeth Langley McCarron, Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, Dr. Enrique Hernández Lemus, Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg y al Dr. Ignacio Arroyo Camacho. Gracias por sus aportaciones al trabajo.

DEDICADA A:

MI FAMILIA

A mis padres porque sin su apoyo, enseñanza y ejemplo, jamás hubiera podido lograrlo. Ustedes siempre me han hecho sentir orgulloso, espero poderles retribuir un poco con este logro.

A mi hermana Denisse porque siempre ha estado en las buenas y en las malas.

A mi esposa, porque no solo me apoyaste durante el final del camino tan difícil. También me diste fuerza y ánimo para cerrar este capítulo que tanto me ha costado. Sin tu paciencia, apoyo y amor, no lo hubiera logrado. Gracias Brystal.

Introducción

Generalidades del Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón (CP) es el cáncer más diagnosticado (11.6% del total de los casos) así como la principal causa de muerte asociada al cáncer (18.4% del total de casos) a nivel mundial [1]. A pesar de importantes esfuerzos, innovación y progreso en el diagnóstico y tratamiento, la supervivencia global a 5 años es de solo el 15% [2]. Aproximadamente el 85% de los pacientes son diagnosticados en un grupo de subtipos histológicos colectivamente denominados cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), que incluyen al adenocarcinoma (ADC) (80% de los casos), carcinoma de células escamosas (CCE) y carcinoma de células grandes (CCG) [3]. El otro 15% de los pacientes con CP, son diagnosticados con carcinoma de células pequeñas (CCP). A pesar de una mejora en la supervivencia general con quimioterapia basada en platino, el pronóstico sigue siendo reservado para los pacientes con CPCNP en estadio avanzado, con una supervivencia media de 8 a 12 meses.

Se ha observado que la heterogeneidad molecular de cada tumor, es una de las principales razones por las cuales los pacientes con CPCNP exhiben diferentes pronósticos clínicos y respuestas poco predecibles a los tratamientos [4]. Los avances en la caracterización molecular de CPCNP, especialmente en los subtipos histológicos de ADC, han permitido la identificación de aberraciones genéticas clave, que pueden explotarse con terapia dirigida molecularmente y forman parte de lo que hoy se conoce como medicina de precisión.

Con el objetivo de tener un enfoque integral que tomara en cuenta las características clínicas, radiológicas, moleculares e histológicas para mejorar las guías de diagnóstico y de tratamiento, en 2011, una clasificación internacional y multidisciplinaria fue desarrollada como un esfuerzo colaborativo por la “Asociación para el estudio del Cáncer de Pulmón” (IASLC), la “Sociedad Americana del Tórax” (ATS) y la “Sociedad Europea Respiratoria (ERS)” (IASLC/ATS/ERS) [5]. El reconocimiento de la gran diversidad de subtipos dentro de CPCNP, culminó en el año 2015 con su subclasificación, dando paso a la última clasificación histológica de CP de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 2) [6, 7]. La nueva clasificación define a los ADC como carcinomas que forman glándulas,

estructuras papilares, crecen en patrón de crecimiento lepidico, o que secretan mucina [8]. Además, incluye varios subtipos de ADC para ayudar a definir categorías que presentan distintas características clínicas, radiológicas, mutacionales, de expresión génica y patológicas [6, 7].

La detección de mutaciones y mecanismos de resistencia para los tratamientos específicos contra blancos moleculares del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), se ha vuelto una prueba molecular estándar con importantes implicaciones en la prognosis del paciente y la selección de un tratamiento clínico. Para ello, tanto científicos como personal médico, deben hacer aún mayores esfuerzos para tratar de categorizar tanto molecular como inmunológicamente al cáncer el pulmón (CP) [9]. Al correlacionar estas alteraciones, con la nueva clasificación basada en la caracterización histológica, podemos generar poderosos acercamientos multidisciplinarios capaces de repercutir en el diagnóstico y manejo del cáncer de pulmón.

Diagnóstico del cáncer de pulmón

Se ha estimado que aproximadamente el 10% de los pacientes con CPCNP pueden ser asintomáticos. Sin embargo, la sospecha de CP casi siempre está asociada a la presencia de síntomas locales o sistémicos del tumor. En pacientes con enfermedades crónicas respiratorias o de alto riesgo, la exacerbación de cualquier molestia preexistente puede ser un indicador de la presencia de un problema neoplásico. Así mismo, la sospecha de CP puede estar basada en un hallazgo anormal en un estudio de imagen.

Debido a las diferencias en el pronóstico y a la respuesta a tratamientos sistémicos y terapias dirigidas entre pacientes con diferentes tipos de CPCNP, una parte esencial del abordaje diagnóstico es la determinación precisa de la estirpe histológica del tumor y, de manera paralela, la determinación del estadio de la enfermedad. Por lo tanto, los estudios solicitados deben cumplir con estos dos objetivos.

Al atender a un paciente con sospecha clínica o radiológica de CP, el primer paso de abordaje consiste en el establecimiento del diagnóstico histopatológico. Los estudios ordenados, deben de cumplir dos objetivos: 1) Confirmar la sospecha diagnóstica y 2)

determinar la etapa de la enfermedad, siempre tratando de evitar los estudios invasivos innecesarios y considerando un plan terapéutico [10, 11].

Ante una sospecha clínica de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), el médico general o de primer contacto con los pacientes solicita una radiografía para orientarse si hay existencia de un problema neoplásico cuando la enfermedad se encuentra en un estadio avanzado, observando por ejemplo, una zona de consolidación, derrame pleural o ensanchamiento mediastínico [12]. Este primer diagnóstico por radiografía presenta una sensibilidad que oscila entre el 30-35% y una especificidad de entre el 55-65%. Sin embargo, los estudios radiográficos no han demostrado utilidad en el diagnóstico de lesiones tempranas, además de ser limitada en el caso de lesiones centrales o apicales y no tiene utilidad alguna en la etapificación del cáncer.

En caso de tener una probabilidad elevada de diagnóstico de CPCNP, la tomografía computarizada (TC) de tórax es el estudio inicial recomendado. Esta debe incluir cortes de 5-10 mm desde los ápices pulmonares hasta el hígado y las glándulas suprarrenales, siendo preciso realizarla en fase simple y contrastada (siempre y cuando no haya alguna contraindicación). Este estudio permite valorar las características y extensión del tumor primario, descartar o confirmar metástasis o si existe compromiso ganglionar [13]. La tomografía por emisión de positrones (PET-TC) tiene una sensibilidad de 97% y una especificidad de 78%, con tasas de falsos negativos de 8% y de falsos positivos de 10%. Se recomienda usarla en pacientes con ganglio pulmonar solitario, en detección temprana de lesiones pulmonares potencialmente malignas, descartar lesiones sugestivas, también en casos de duda diagnóstica respecto de ganglios y lesiones focales pulmonares > 1 cm [12]. El PET-TC permite evitar cirugías curativas en pacientes de alto riesgo, así como evitar intervenciones inútiles en pacientes de bajo riesgo.

Con el objetivo de precisar el estado general del paciente, se deben solicitar estudios de laboratorio que incluyan al menos biometría hemática, química sanguínea, pruebas de función hepática y tiempos de coagulación. Estos estudios también son de utilidad en caso de necesitar procedimientos invasivos [14]. En caso de sospecha de un adenocarcinoma, el antígeno carcinoembrionario se puede usar para valorar, de modo inicial, la respuesta a tratamientos, así como para la detección de recurrencias durante el seguimiento [14].

La determinación precisa de la estirpe histológica del tumor ha cobrado una mayor importancia con el advenimiento de tratamientos sistémicos específicos para cada subtipo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y más aún con el uso de terapias blanco moleculares. Para realizar esta clasificación en estadios tempranos de cáncer de pulmón (CP), se necesita un muestreo extenso del tejido, por ello, en casos no operables y que no cuentan con resección quirúrgica, no se tendrá una clasificación específica [5, 15]. Tratando de evitar esto al máximo, actualmente existen diferentes métodos para la obtención de tejido tumoral pero la elección de un método sobre otro depende de la localización del tumor primario. En términos generales, se prefiere la biopsia con aguja de corte (tru-cut) sobre la biopsia por aspiración con aguja fina para tumores periféricos, y la broncoscopia complementada con lavado y cepillado bronquiales para tumores centrales. La citología de esputo es un estudio rápido y barato, pero su baja sensibilidad y especificidad impide que pueda ser utilizada en pacientes con tumores centrales en los que no es factible realizar otro tipo de biopsia o en aquellos que solo son candidatos a recibir cuidados paliativos. Este tipo de biopsias pequeñas, representa un reto de optimización de tejido para el patólogo y el biólogo molecular [16-20]. En el mejor de los casos, es necesario contar con más de seis fragmentos de tejido, si lo permite el estado clínico del paciente. De forma sistemática se selecciona una cápsula con tumor del tejido sometido a análisis de las mutaciones y en las otras cápsulas puede efectuarse la inmunohistoquímica con el propósito de establecer la etapificación, tratamiento y pronóstico para el paciente. En el caso del CPCNP, la selección del tratamiento personalizado se basa en establecer la ausencia o presencia de mutaciones, translocaciones y amplificaciones [17].

Recomendaciones para detección de perfil mutacional

Se recomienda, mediante la confirmación de un patólogo, que el tejido incluido en parafina contenga una celularidad tumoral de al menos 60%, con dimensiones aproximadas de 5 mm [21]. En el caso de la detección de mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y del proto-oncogén homólogo del de Kristen de sarcoma de rata K-ras2 (K-RAS), así como la expresión de la proteína de reparación por escisión del grupo de complementación cruzada 1 (ERCC1), se recomienda realizar cortes de 15 µm; para el análisis de el gen de la cinasa del linfoma anaplásico (ALK) mediante la técnica de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) dos cortes de 4 µm.

En el cáncer de pulmón (CP), especialmente en adenocarcinoma (ADC), el desarrollo de terapias dirigidas basado en pruebas moleculares que identifican alteraciones genéticas que impulsan el crecimiento del cáncer, ha suscitado un cambio revolucionario de su tratamiento [22]. La lista de blancos moleculares para el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) se encuentra aún en expansión y entre ellos figuran: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR), el gen de ALK, genes del homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf (BRAF) y el factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) [23, 24].

Nueva Clasificación del 2015 y sus diferencias con la Clasificación de del 2004

El objetivo de la medicina personalizada es proporcionar el tratamiento correcto, al paciente correcto, en el momento correcto. Para cumplir este objetivo es necesario contar con una clasificación histológica de tumores confiable que correlacione con información de biomarcadores específicos. Con el objetivo de tener un enfoque integral que tomara en cuenta las características clínicas, radiológicas, moleculares e histológicas para, así mejorar las guías de diagnóstico y de tratamiento, en el 2011 se desarrolló de manera colaborativa una clasificación internacional y multidisciplinaria por “La Asociación para el estudio del Cáncer de Pulmón” (IASLC), “La Sociedad Americana del Tórax” (ATS) y “La sociedad Europea Respiratoria” (ERS)” (IASLC/ATS/ERS) [5]. El reconocimiento de la gran diversidad de subtipos dentro de CPCNP, culminó en el año 2015 con su subclasificación, dando paso a la última clasificación histológica de CP de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 2) [6, 7]. La actualización de esta clasificación, hace énfasis en la importancia de las biopsias pequeñas y especímenes citológicos, poniendo especial atención en separar adenocarcinomas (ADC’s) del resto de las histologías de CP, con el fin de generar un tamizaje efectivo de los casos, para evaluar su respuesta a terapias dirigidas contra mutaciones activadoras (oncogenes) [3]. En la clasificación de la OMS de 2015, se enfatiza la clasificación de estos marcadores en forma de un panel bien seleccionado [6]. Una de sus más importantes aplicaciones en CP, es para diferenciar entre el carcinoma de células escamosas (CCE) y el ADC en biopsias pequeñas e inclusive en resecciones completas del tumor. Usando los marcadores que se muestran en la Tabla 3,

alrededor del 90% de los casos poco diferenciados de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) pueden ser clasificados como carcinoma de células escamosas (CCE) o adenocarcinoma (ADC) [3, 25]. Sin embargo, si todos los marcadores resultasen negativos, el espécimen puede ser designado como “CPCNP sin patrón específico” (CPCNP NOS). Los cambios más importantes de esta clasificación en comparación con la del 2004 son (Tabla 2) [3, 6]:

1- Un amplio uso de la inmunohistoquímica a través de toda la clasificación, incluyendo resecciones completas del tumor.

2- Un nuevo énfasis en estudios genéticos, particularmente, la integración de exámenes moleculares para ayudar en las estrategias personalizadas de tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón (CP) avanzado.

3- Una nueva clasificación para las biopsias pequeñas y estudios citológicos propuesta por el grupo multidisciplinario IASLC/ATS/ERS desde 2011, la cual es distinta a la aplicada a resecciones completas del tumor.

4- Una subclasificación completamente diferente para los adenocarcinomas de pulmón, tal y como lo propuso el grupo multidisciplinario IASLC/ATS/ERS en 2011.

5- Se restringió el diagnóstico de carcinoma de células grandes (CCG) solo a las resecciones tumorales que no presenten una diferenciación morfológica o inmunohistoquímica, con la reclasificación de los demás subtipos de carcinoma de células grandes (CCG's) en diferentes categorías.

6- Se reclasificó el CCE en los subtipos queratinizantes, no queratinizantes y basaloides. En el caso de los no queratinizantes, se requiere que los tumores prueben la diferenciación escamosa mediante inmunohistoquímica.

7- Los tumores neuroendocrinos se agruparon en una sola categoría.

En general, aproximadamente un 70% de los casos de CP son diagnosticados, estadificados y genotipificados mediante biopsias pequeñas o citología, en lugar de especímenes obtenidos mediante cirugía [26, 27] y las guías de la Red Nacional para el

Estudio Integral del Cáncer (NCCN) ahora recomiendan repetir las biopsias de tejido para identificar mecanismos de resistencia en pacientes que progresan durante el curso de la terapia [28]. Por lo tanto, es de destacar que, por primera vez, esta nueva clasificación toma en cuenta todos estos factores en el diagnóstico clínico-patológico [5].

Subtipos Histológicos de Adenocarcinoma según la nueva clasificación de la OMS 2015

El adenocarcinoma (ADC) es el tipo de cáncer de pulmón (CP) más común (alrededor del 40% de todos los casos) y su incidencia ha ido en aumento durante las últimas décadas [29]. Por definición, el ADC de pulmón es una neoplasia epitelial maligna con diferenciación glandular o producción mucinosa. Comúnmente forma masas localizadas de forma periférica con fibrosis central y protuberancias pleurales. También puede tener otra variedad de apariencias como pueden ser: una masa centralmente localizada, consolidación difusa lobular, distribución multinodular bilateral y/o engrosamiento pleural. Las células de ADC usualmente expresan marcadores neumocíticos, entre ellos el factor de transcripción tiroideo (TTF-1) y NapsinA, presentes en el 85% de los casos [3] (Tabla 3).

De acuerdo con la cuarta edición de la clasificación de la OMS de 2015 (Tabla 2), entre un 80-90% de los ADCs de pulmón presentan patrones histológicos heterogéneos y son clasificados como de tipo mixto [7]. En dicha clasificación, los subtipos de ADC pulmonar son diferenciados con base en el patrón histológico predominante de la siguiente manera: lepidico (LEP), papilar (PAP), acinar (ACN), micropapilar (MIP) o sólido (SOL) [5, 7] (Figura 1). Los cambios más importantes de esta clasificación en comparación con la del 2004 específicamente para ADC son [3, 6]:

- 1- Descontinuación de los términos carcinoma broncoalveolar (CBA) y ADC de subtipo mixto.
- 2- La adición de ADC *in situ* (AIS) como una lesión preinvasiva que se clasifica dentro del grupo de hiperplasias adenomatosas atípicas.
- 3- La adición del subtipo MIP.

- 4- La clasificación de los subtipos invasivos de ADC con base en el subtipo histológico predominante, después de haber sido observado y caracterizado por subtipo presente de forma semicuantitativa y en incrementos del 5%.
- 5- La adición del término LEP para componentes no invasivos (antes clasificados como CBA) presentes como parte del ADC invasivo.
- 6- Se introdujo el término ADC mucinoso invasivo para adenocarcinomas (ADC's) que eran clasificados como carcinoma broncoalveolar (CBA) mucinoso, excluyéndose a aquellos que cumplan con el criterio para ser clasificados como ADC in-situ (AIS) o ADC mínimamente invasivo (AMI).
- 7- Descontinuación de la clasificación de los subtipos de ADC de células claras y de células en anillo de sello, solo siendo reconocidas como una característica si es que se presenta en pequeñas proporciones.
- 8- Descontinuación del término cistadenocarcinoma mucinoso para incluirlo en la categoría de ADC coloidal.

Adenocarcinoma mínimamente invasivo

El ADC *in situ* (AIS) está representado por tumores relativamente pequeños (≤ 3 cm) con células neoplásicas creciendo a través de estructuras alveolares preexistentes (patrón de crecimiento LEP) sin evidencia de invasión vascular, pleural o del estroma (Tabla 2). El patrón LEP es un término descriptivo para un tipo de crecimiento celular membranoso o en corteza y ahora es usado específicamente para describir células tumorales proliferando a través de la superficie de las paredes alveolares [30]. El crecimiento LEP, por lo general, correlaciona con una opacidad de fondo de cristal en radiografías. La mayoría de los AIS son del tipo no mucinoso con células pleomórficas leves o moderadas en forma de cubo o columna, que cubren de forma linear las paredes alveolares y no presentan crecimiento papilar o micropapilar secundario. Una minoría de estos tumores es mucinoso o del tipo mixto. Si el tumor presenta un pequeño foco (< 5 mm) de crecimiento invasivo, el tumor debe ser clasificado como AMI. La invasión, por lo general, induce la formación de un estroma desmoplástico, aunque también se puede manifestar con otros patrones de crecimiento

como ACN, PAP, MIC o SOL. El adenocarcinoma mínimamente invasivo (AMI) no sólo está definido por el tamaño limitado de su área de crecimiento invasivo, también por otro tipo de patrones invasivos como necrosis tumoral, invasión linfovascular o pleural. Ambos tipos de tumores se consideran de bajo grado y presentan una supervivencia a 5 años del 100% [3, 7].

Adenocarcinoma invasivo

La mayoría de los casos de adenocarcinomas (ADC's) invasivos están compuestos por subtipos morfológicamente mixtos. Por lo tanto, estos son clasificados de acuerdo al patrón estructural predominante (lepídico (LEP), papilar (PAP), acinar (ACN), micropapilar (MIP) o sólido (SOL)) en lugar de simplemente clasificarlos como un subtipo mixto [8]. Cada subpatrón adicional, se registra de forma semicuantitativa estimando incrementos del 5% [5, 7]. Esta clasificación ha demostrado tener significado pronóstico, en donde la histología predominantemente LEP presenta la mejor supervivencia, ACN y PAP presentan una sobrevida intermedia, mientras MIP y SOL presentan una sobrevida muy pobre (Tabla 1 y 2) [3, 7]. Es importante también resaltar que no existen marcadores inmunohistoquímicos específicos para diferenciar entre los subtipos histológicos de ADC invasivo.

Tabla 1. Supervivencia por subtipo histológico.	
Subtipo Histológico	% de supervivencia a 5 años
Lepídico (LEP)	86
Papilar (PAP)	71
Acinar (ACN)	68
Sólido (SOL)	39
Micropapilar (MIP)	38
Russell, P.A., et al., <i>Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification.</i> J Thorac Oncol, 2011. 6 (9): p. 1496-504.	

Adenocarcinoma Lepídico (LEP)

Este subtipo histológico es muy común y se encuentra dentro de los tipos invasivos de adenocarcinoma (ADC). El patrón de crecimiento LEP denota células tumorales diseminadas sobre las estructuras alveolares preexistentes, aunque podría observarse también engrosamiento esclerótico del septo alveolar. Cuando se presenta como el patrón predominante y con características que lo diferencien de los patrones de ADC mínimamente invasivo ADC in-situ (AIS) y ADC mínimamente invasivo (AMI)), se les designa como ADC LEP. Las características que lo diferencian pueden ser una o varias de las siguientes:

- Diseminación a través de espacios aéreos
- Invasión linfática o vascular
- Invasión pleural
- Necrosis tumoral

En clasificaciones anteriores a OMS 2015, este subtipo era clasificado como carcinoma broncoalveolar (CBA), sin embargo, esta clasificación se abandonó debido a que en ella se incluían un grupo de ADC's muy heterogéneo. Este subtipo histológico presenta la mejor supervivencia entre los subtipos invasivos de ADC [7, 31] (Tabla 1 y 2, Figura 1).

Adenocarcinoma acinar (ACN)

Este subtipo histológico es común y se encuentra dentro de los tipos invasivos de ADC. Está definido por la presencia de un patrón celular arreglado en estructuras glandulares clásicas sobre el estroma fibroblástico. Es importante resaltar que en los casos en donde las células tumorales presentan crecimientos morfológicos más complejos, como en el patrón cribiforme, este subtipo puede presentar peor pronóstico y altos riesgos de recurrencia en estadios tempranos de la enfermedad [7, 32] (Tabla 1 y 2, Figura 1).

Adenocarcinoma papilar (PAP)

Este subtipo histológico se encuentra dentro de los tipos invasivos de ADC. Está definido por células tumorales formando una arquitectura papilar, con las células tumorales revistiendo la superficie de las ramificaciones de los núcleos fibrovasculares [3] (Tabla 1 y 2, Figura 1).

Adenocarcinoma micropapilar (MIP)

Este subtipo histológico se encuentra dentro de los tipos invasivos de ADC. En este subtipo histológico las células tumorales forman racimos celulares individuales sin un núcleo fibrovascular. Las células tumorales se presentan como pequeños grupos celulares individuales sueltos, sólidos y pequeños. Pueden presentarse cuerpos de psamomas. Este subtipo de ADC se caracteriza por presentar un pronóstico muy pobre en los estadios tempranos en comparación con los otros subtipos histológicos [3, 31] (Tabla 1 y 2, Figura 1).

Adenocarcinoma sólido (SOL)

Este subtipo histológico se encuentra dentro de los tipos invasivos de ADC (Tabla 1 y 2). En este subtipo histológico las células tumorales forman capas sin patrón aparente y carecen de cualquier patrón reconocible, incluye a los carcinomas con patrones pobremente diferenciados/indiferenciados que expresan marcadores neumocíticos (TTF-1 y NapsinA) (Figura 1). Este patrón era clasificado anteriormente en la categoría de carcinomas de células grandes [7]. Es importante resaltar que ciertos marcadores comúnmente asociados con la diferenciación celular escamosa (p63 y p40) pueden presentar expresión focal en algunos tumores clasificados como ADC SOL [7, 33].

Tabla 2. Clasificación del cáncer de pulmón OMS 2015

- **Adenocarcinoma**
 - Lepídico
 - Acinar
 - Papilar
 - Micropapilar
 - Sólido
 - Adenocarcinoma mucinoso invasivo
 - Adenocarcinoma coloidal
 - Adenocarcinoma fetal
 - Adenocarcinoma entérico
 - Adenocarcinoma mínimamente invasivo
- **Carcinoma de células escamosas**
- **Tumores neuroendocrinos**
 - Tumores carcinoides
 - Carcinoide típico
 - Carcinoide atípico
 - Carcinoma de células pequeñas
 - Carcinoma neuroendocrino de células grandes
- **Carcinoma de células grandes**
- **Carcinoma adenoescamoso**
- **Carcinoma pleomórfico**
- **Carcinoma de células huso**
- **Carcinoma de células gigantes**
- **Carcinosarcoma**
- **Blastoma pulmonar**
- **Carcinomas del tipo glándula salival**
 - Carcinoma mucoepidermoide
 - Carcinoma adenoide quístico
 - Carcinoma epitelial-mioepitelial
- **Tumores mesenquimales, tumores linfohistocíticos, tumores de origen ectópico y tumores metastásicos**

Adaptada de: Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th edition. Lyon (France): IARC Press; 2015.

Tabla 3. Características inmunohistoquímicas del adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas		
Anticuerpo	Adenocarcinoma	SCC
TTF-1	+	-
NapsinA	+	-
P40	-	+
CK5/6	-	+
CK5	-	+
P63	-	+
Desmoglein-3	-	+
Abreviaciones: Citoqueratina (CK)		
Adaptada de: Zheng, M., <i>Classification and Pathology of Lung Cancer</i> . Surg Oncol Clin N Am, 2016. 25 (3): p. 447-68.		

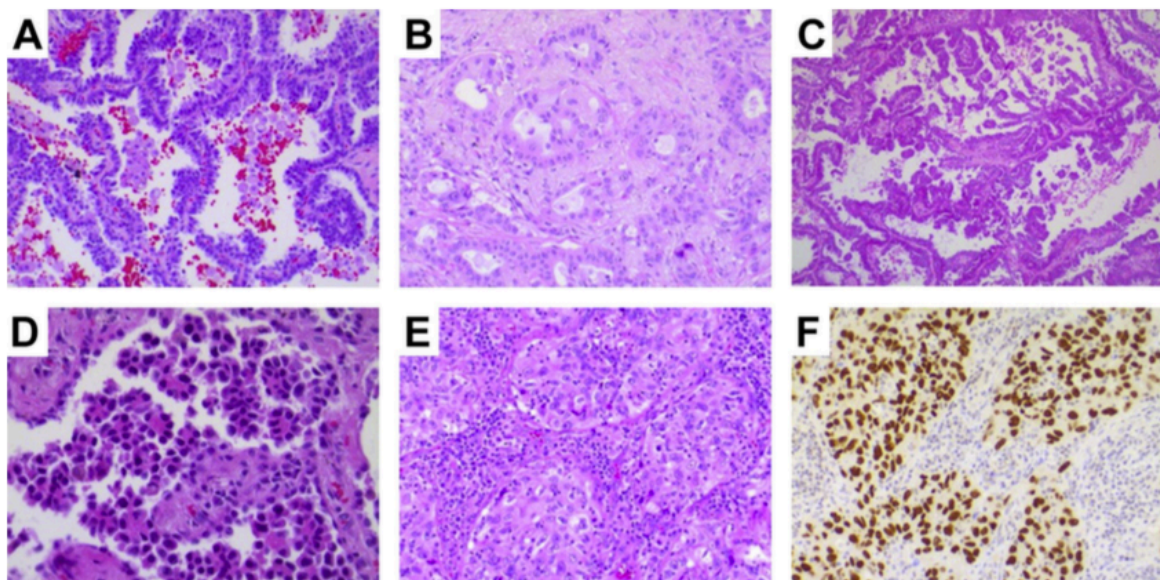


Figura 1. Subtipos histológicos de Adenocarcinoma (ADC). A) ADC lepidico (H&E, x200), B) ADC acinar (H&E, x200), C) ADC papilar (H&E, x200), D) ADC micropapilar (H&E, x200), E) ADC sólido (H&E, x200), F) ADC sólido positivo por inmunohistoquímica para TTF-1 (x100). (Zheng, M., *Classification and Pathology of Lung Cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2016. 25(3): p. 447-68)

Alteraciones genéticas en el cáncer de pulmón (CP)

Actualmente se reconoce que la adquisición de mutaciones somáticas clave, actúan como centinelas en eventos carcinogénicos que están relacionados con el crecimiento y división celular del tumor.

En cáncer de pulmón de células no pequeñas CPCNP se han identificado más de 200 mutaciones debido a los carcinógenos del humo de tabaco, superando a lo observado en otros tipos de cáncer [34]. Las alteraciones en CP más frecuentes son las de los genes *EGFR*, *KRAS* [35, 36] y *ALK* [37-39], las cuales también son las de mayor relevancia clínica. Ha sido reportado que existen diferencias étnicas en los perfiles mutacionales y de expresión génica del CP. Por ejemplo, en pacientes con CPCNP de América Latina, la prevalencia de mutaciones en *EGFR* y *KRAS* es de 26% y 14%, respectivamente. Esto representa una prevalencia intermedia entre la población asiática y caucásica. Cabe destacar, que la heterogeneidad molecular también puede ser atribuible a diferentes factores de riesgo [38]. Por ejemplo, las mutaciones de *EGFR* y *ALK* están asociadas a pacientes no fumadores, mientras en fumadores, la mayor prevalencia pertenece a *KRAS* [40]. En México, nuestro grupo de investigación reportó que la frecuencia de mutaciones de *EGFR* para nuestra población es de 34.3%, mientras que para *KRAS* es de 14% [38], esto nos coloca entre las frecuencias de las poblaciones caucásicas y asiáticas.

Gracias a un mejor entendimiento de la biología de los tumores, de sus paisajes mutacionales a nivel genómico, la inmunología del tumor y su microambiente, los paradigmas de tratamiento han evolucionado principalmente por dos vías: a) las terapias blanco moleculares que atacan oncogenes específicos de las células cancerosas y b) los inhibidores de puntos de control inmunitario (14).

Mutaciones del gen *EGFR*

El gen de *EGFR* está localizado en el brazo corto del cromosoma 7 (7p11.2) y codifica para un receptor del factor de crecimiento tipo I transmembranal con actividad tirosina cinasa (TK por sus siglas en inglés). *EGFR* pertenece a la familia HER/erbB2 de receptores tirosina-cinasa (RTKs), que incluyen a HER1 (*EGFR/erbB1*), HER2 (*neu, erbB2*), HER3

(erbB3) y HER4 (erbB4). Estos receptores tienen una estructura en común que incluye un dominio de unión-ligando extracelular rico en cisteínas, un dominio transmembranal α -hélice, un dominio TK citoplasmático (en todos menos en HER3) y un dominio carboxilo-terminal de señalización [41]. La homodimerización y/o heterodimerización con otros miembros de la familia en respuesta a una unión con su ligando activa el dominio TK [42]. Este proceso resulta en autofosforilación del dominio citoplasmático del receptor, lo que le permite interactuar con moléculas adaptadoras. A continuación, estas le permiten al receptor interactuar con vías de señalización intracelular, especialmente RAS-RAF-MEK-MAPK, PI3K-PTEN-AKT y STAT [43]. Finalmente, estas vías de señalización llevan a un incremento en la proliferación, angiogénesis, metástasis, así como la inhibición de la apoptosis [44].

La actividad TK de EGFR puede ser desregulada por diferentes mecanismos que incluyen mutaciones, incremento en el número de copias del gen o su sobre expresión a nivel proteína [45]. Las mutaciones activadoras de *EGFR* se localizan en los exones 18 al 21 en la región codificante para el dominio TK del receptor. De todas las mutaciones del dominio TK, entre el 85-90% son las del exón 19 de clase I y las del exón 21 (L858R) [46]. En su forma activa, el dominio TK de EGFR asume una estructura que resulta en auto inhibición. Al mutar este dominio, el resultado es la desestabilización de su conformación y la activación constitutiva de su actividad cinasa y por lo tanto, la activación continua de las vías de señalización antes mencionadas [46, 47].

Las mutaciones EGFR son un marcador pronóstico para pacientes en etapas temprana y avanzada, así como el principal blanco de las terapias moleculares dirigidas [48-50]. La asociación entre la presencia de mutaciones activadores del dominio TK de EGFR y las altas tasas de respuesta a los inhibidores de TKs (TKIs), ha sido confirmada en numerosos estudios en donde los niveles respuesta van de 50-100% mientras que en pacientes que no presentan las mutaciones, la respuesta es menor, yendo del 0-30% [47]. Varios estudios prospectivos y aleatorizados en fase III que han comparado la quimioterapia de primera línea frente a TKIs en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) avanzado, que presentan mutaciones de EGFR, han demostrado el beneficio de los inhibidores al obtener una mayor tasa de respuesta al tratamiento (hasta un 70%) y de supervivencia libre de progresión (9-15 meses).

Entre todas las mutaciones de *EGFR*, existen cuatro tipos que correlacionan con sensibilidad a los ensayos con inhibidores de TKs *in vivo* e *in vitro*. Son las mutaciones puntuales en los exones 18 (G719A/C) y 21 (L858R and L861 Q) así como deleciones en el marco de lectura en el exón 19. Las mutaciones en el exón 19 y las deleciones del exón 21, parecen tener mayor sensibilidad a los tratamientos que aquellas de los exones 18 y 20 [51, 52]. Existen estudios en donde se ha observado que pacientes con CPCNP y mutaciones en el gen de *EGFR*, presentan mejores resultados clínicos y mayor supervivencia a diferencia de los pacientes sin mutaciones [47].

Por otro lado, la gran mayoría de los pacientes adquiere resistencia a los tratamientos dirigidos a moléculas blanco (12 a 24 meses) [53, 54] mediante múltiples medios, como la amplificación del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (*MET*) y *HER2* u otras mutaciones en conductores oncogénicos (*PIK3CA* y *B-RAF*) [55-58], o mediante la mutación de resistencia T790M, también en el gen *EGFR*, que se presenta en alrededor del 50% de los casos de resistencia a gefitinib y erlotinib [59]. Recientemente, el desarrollo de un inhibidor de tirosina-cinasa de *EGFR* (*EGFR-TKIs*) de tercera generación, representa una necesidad urgente para el desarrollo y aplicación de métodos de identificación de la mutación T790M [59].

Mutaciones del gen *HER2*

Al igual que *EGFR*, *HER2* es un miembro de la superfamilia de receptores transmembranales con actividad de tirosina cinasa. En mama, las mutaciones de *HER2* presentan una recurrencia de 30%, mientras que en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) presentan una frecuencia más baja de tan sólo 1.3% [60]. Las inserciones del exón 20 son las mutaciones más frecuentes, mientras que las mutaciones puntuales L755S y G776C las menos. Este gen también puede sufrir amplificaciones en el 13-20% de los casos de CPCNP y está relacionado con un mal pronóstico. Afatinib es un TKI de segunda generación que también inhibe *HER2* mutado, por lo tanto, conocer el estado mutacional de este gen ayuda a seleccionar pacientes para recibir tratamiento dirigido [61].

Mutaciones de K-RAS

La familia de genes *RAS*, codifican para proteínas de 22 kD unidas a la membrana con dominio de unión a guanósín-trifosfato (GTP), que regulan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis al interactuar con múltiples efectores como MAPK, STAT y PI3K [62, 63]. En el gen *KRAS*, se observa la mutación más frecuentemente detectada a nivel global en pacientes con CPCNP (hasta 36% de la población general). Las mutaciones en *KRAS* representan alrededor del 90% de las mutaciones en genes *RAS* de pacientes con cáncer de pulmón. De éstas, el 97% se localiza en los codones 12 o 13 en pacientes con CPCNP [64, 65] y generan formas de RAS que tienen una actividad GTPasa defectuosa, lo que resulta en una activación constitutiva de sus vías de señalización [64]. Estas mutaciones se observan generalmente en fumadores activos [66] y varios estudios han indicado que las mutaciones en *KRAS* están asociadas con una sobrevida global y una supervivencia libre de progresión menores, por lo tanto, son tomadas como marcadores pronósticos negativos en pacientes con CPCNP [67], mientras que otras investigaciones no han encontrado dicha asociación [68].

Translocación del gen *EML4-ALK*

El gen *ALK* se encuentra localizado en el cromosoma 2 y codifica para un receptor transmembranal con actividad tirosina-cinasa (TK) que forma parte de la superfamilia de receptores de insulina [69, 70] y su expresión en tejidos de humanos adultos se encuentra restringida al intestino delgado, sistema nervioso y los testículos [71]. En la mayoría de los casos de cáncer, la activación de *ALK* se da a través de la formación de fusiones con otros genes. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas CPCNP, el compañero de fusión más común es la proteína 4 similar a los microtúbulos del equinodermo (*EML4*) [66, 72], pero hay otros genes de fusión menos comunes como *KIF5B* y *TGF* [66, 73-75]. El reordenamiento de *EML4-ALK* se encuentra en 2-7% de pacientes con CPNCP y se observan más comúnmente entre pacientes con adenocarcinoma, no fumadores y aquellos que no presentan mutaciones en *KRAS* y *EGFR* [63, 76, 77]. Los pacientes con *ALK* mutado han presentado buenas respuestas al ser tratados con pemetrexed como monoterapia y en terapia combinada [78, 79]. Crizotinib, es una pequeña molécula inhibidora de dominios tirosina-cinasa cuyos blancos son *ALK*, *MET* y *ROS1* [80]. Al ser comparada con la

quimioterapia, prolonga la supervivencia libre de progresión, presenta mayores tasas de respuesta y mejora la calidad de vida en pacientes previamente tratados, ALK positivos y con CPCNP avanzado [81]. A pesar de responder inicialmente a crizotinib, la mayoría de los pacientes progresan en los primeros 12 meses. Aproximadamente un tercio de los pacientes lo hacen mediante una mutación en el dominio TK de *ALK* o una amplificación de *ALK* previamente fusionado [82, 83] mientras que el resto, lo hacen mediante una gran variedad de mecanismos previamente reportados [82, 84]. Existen varios métodos disponibles para la detección de la translocación de ALK, como inmunohistoquímica, RT-PCR y FISH. Siendo este último el método regular para detectar reordenamientos debido a la correlación que existe con la respuesta al tratamiento en estudios clínicos, sin embargo, se requiere experiencia en la interpretación de la técnica [85].

Ceritinib (20 veces más potente que crizotinib) [86-88], brigatinib [89] y alectinib [90] son ALK-TKIs de segunda generación que han mostrado una eficacia superior al ser comparados con quimioterapias basadas en platino, en segunda línea, en pacientes que han progresado a crizotinib [9]. Similar a lo que ocurre con las mutaciones de EGFR, la resistencia adquirida a los TKIs es causada por mutaciones en el dominio cinasa de *ALK* o la activación de vías de señalización alternas como la de EGFR, c-Kit, la del factor de crecimiento insulínico-1R (IGF-1R) o la de la proteína cinasa activadora de mitógenos (MAPK) [91]. Lorlatinib un inhibidor de tirosina-cinasa (TKIs) de tercera generación, con actividad contra ALK y ROS, es capaz de actuar en contra de una mutación de resistencia común del dominio cinasa de ALK [92].

Fusión/reordenamiento de *ROS1*

C-ros 1 (*ROS1*) es un oncogén originalmente identificado en glioblastoma por Bergthon y colaboradores. Varios estudios han confirmado una prevalencia de entre 1-2% en adenocarcinoma (ADC) pulmonar. Esta fusión se presenta más comúnmente en pacientes con histología de ADC, en edad temprana al momento del diagnóstico y en no fumadores. El TKIs crizotinib ha presentado tasas elevadas de respuesta muy similares a las de los pacientes con ALK+ y estudios en líneas celulares han demostrado que los TKIs anti-EGFR no parecen tener efecto sobre la fusión [93].

Una substitución de una glicina por una mutación en el codón 2032 (G2031) del dominio cinasa es la mayor causa de resistencia a crizotinib [94]. Otros mecanismos de resistencia a crizotinib reportados son la activación de EGFR [95] y mutaciones en *KRAS*, *HER2* y *c-Kit* [9].

JAK2 y STAT3

La activación constitutiva de STAT3 es una característica común en muchos tumores sólidos incluyendo CPCNP en donde, alrededor del 50% de los tumores avanzados presentan la forma fosforilada en su dominio tirosina [96-98]. Esta activación puede ocurrir mediante una gran variedad de factores de crecimiento y señales inflamatorias provenientes del microambiente y han sido implicadas en la resistencia a fármacos, tanto primaria como adquirida y tanto a la quimioterapia como a los TKIs [99-101]. Esta activación (Y705) puede ser mediada por un gran número de tirosinas cinasa, incluidas las de las familias de SRC y JAK [96, 102]. Las dos vías clásicas que se activan después de la fosforilación de STAT3 son: EGFR y la vía IL-6/JAK activada por citocinas [103]. Después de ser fosforilado, las moléculas de STAT3 forman homodímeros que se transportan al núcleo, se unen a ADN y activan la transcripción de sus genes blanco, que están involucrados en la proliferación, supervivencia y migración celular [102]. La familia de cinasas de JAK incluye a cuatro miembros *JAK1*, *JAK2* y *TYK2* que se expresan de forma constitutiva y *JAK3* cuya expresión se encuentra restringida a los linajes celulares linfoides [104]. Un gran número de investigaciones han documentado un importante rol de ciclos de retroalimentación de citocinas autocrinos y/o paracrinos que llevan o soportan la activación aberrante de STAT3 en el cáncer humano. En particular, IL-6 ha sido implicada en la tumorigénesis [98, 105-107]. IL-6 es una citocina que regula la respuesta inmune e inflamatoria; reportes recientes sugieren que su expresión se encuentra implicada en la regulación del crecimiento tumoral y la diseminación metastásica en el cáncer de pulmón [108]. Al combinarse con su ligando específico, IL-6 y otras citocinas de la misma familia, usan el receptor gp130 como subunidad de señalización para activar a JAK1 y JAK2, así como a TYK2 [109]. La activación de JAK lleva a la subsiguiente fosforilación de gp130 y el reclutamiento y fosforilación de otras moléculas señalizadoras, como STAT3, MAPK y PI3K [96, 110, 111].

Las células del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) secretan IL-6 y consecuentemente activan STAT3 mediante un mecanismo autócrino [98]. Las células de CPCNP resistentes a los inhibidores tirosina-cinasa de EGFR (EGFR-TKIs) presentan una activación constitutiva de la vía de señalización de STAT3 [112]. La inhibición genética o farmacológica de la vía de señalización de gp130/STAT3, interrumpe esta activación de STAT3. Para tumores sólidos, el rol de la inhibición de JAK ha sido examinado en modelos de activación por IL-6 de cáncer de mama, ovario y próstata, utilizando el inhibidor de JAK1/2 AZD4880, el cual lleva a la supresión tumoral [105, 106]. Zhao et al. reportó que los pacientes con CPCNP con alta expresión de pJAK2 presentaron tasas pobres de supervivencia global y una mayor densidad de los vasos sanguíneos tumorales [113]. Por lo tanto, la inhibición de la vía JAK2/STAT3 puede representar una nueva oportunidad en el tratamiento del CPCNP en pacientes resistentes a EGFR-TKIs.

Mutaciones del gen *BRAF*

Las mutaciones de *BRAF* se presentan en entre el 1-3% de los casos de CPCNP [114]. La sustitución de un aminoácido de valina (V) por glutamato (E) en el residuo 600 (V600E), se presenta en casi el 50% de los casos con *BRAF* mutado. Esta mutación lleva a la activación río debajo de la vía de señalización de MEK/MAPK. La terapia con un inhibidor de BRAF (vemurafenib o dabrafenib) [115] en combinación con un inhibidor de MEK (trametinib), ha merecido la aprobación de la FDA por sus buenos resultados en la supervivencia (ORR de 64% y OS media de 24.6 meses) [9].

Inhibidores de puntos de control inmunitario (IPCI)

La inmunoterapia que actúa sobre puntos de control inmunitario, fue el parteaguas más importante para el tratamiento del cáncer en la última década. La importancia de los IPCI fue enmarcada con la entrega del premio Nobel a los doctores Allison y Honjo en 2018, así como la aprobación por parte de la FDA de múltiples IPCI. En el microambiente tumoral, el sistema inmune del paciente es capaz de erradicar al cáncer después de reconocer los anticuerpos tumorales, presentados por el mismo tumor o células presentadoras de antígeno [116]. A través de un mecanismo de resistencia adaptativa, las células tumorales pueden evadir la vigilancia inmunológica del paciente al expresar proteínas que fungen

como puntos de control inmunitario capaces de desviar la función de células inmunes, principalmente células T citotóxicas, lo que resulta en células del sistema inmune exhaustas y apoptóticas [117]. La revigorización de células T exhaustas para eliminar células cancerosas, se puede lograr mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra la proteína de muerte celular programada (PD1) o su ligando, la proteína de muerte celular programada (PD-L1), bloqueando su interacción.

Cuatro anticuerpos monoclonales anti PD-1 o PD-L1 fueron aprobados por la FDA para el manejo de pacientes con CPCNP avanzado (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab y durvalumab) [9]. Estos IPCI, casi han reemplazado por completo el uso de docetaxel como segunda línea de tratamiento en casos de CPCNP avanzado al momento de la progresión a la quimioterapia basada en platinos, como primera línea [118-121], pues correlacionan con una mayor sobrevida tanto en casos de carcinoma de células escamosas (SCC) como de ADC (9.2 meses y 12.2 meses respectivamente) [119]. También han demostrado que pueden mejorar la sobrevida como tratamiento de primera línea en algunos ensayos clínicos [122]. El beneficio en sobrevida es mucho más marcado en pacientes con una mayor expresión de PD-L1 en casos de ADC, sin embargo, el valor predictivo de este biomarcador no ha resultado muy fiable en distintos estudios. Otro biomarcador usado para el uso de IPCI es la carga mutacional del tumor (TMB), cuando esta es alta, correlaciona con una mejor respuesta al tratamiento [123]. Sin embargo, su valor predictivo ha variado en distintos ensayos clínicos [9].

Implicaciones de la nueva clasificación

Originalmente, el manejo clínico de los subtipos predominantes de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) era similar y el principal propósito clínico del patólogo era diferenciarlos entre CPCNP y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) [27]. Sin embargo, desde hace más de una década, las terapias para tratar CPCNP han sufrido un importante cambio de paradigma a raíz del tránsito de la era de las terapias empíricas a la era de las terapias personalizadas (medicina de precisión), basada principalmente en patrones moleculares y la clasificación tumoral [124]. Cada vez se acumula más evidencia que sugiere que el cáncer de pulmón (CP) representa un grupo muy heterogéneo tanto a nivel histológico como molecular, inclusive dentro de un mismo subtipo histológico [7, 8,

125]. El reconocimiento de esta gran diversidad tuvo un parteaguas en el año 2015, con la última clasificación histológica de CP de la OMS (Tabla 2) [6, 7] cuya actualización, hace énfasis en la importancia de las biopsias pequeñas y especímenes citológicos, poniendo especial atención en separar adenocarcinomas (ADC's) del resto de las histologías de CP, con el fin de generar un tamizaje efectivo de los casos, para evaluar su respuesta a terapias dirigidas contra mutaciones activadoras (oncogenes) [3].

Esta nueva clasificación de subtipos histológicos de ADC's, ya ha demostrado su utilidad clínica. A nivel mundial, 14 estudios han validado la relevancia clínica del sistema de clasificación de la OMS 2015. Estos estudios han confirmado una sobrevida del 100% para el adenocarcinoma (ADC) *in situ* con un 100% de patrón de crecimiento lepidico (LEP), contrastando con la pobre sobrevida de pacientes con ADC invasivo con patrones de crecimiento histológicos micropapilar (MIP) y sólido (SOL) [31]. En pacientes con cáncer de pulmón en estadio I de los Estados Unidos, Australia y Alemania, los patrones SOL, MIP y papilar (PAP) han sido asociados con una sobrevida pobre. Estos casos son de particular interés para la práctica clínica pues dichos pacientes, pueden ser candidatos para terapias adyuvantes [126-128]. Recientemente, nuestro grupo encontró una correlación entre esta nueva clasificación del ADC pulmonar y las diferencias pronósticas en pacientes con enfermedad avanzada o metastásica, una situación que podría no aplicarse a pacientes en estadios menos avanzados de la enfermedad. Los pacientes con enfermedad avanzada y ADC's de alto grado, presentan una mayor supervivencia al compararlos con aquellos con un ADC de grado intermedio, probablemente debido a una mejor respuesta a la quimioterapia [129].

Por otro lado, a pesar de que el diagnóstico del CP basado en la histología sigue siendo el estándar de oro, este método presenta limitaciones y por lo tanto, es necesario que el diagnóstico se apoye también en una caracterización más precisa basada en numerosas alteraciones moleculares [81, 130, 131]. Una desventaja práctica es que alrededor del 70% del diagnóstico de tumores pulmonares, se realiza mediante biopsias pequeñas o especímenes citológicos [26, 27]. A pesar de que la clasificación del CPCNP es bastante clara, en la práctica es complicado contar con especímenes del tumor adecuados, presentando una diferenciación parcial o total y, por lo tanto, el diagnóstico de tumores poco diferenciados puede ser retador y complicado. Gracias a las recomendaciones de la última

versión de la clasificación tumoral de la OMS 2015, los patólogos ahora usan combinaciones de inmunotinciones (Tabla 3), perfiles moleculares y varios algoritmos para apoyarse en su clasificación [132]. A pesar de estas mejoras, no todas las biopsias pequeñas de CPCNP pueden ser clasificadas como ADC o CCE y terminan siendo referidas como CPCNP sin patrón específico (CPCNP NOS) [27, 133].

Un estudio europeo examinó la precisión diagnóstica para distinguir entre CPCNP y CCE. El estudio fue realizado de forma prospectiva utilizando biopsias pequeñas obtenidas por broncoscopia y tru-cut. Once patólogos experimentados revisaron laminillas teñidas en H&E de 110 casos. El diagnóstico CPCNP-NOS se dio en promedio en 29.5% de las biopsias. Esto indica que incluso patólogos experimentados pueden no concordar en la interpretación o en definitiva no ser capaces de clasificar un alto porcentaje de biopsias pequeñas sin la ayuda de inmunotinciones u otras herramientas moleculares [134]. Por otro lado, las técnicas de inmunotinción, se encuentran limitadas por la variabilidad de las reacciones de tinción causadas por la heterogeneidad del tumor, discrepancias técnicas, diferencias en la sensibilidad/especificidad de los marcadores individuales y la falta de estandarización de la interpretación cuantitativa de los resultados de la tinción [135]. Esto sugiere que la interpretación de inmunotinciones no es uniforme y por ello, es de suma importancia encontrar otras alternativas para lograr clasificar tumores de pulmón explorando otras herramientas de apoyo diagnóstico [132].

Como ya se mencionó anteriormente, el diseño de terapias dirigidas mediante drogas diseñadas específicamente contra alteraciones genéticas que regulan vías de señalización críticas en el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas, ha resultado en un incremento significativo en las tasas de respuesta y supervivencia de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) [46, 47, 55-59, 62]. Sin embargo, a pesar del progreso terapéutico en los tratamientos contra el CPCNP, los tratamientos blanco siguen presentando diferentes niveles de eficacia [136, 137]. Además del gran número de drogas aprobadas para atacar vías moleculares que frecuentemente presentan aberraciones genómicas en los tumores, hay cientos más en vías de desarrollo clínico (incluyendo inmunoterapias). No es sorpresa que varios meta-análisis han demostrado que los ensayos clínicos que se basan en biomarcadores para estratificar a los pacientes, presentan mejores resultados que aquellos que no [138-140], confirmando que tanto la caracterización

histológica y molecular precisas, juegan un rol muy importante en el reclutamiento de pacientes para ensayos clínicos en donde se prueban tratamientos blanco [141].

Lamentablemente, no todos los tumores de pacientes presentan biomarcadores farmacológicamente sensibles. Por lo tanto, extender la aplicación de la medicina de precisión requiere un conocimiento aún más profundo de la biología del cáncer. Para ello, hay una necesidad urgente por el descubrimiento de nuevos biomarcadores para discriminar entre las histologías del adenocarcinoma (ADC). Para lograrlo, es importante explorar mecanismos oncogénicos más allá de las mutaciones oncogénicas a nivel genómico, incorporando otras metodologías como aquellas que interrogan las diferencias en la expresión génica [142]. Los ensayos moleculares basados en la expresión génica en pacientes con CPCNP, ya han demostrado la existencia de firmas de expresión génica capaces de distinguir entre los tipos histológicos de ADC y carcinoma de células escamosas (CCE); además, el número de estudios que han demostrado que histologías específicas de CPCNP presentan características distintas ha ido en aumento [143-147] pues también contribuyen como herramienta diagnóstica para el reclutamiento efectivo de pacientes en ensayos clínicos [136].

Las razones detrás de las diferencias clínicas, mutacionales, pronósticas y de respuesta a tratamiento de cada subtipo de ADC aún no han sido elucidados. Por ello, proponemos que las diferencias en la expresión génica, puedan explicar algunas de las peculiaridades clínicas de cada subtipo de ADC pulmonar basados en la clasificación propuesta por IASLC/ATS/ERS. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evalúa la expresión genética de los subtipos histológicos del ADC pulmonar basados en la cuarta edición de la clasificación histológica del CP de la Organización Mundial de la Salud de 2015.

Hipótesis

Las diferencias en los subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar están asociados a diferencias en la expresión génica.

Objetivos

- a) Evaluar la expresión génica de los subtipos histológicos de adenocarcinoma pulmonar basado en la cuarta edición de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2015.**
- b) Evaluar si existe alguna correlación entre la expresión génica de cada subtipo histológico de adenocarcinoma pulmonar y las características clínico-patológicas de los pacientes.**

Materiales y métodos

Diseño experimental

El presente trabajo, es un estudio clínico, longitudinal, prospectivo, observacional y analítico que usa una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón con una selección de muestra de tipo no-probabilístico.

Tamaño de Muestra

Es sabido que el tamaño de muestra tiene un efecto importante en la confianza para identificar genes con expresión diferencial. El hecho de que un microarreglo contiene más de 30 mil variables, hace entendible pensar, en distintas alternativas para abordar el problema de definir un tamaño de muestra apropiado, diferente al análisis de poder tradicional. Sin embargo, escoger la mejor “n” o tamaño de muestra para estudios basados en microarreglos, mediante el análisis de poder tradicional, basado en el control de los errores tipo I, en la detección de una diferencia de tamaño específico y para probar una sola hipótesis, pueden no ser la opción que mejor se adapte al estudio. De hecho, los métodos para calcular tamaños de muestra han sido desarrollados a lo largo de estas líneas, determinado que la mejor manera de definir tamaños de muestra para el análisis de microarreglos, es controlando la tasa de falsos descubrimientos (FDR). Tomando en cuenta lo anterior, a pesar de que 2 casos de la histología papilar (PAP) fueron incluidos en este estudio y representan un tamaño de muestra muy pequeño, su excelente caracterización, las hace buenos candidatos, estadísticamente hablando, al compararlos con una cohorte mayor, con criterios de inclusión y exclusión menos estrictos.

Pacientes y muestras de tejido

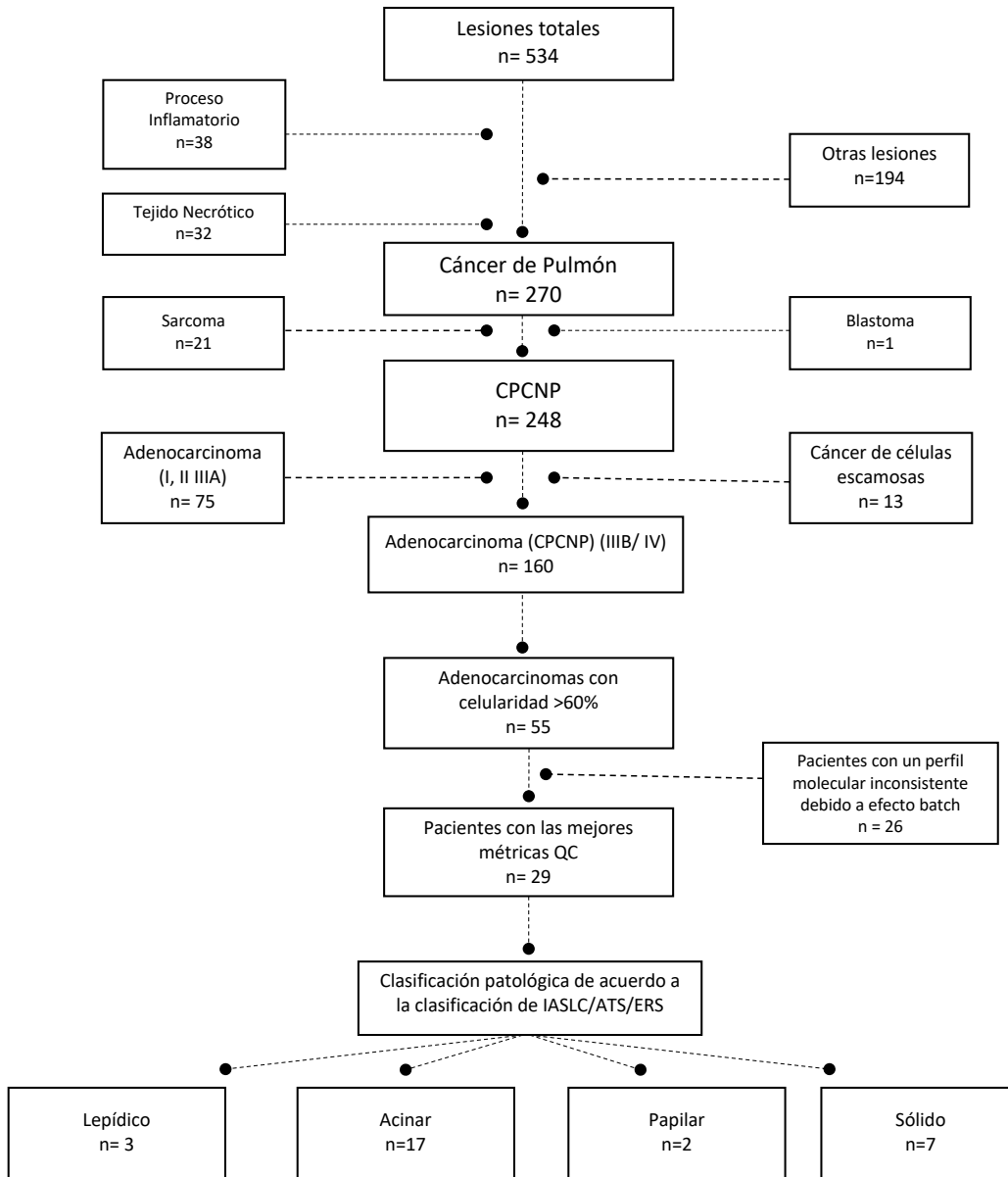
De enero del 2008 a junio del 2011, pacientes admitidos en el INCan con lesiones pulmonares de las que se sospechaba podrían ser cáncer de pulmón fueron sujetos a una biopsia diagnóstica de forma prospectiva. El protocolo clínico fue aprobado por el Comité Científico y de Bioética del INCan (008102510 M1, CB452) y acorde a ello, se solicitó a cada paciente, una carta de consentimiento informado para poder participar en el mismo. El tejido pulmonar fue obtenido mediante una aguja (Tru-Cut, Care-Fusión, San

Diego, CA) guiada por una tomografía computarizada directamente sobre el posible tumor primario.

Los pacientes con confirmación histológica de adenocarcinoma (ADC) de pulmón avanzado (estadios IIIB y IV) fueron elegidos para ser incluidos en este estudio. Si existía alguna evidencia de que el ADC de pulmón, pudiera no ser primario, el paciente era excluido del estudio (Figura 2).

Para el estudio, se obtuvo la historia clínica completa de cada paciente y se cuidó que todos los especímenes tuvieran un diagnóstico confirmado por el laboratorio de patología del INCan. La biopsia de todos los tumores primarios fue obtenida, antes de que los pacientes recibieran cualquier tratamiento y la misma, fue congelada en nitrógeno líquido al momento de su obtención, para la posterior extracción de ARN. A modo de verificación, se trabajó de la mano con un patólogo experto (Dr. Alejandro Avilés Salas) para confirmar de nueva cuenta el diagnóstico histológico del laboratorio de patología del INCan y para cuantificar el número de células tumorales (>60%). **Un total de 29 muestras (biopsias) de pacientes fueron incluidas en el estudio (Figura 2).** De estos, doce pacientes presentaban ADC relacionado al uso del tabaco, mientras que los restantes 17, no presentaban ningún historial de uso de tabaco.

Figura 2. Consort.



Extracción de ARN

El ARN fue extraído de biopsias congeladas que fueron pesadas y crio fracturadas con nitrógeno líquido. El procedimiento de extracción y purificación de ARN total (a partir de al menos 5 mg de tejido), fue realizado con el kit RNeasy Micro (cat. 217 084; Qiagen, Hilden, Germany).

Procesamiento de muestras para el microarreglo Human Gene 1.0 ST de Affymetrix

La concentración de ARN de las muestras seleccionadas para el estudio, fue evaluada mediante el espectrofotómetro ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE). La calidad de cada muestra de ARN fue validada en un chip Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) observando un electrofenograma con dos picos bien definidos en 18S y 28S y un RIN mayor a 7. Las muestras que no cumplían las características de calidad, fueron descartadas del estudio.

De las muestras seleccionadas, se utilizaron 150 ng de ARN total para ser procesados de acuerdo al manual del kit Affymetrix Whole Transcript Sense Target Labeling (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA). A partir de cada muestra con 150 ng de ARN, se realizó la síntesis de la primera hebra de ADN complementario (ADNc) utilizando la transcriptasa reversa Superscript II y los primers (hexámeros al azar) que incorporaron la secuencia del promotor de T7. La síntesis de la segunda hebra complementaria de ADNc se generó a partir del producto de la reacción anterior utilizando una ADN polimerasa. El ADN de doble cadena se utilizó para generar una hebra de ARNc mediante una reacción de transcripción *in vitro* donde se obtuvieron múltiples copias de ARN antisentido. Este ARN se usó como templado para una nueva síntesis de ADNc mediante una reacción de transcripción donde se incorporaron dUTPs, en esta reacción también se utilizaron primers con el promotor de T7 y la Superscript II transferasa. La cadena de ADNc generada se trató con uracilo ADN glicosilasa y apurina pirimidin endonucleasa I (APEI) que reconoció específicamente los dUTPs presentes en la hebra generando fragmentos de 40-70 nucleótidos, los cuales se marcaron utilizando el kit de marcaje patentado por

Affymetrix. El ADN marcado, se hibridó a los microarreglos, se incubaron por 18 hr a 45°C, se lavaron con un amortiguador de baja astringencia y enseguida se tiñeron con un anticuerpo anti estreptavidina marcado con fluorescencia. Los microarreglos se leyeron en un escáner de alta resolución y el análisis se realizó utilizando el programa Expression Console de Affymetrix.

El microarreglo Human Gene 1.0 ST de Affymetrix interroga 28, 869 genes con una anotación precisa, repartidos en 764, 885 pruebas distintas (en promedio 26 pruebas por gen). Las anotaciones provienen de referencias curadas de la base de datos de secuencias de referencia “Ref Seq”, la base de datos completa del navegador de genomas “EMBL/EBI Ensembl” y de ARNm anotado con su secuencia codificante completa en la base de datos de secuencias genéticas “GeneBank” [148].

Análisis de Microarreglos

El análisis de datos, tiene una importancia similar a la cuidadosa selección de las muestras. La corrección de fondo y la normalización, fueron realizados utilizando el algoritmo estándar RMA (Robust Multiarray Average) [149], sobre el paquete bioinformático Bioconductor [150] para R [151]. La modelación de la expresión génica, se realizó a través de modelos lineales utilizando el paquete Limma [152]. El estadístico B (B-statistic), fue utilizado como el estadístico de corte para escoger los genes con expresión diferencial estadísticamente significativa. Este estadístico se calcula como la probabilidad posterior de la expresión diferencial y ha probado funcionar incluso con tamaños de muestra pequeños, asumiendo que al menos el 1% de los genes se encuentran expresados diferencialmente entre las diferentes condiciones como prioridad en un marco Bayesiano. Es reformulado en términos de un estadístico-t moderado, en donde las desviaciones estándar residuales posteriores, son usadas en lugar de aquellas ordinarias. Esencialmente, el estadístico B comprende lo existente entre los estimados de varianza individual y la varianza única estimada para todos los genes. Las probabilidades son transformadas a una escala que va de $-\infty$ a ∞ utilizando probabilidades log. Entonces, los genes que presentaron tasas de cambio ≥ 2 (Fold-change ≥ 2) y un valor de $p < 0.05$, fueron considerados como genes con expresión estadísticamente diferencial. Para controlar la tasa de falsos positivos, se aplicó una

corrección de prueba múltiple FDR de Benjamini-Hochberg [153]. Se realizaron análisis de arreglos jerárquicos supervisados en comparaciones pareadas, utilizando la distancia Euclidiana y enlaces promedio mediante la herramienta gplots del paquete R [154]. Los resultados del clúster de genes, se visualizan en un heatmap, en donde claramente podemos ver contrastes entre el patrón predominantemente lepidico (LEP) vs los demás patrones predominantes acinar (ACN), papilar (PAP) y sólido (SOL) (Figuras 9-11).

De forma similar, un análisis de vías demostró los contrastes de los resultados. Los métodos de enriquecimiento de genes, también implementan estrategias para abordar el problema de probar múltiples hipótesis. La plataforma en línea Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Redwood City, CA, USA), evalúa los patrones de expresión enriquecidos utilizando la prueba de valor exacto de p de Fisher. Adicionalmente, calcula el marcador Z que permite inferir reguladores transcripcionales río arriba y las funciones enriquecidas previsible, basándose en la significancia estadística, al comparar las coincidencias entre los patrones de expresión al alta/baja. El modelo nulo se denomina puntaje Z de activación [155]. La predicción de patrones de regulación está basada en relaciones causales previamente reportadas entre los genes que resultaron relevantes y sus funciones reportadas.

Perfiles de expresión génica

Las muestras fueron clasificadas en 4 grupos histológicos: (1) acinar (ACN), (2) lepidico (LEP), (3) papilar (PAP) y (4) sólido (SOL) (Figuras 5 A-D); los perfiles se obtuvieron usando la versión de microarreglo (chip) oligo Affymetrix Human Gene ST 1.0. Para identificar los genes con expresión diferencial de cada grupo, se realizaron comparaciones pareadas como a continuación se indica: PAP vs LEP, SOL vs LEP y ACN vs LEP (Figura 3). Los genes con una tasa de cambio > 2 (Fold-change) y una $P \leq 0.05$ (Figuras 6-8), fueron designados como genes con expresión diferencial [156].

Para realizar el análisis funcional y de biomarcadores, se utilizó el programa en línea Qiagen Ingenuity Pathway (IPA; Qiagen, Redwood City, CA), www.qiagen.com/ingenuity). El programa IPA, fue utilizado para identificar las vías de señalización génica envueltas en procesos y funciones biológicas, así como biomarcadores reportados e indexados en su base de datos. Los filtros para identificar

biomarcadores incluyen los genes reportados en otros estudios sobre cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) (ej. Diagnósticos, pronósticos y de eficacia a tratamientos).

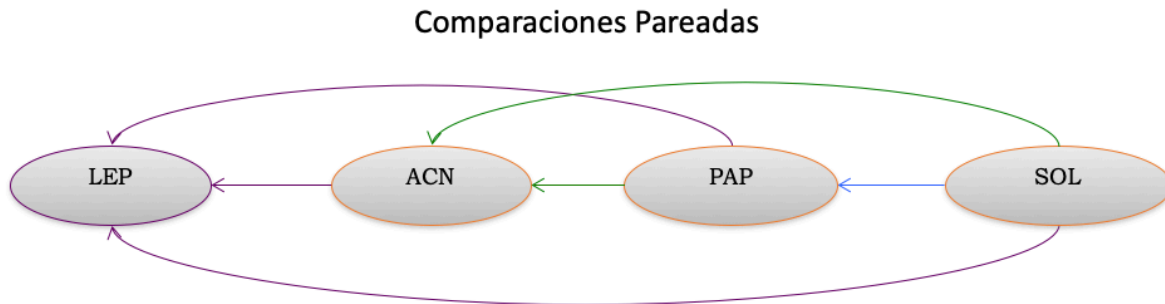


Figura 3. Comparaciones pareadas PAP vs LEP, SOL vs LEP y ACN vs LEP.

Aprobación del comité de ética y consentimiento informado

El consentimiento informado escrito y firmado por cada uno de los pacientes, fue obtenido antes de solicitar la muestra de la biopsia de cada paciente. El protocolo clínico fue aprobado (008102510 M1, CB452) por el comité científico y de bioética del INCan.

Resultados

Un total de 29 muestras de pacientes con una edad promedio de 62.4 años fueron analizadas. De estas, 65.5% eran mayores de 60 años, 58.6% (17/29) eran mujeres y 41.4% (12/29) eran hombres. En total, 58.6% de los pacientes no reportaron historial de uso de tabaco.

El 34.5% de los pacientes presentaron alguna mutación de EGFR. Un paciente presentó rearrreglos en ALK y uno más fue positivo para KRAS.

El pulmón contralateral fue el más comúnmente afectado (58.6%). Además, el 20.7% de los pacientes presentó metástasis a sistema nervioso central y hueso. El subtipo de adenocarcinoma (ADC) más frecuente fue acinar (ACN) con 58.6% (17/29), seguido de sólido (SOL) con 24.1% (7/29), lepidico (LEP) con 10.3% (3/29) y papilar (PAP) con 6.8% (2/29) (Figura 3 y 4 A-D); no encontramos ningún caso con el subtipo micropapilar (MIP). Es importante mencionar que 13 de los pacientes exhibían un patrón histológico puro, mientras que los 16 restantes, presentaban un patrón mixto. La mayoría de los pacientes presentaban un ECOG (Eastern Cooperative Group Performance Status) de 0-1 (79.35%). En todos los pacientes, la respuesta más común al tratamiento en primera línea fue progresión a la enfermedad (31%), seguida de respuesta parcial (17.2%), enfermedad estable (13.8%) y, por último, respuesta completa (3.4%) (Tabla 4).

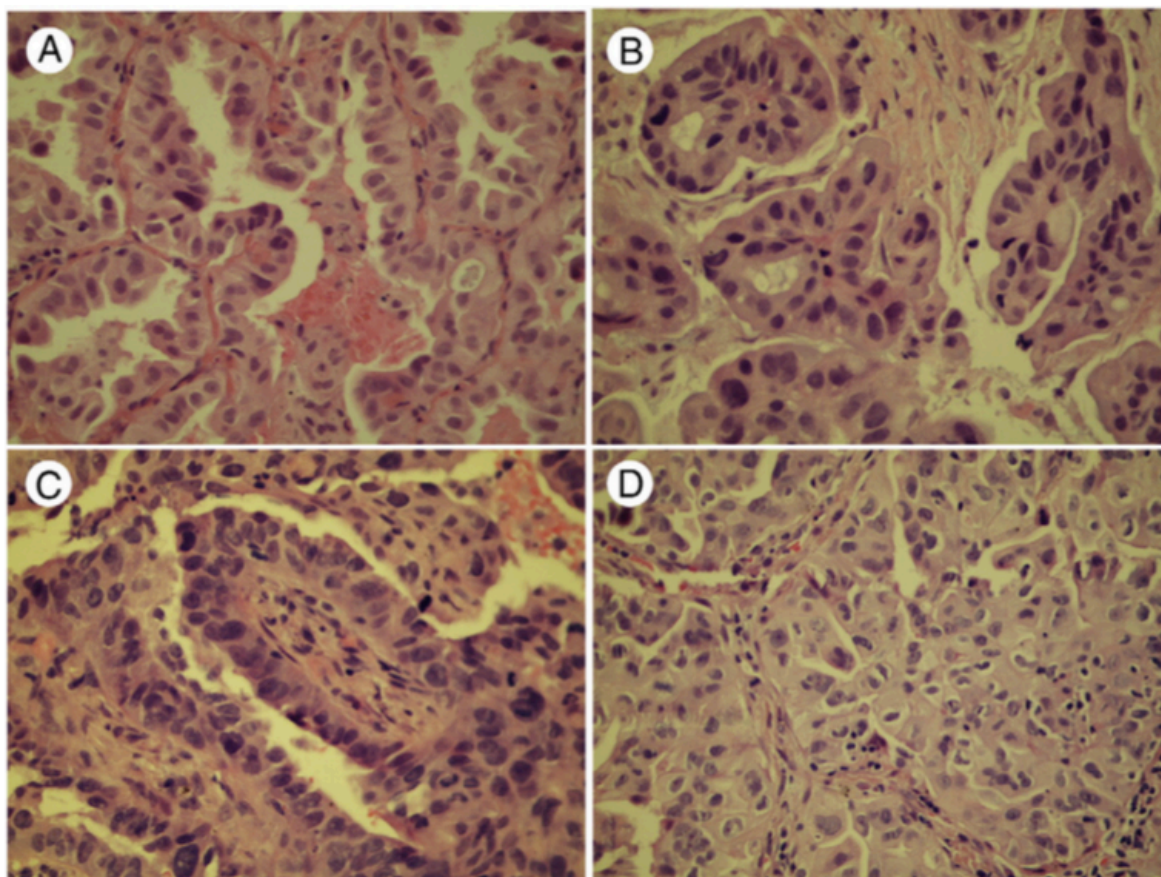


Figura 4. Micrografías que muestran los 4 subtipos de adenocarcinoma estudiados. A) ADC LEP (H&E, x200), B) ADC ACN (H&E, x200), C) ADC PAP (H&E, x200), D) ADC SOL (H&E, x200).

No se identificó ninguna asociación con significancia estadística al correlacionar fumadores, no fumadores o presencia de mutaciones de EGFR al correlacionarlos con el subtipo histológico. El promedio de tiempo de seguimiento de los pacientes fue de 12.2 meses (95%, CI: 0-26.9). La media de sobrevida global fue de 34.8 meses (95%, CI: 21.1-48.5)

Tabla 4. Características clínico-patológicas y moleculares al diagnóstico (N=29)					
Variable	% (n/N)	Lepídico (n=3)	Papilar (n=2)	Acinar (n=17)	Sólido (n=7)
Género					
Femenino	58.6(17/29)	3/3	1/2	10/17	3/7
Masculino	41.4 (12/29)		1/2	7/17	4/7
Edad					
Media (±SD)	62.41±11.5	54.7±8.3	59.5±6.3	62.7±8.9	66±10.4
Edad					
>60 años	65.5 (19/29)	3/3	1/2	11/17	4/7
< 60 años	34.5(10/29)	0/3	1/2	6/17	3/7
Índice tabáquico					
Mediana (IQR)	7(35.7)	20 (0)	1(0)	4.2(25.7)	35(6)
Exposición a tabaco					
Presente	41.4 (12/29)	1/3	1/2	7/17	3/7
Ausente	58.6 (17/29)	2/3	1/2	10/17	4/7
Exposición a Asbestos					
Presente	3.4 (1/29)	0/3	0/2	1/17	0/7
Ausente	96.6 (28/29)	3/3	2/2	16/17	7/7
Estadio					
IIIB	3.4 (1/29)		1/2	0/17	0/7
IV	79.3 (23/29)	3/3	1/2	12/17	
Recurrente	17.2 (5/29)				7/7
ECOG					
0-1	79.3(23/29)	2/3	2/2	14/17	5/7
2-4	20.7 (6/29)	1/3	0/2	3/17	2/7
Metástasis					
Pulmón contralateral	58.6(17/29)	1/3	0/2	12/17	4/7
Hueso	20.7 (6/29)	3/3	0/2	1/17	2/7

SNC	20.7 (6/29)	0/3	1/2	3/17	2/7
Hígado	6.9 (2/29)	0/3	0/2	1/17	1/7
Glándula Adrenal	6.9 (2/29)	0/3	0/2	1/17	1/7
Signos y síntomas					
Disnea	48.3 (14/29)	0/3	1/2	8/17	5/7
Tos	48.3 (14/29)	1/3	1/2	9/17	3/7
Pérdida de peso	51.7 (15/29)	2/3	1/2	7/17	5/7
Hemoptisis	13.8 (4/29)	0/3	0/2	3/17	1/7
Dolor	10.3 (3/29)	1/3	0/2	1/17	1/7
Efusión Pleural	20.7 (6/29)	0/3	0/2	4/17	2/7
Mutación de EGFR					
Positivo	34.5 (10/29)	1/3	1/2	7/17	1/7
Mutación de KRAS					
Positivo	3.4 (1/29)	0/3	0/2	1/17	0/7
Negativo	86.2 (25/29)	2/3	2/2	15/17	6/7
Rearreglos de ALK					
Positivo	3.4 (1/29)	0/3	0/2	1/17	0/7
Negativo	86.2 (25/29)	2/3	2/2	15/17	6/7
CEA al diagnóstico					
Mediana (IQR)	53.1(2079)	238 (1917)	2850 (2.1)	53.1 (1213)	31.5 (56.7)
Respuesta					
RC	3.4 (1/29)	0/3	0/2	1/17	0/7
RP	17.2 (5/29)	1/3	0/2	3/17	1/7
EE	13.8 (4/29)	0/3	2/2	2/17	0/7
EP	31 (9/29)	1/3	0/2	8/17	0/7
No Evaluable	34.5 (10/29)	1/3	0/2	3/17	6/7
ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico; ALK: Cinasa de linfoma Anaplásico.					

Identificación de genes con expresión diferencial

Los genes con expresión diferencial estadísticamente significativa, fueron seleccionados si cumplían con una tasa de cambio > 2 (Fold-change) y una $P \leq 0.05$ (Figuras 5-7). Las diferencias en la expresión génica están presentadas en las Figuras 8-10, en ellas, se representa un arreglo jerárquico no supervisado de los perfiles de expresión que presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) al comparar por subtipo histológico: Papilar vs lepidico (PAP vs LEP), sólido vs lepidico (SOL vs LEP) y acinar vs lepidico (ACN vs LEP). Usando estos dos estadísticos, podemos observar claramente las proporciones de genes sobre- y sub-expresados en el patrón LEP, el cual, presenta claras diferencias de expresión al compararlo con los otros subtipos histológicos.

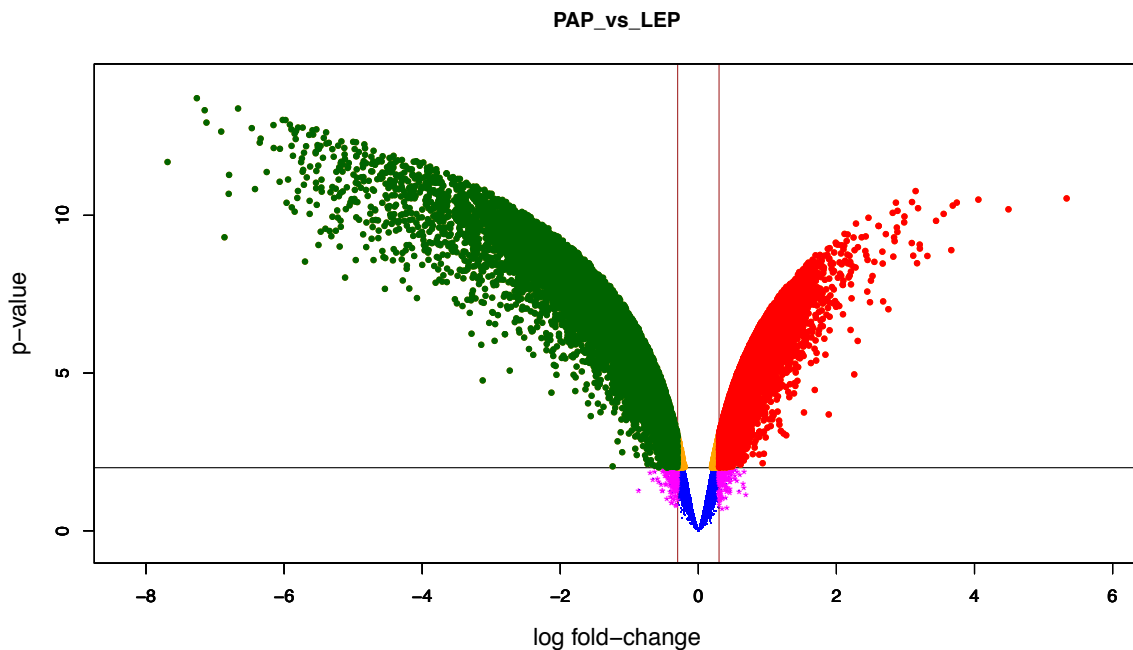


Figura 5. Volcano plot que muestra la expresión génica diferencial en pacientes con los subtipos de adenocarcinoma de pulmón PAP vs LEP. Las tasas de cambio (Fold-change) se encuentran representados en base log2 en el eje de la x y el nivel de confianza de la forma $-\log_{10}$ (valores de p) en el eje de la y. El valor de corte de 10^{-2} usado es 2 en el eje de las y (esquinas superiores izquierda y derecha). Los puntos rojos y verdes representan a los genes sobre y sub expresados respectivamente: fold-change (≥ 2) y un nivel de significancia ($p < 0.05$). El color amarillo representa los genes con significancia estadística pero una tasa de cambio (Fold-change) baja. El color magenta indica cambios en la expresión robustos, pero sin significancia estadística y el azul indica a los genes que presentan una tasa de cambio (Fold-change) baja y una pobre significancia estadística.

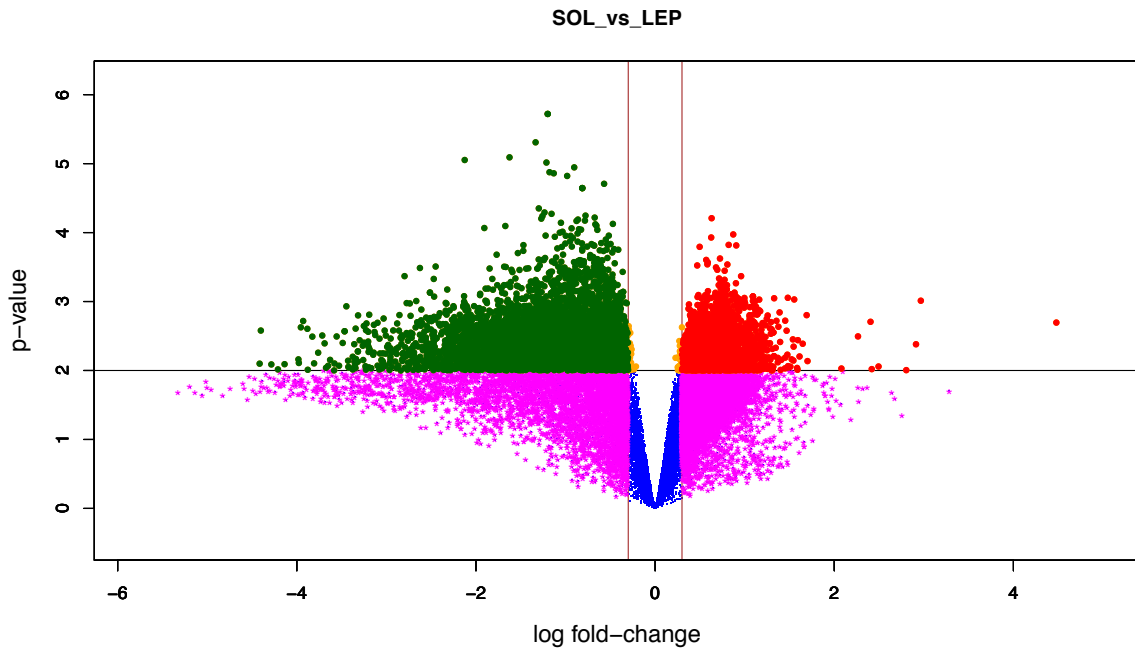


Figura 6. Volcano plot que muestra la expresión génica diferencial en pacientes con los subtipos de adenocarcinoma de pulmón SOL vs LEP. Las tasas de cambio (Fold-change) se encuentran representados en base log₂ en el eje de la x y el nivel de confianza de la forma $-\log_{10}$ (valores de p) en el eje de la y. El valor de corte de 10^{-2} usado es 2 en el eje de las y (esquinas superiores izquierda y derecha). Los puntos rojos y verdes representan a los genes sobre y sub expresados respectivamente: fold-change (≥ 2) y un nivel de significancia ($p < 0.05$). El color amarillo representa los genes con significancia estadística pero una tasa de cambio (Fold-change) baja. El color magenta indica cambios en la expresión robustos, pero sin significancia estadística y el azul indica a los genes que presentan una tasa de cambio (Fold-change) baja y una pobre significancia estadística.

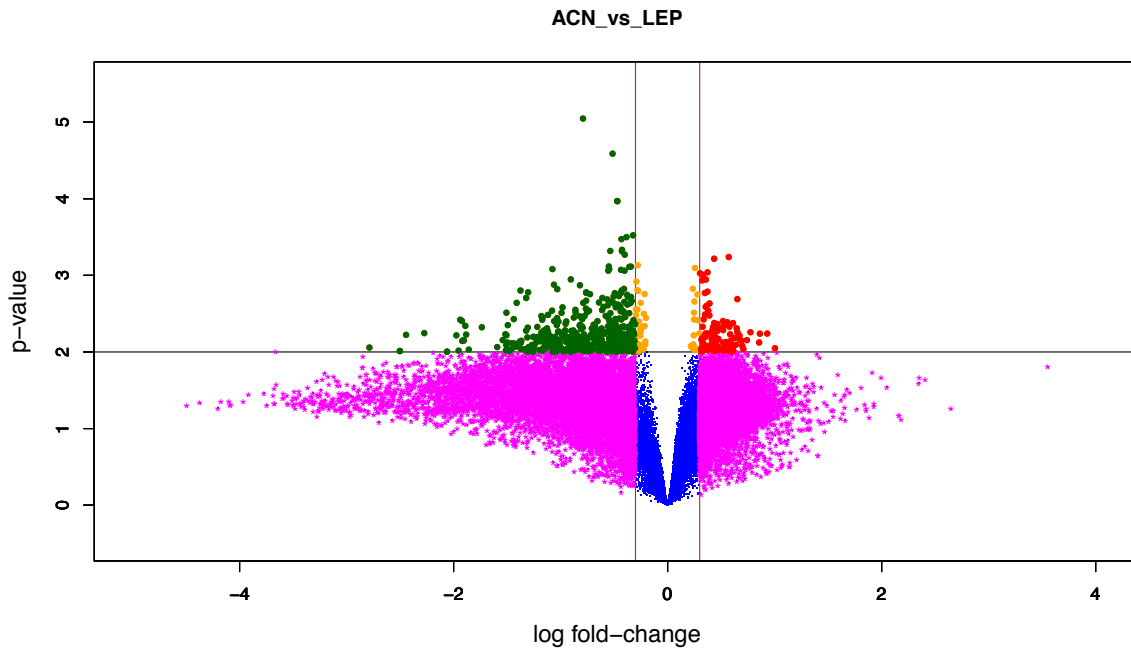


Figura 7. Volcano plot que muestra la expresión génica diferencial en pacientes con los subtipos de adenocarcinoma de pulmón ACN vs LEP. Las tasas de cambio (Fold-change) se encuentran representados en base log2 en el eje de la x y el nivel de confianza de la forma $-\log_{10}$ (valores de p) en el eje de la y. El valor de corte de 10^{-2} usado es 2 en el eje de las y (esquinas superiores izquierda y derecha). Los puntos rojos y verdes representan a los genes sobre y sub expresados respectivamente: fold-change (≥ 2) y un nivel de significancia ($p < 0.05$). El color amarillo representa los genes con significancia estadística pero una tasa de cambio (Fold-change) baja. El color magenta indica cambios en la expresión robustos, pero sin significancia estadística y el azul indica a los genes que presentan una tasa de cambio (Fold-change) baja y una pobre significancia estadística.

Expresión diferencial de genes entre los subtipos histológicos de adenocarcinoma

Se realizaron análisis de arreglos jerárquicos supervisados en comparaciones pareadas entre los 4 patrones de subtipos histológicos. Las únicas comparaciones que revelaron diferencias estadísticamente significativas en los perfiles de expresión génica ($P > 0.01$) fueron las siguientes: Papilar vs lepidico (PAP vs LEP), sólido vs lepidico (SOL vs LEP) y acinar vs lepidico (ACN vs LEP) (Figuras 8-10). En la comparación de patrones histológicos predominantes PAP vs LEP, un total de 4066 genes sobre-expresados y 3943 genes sub-expresados fueron identificados (Figura 8). Para la comparación de patrones histológicos predominantes SOL vs LEP, un total de 29 genes sobre-expresados y 106 genes sub-expresados fueron identificados (Figura 9). En el caso de la comparación de patrones histológicos predominantes ACN vs LEP, un total de 49 genes sobre-expresados y 113 genes sub-expresados fueron identificados (Figura 10). Adicionalmente, se encontraron 13 genes con un patrón único de expresión en el subtipo histológico LEP al compararlo contra los demás subtipos histológicos analizados (Figura 11 a-b). Para identificar biomarcadores y el impacto funcional de este grupo de genes sobre- y sub-expresados, usamos el software de IPA.

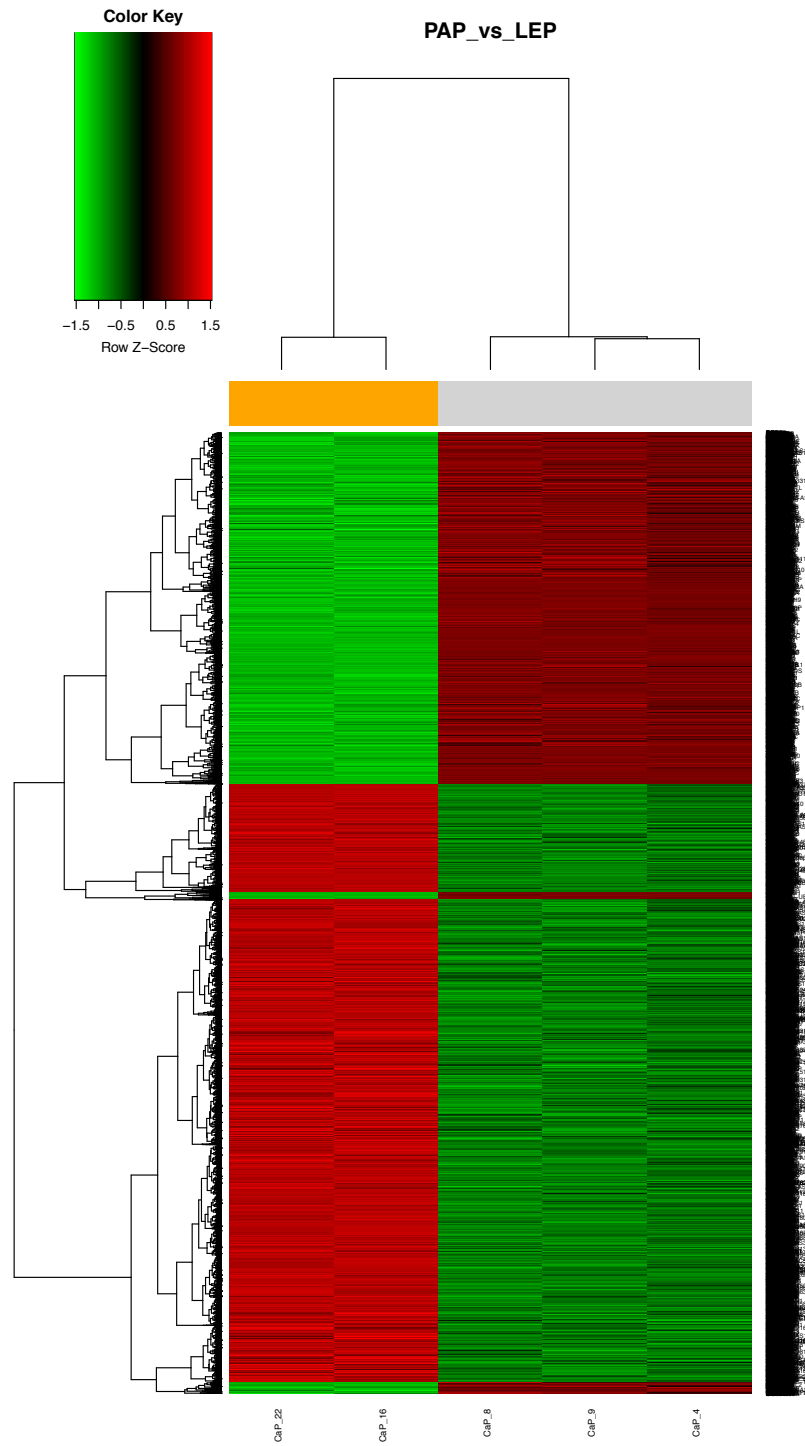


Figura 8. Heatmap con los genes sub- y sobre-expresados ($P < 0.05$) presentes en la comparación de los subtipos histológicos PAP y LEP. Cada columna representa un paciente y cada fila representa un gen. Rojo: sobre-expresado; verde: sub-expresado.

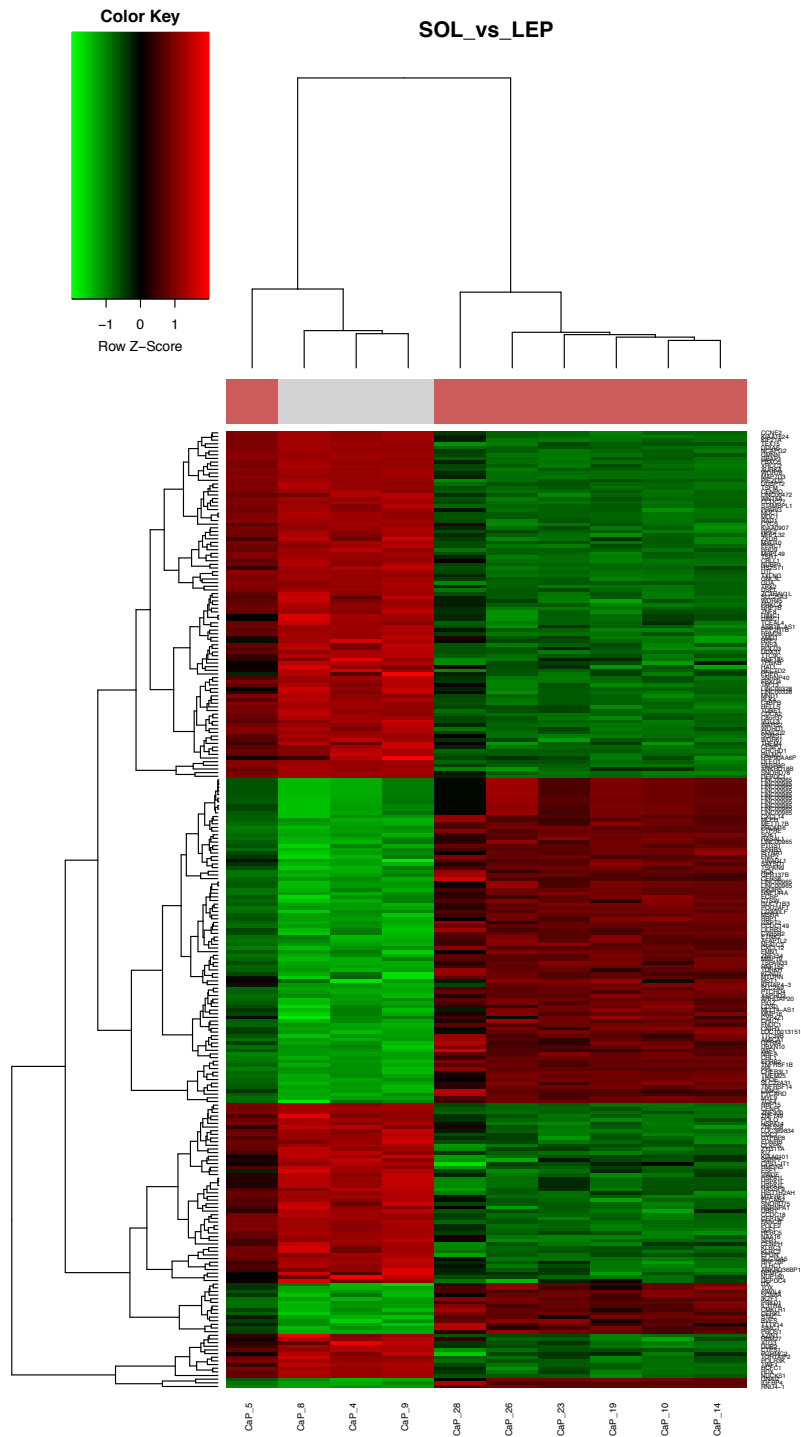


Figura 9. Heatmap con los genes sub- y sobre-expresados ($P < 0.05$) presentes en la comparación de los subtipos histológicos SOL y LEP. Cada columna representa un paciente y cada fila representa un gen. Rojo: sobre-expresado; verde: sub-expresado.

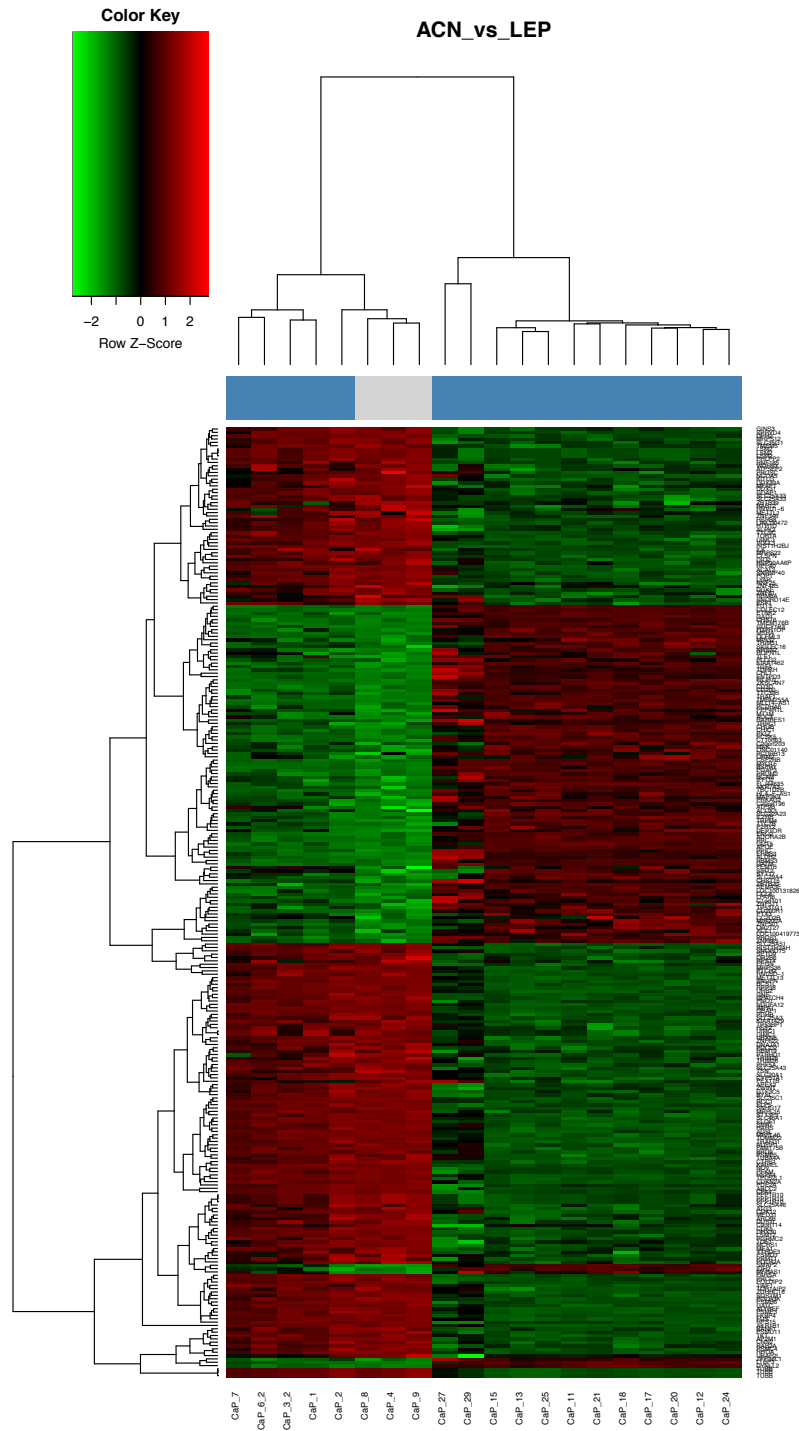


Figura 10. Heatmap con los genes sub- y sobre-expresados ($P < 0.05$) presentes en la comparación de los subtipos histológicos ACN y LEP. Cada columna representa un paciente y cada fila representa un gen. Rojo: sobre-expresado; verde: sub-expresado.

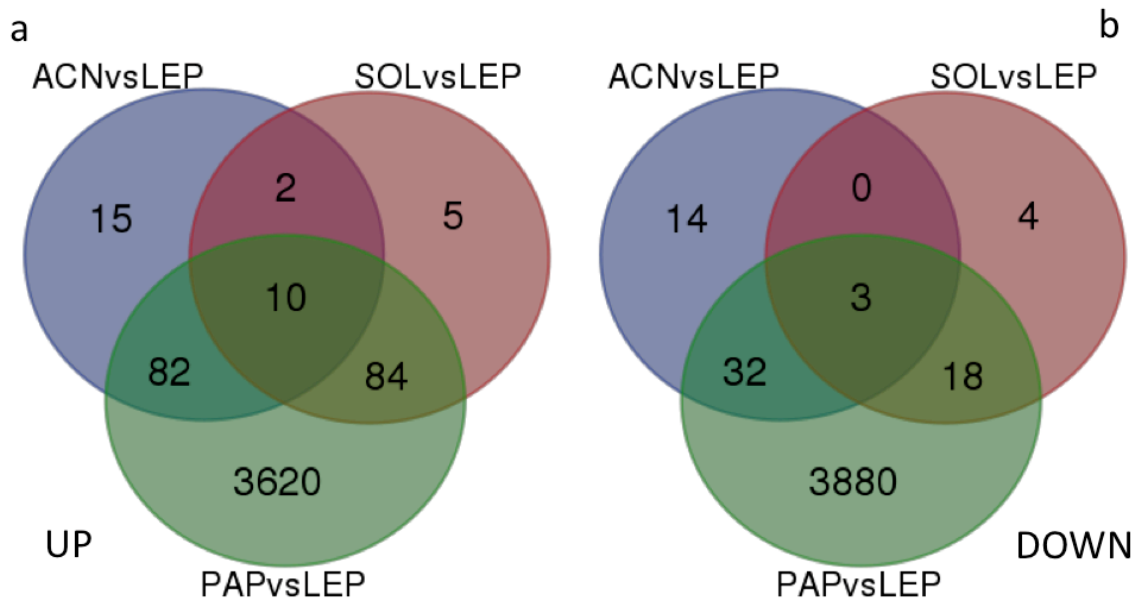


Figura 11. Diagrama de Venn que muestra los genes (a) sobre- y (b) sub-expresados con un patrón único de expresión para el subtipo histológico lepidico (LEP) al contrastarlo contra los demás patrones histológicos papilar (PAP), sólido (SOL) y acinar (ACN).

Análisis funcional y de biomarcadores

Usamos el software IPA para identificar biomarcadores y tratar de predecir el impacto funcional de 3 grupos de genes sobre- y sub-expresados (Papilar vs lepidico (PAP vs LEP), sólido vs lepidico (SOL vs LEP) y acinar vs lepidico (ACN vs LEP)). Para la comparación de patrones predominantes PAP vs LEP, un total de 31 genes sobre-expresados y 45 sub-expresados, se reportaron como biomarcadores o que participan en alguna vía funcional (Tabla 5) en diferentes tipos histológicos de CPCNP y al menos una de las siguientes categorías: diagnóstico, progresión de la enfermedad, eficacia, pronosis, seguridad, y respuesta a tratamiento. Para la comparación de patrones predominantes SOL vs LEP un total de 3 genes sobre-expresados y 4 sub-expresados aparecen reportados como biomarcadores (Tabla 6). Todos estos genes fueron descritos en diferentes carcinomas (CPCNP, renal, colorrectal, pancreático, mama, cerebro, cervical y de riñón) y se encuentran envueltos en al menos 1 de las siguientes categorías funcionales: diagnóstico, progresión de la enfermedad, eficacia y pronosis. Para la comparación de patrones predominantes ACN vs LEP un total de 6 genes sobre-expresados y 7 sub-expresados fueron reportados como posibles biomarcadores (Tabla 7). Todos estos genes fueron descritos en diferentes carcinomas (CPCNP, renal, colorrectal, endometrial, cabeza y cuello, mama, cerebro, hígado y riñón) y fueron asociados a las siguientes categorías funcionales: diagnosis, progresión a la enfermedad, eficacia del tratamiento y pronóstico clínico.

El análisis funcional y de enriquecimiento en redes biológicas fue realizado con el software IPA. Para la comparación de los 4 subtipos histológicos predominantes, las redes funcionales más importantes fueron relacionadas con 8 categorías biológicas diferentes que se enumeran a continuación: replicación de ADN, recombinación y reparación, ciclo celular, muerte y supervivencia celular, modificaciones postranscripcionales del ARN, cáncer, daño y anormalidades del organismo y desarrollo celular (Tabla 8).

Tabla 5. Biomarcadores de la comparación PAP vs LEP		
Biomarcador	Fold Change	Aplicación basada en lo reportado por AACR o ClinicalTrials.gov
<i>CDH13</i>	2.772	Diagnóstico de neoplasia pulmonar. AACR Meeting Abstracts.
<i>PRKCB</i>	2.147	Eficacia del enzastaurin en el tratamiento del CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00105092
<i>DLK1</i>	2.034	La sobre expresión del ARNm de <i>DLK,1</i> está asociada con adenocarcinoma bronco alveolar. Cancer Res. 2007 Sep 15;67(18):8494-503.
<i>STAT3</i>	1.985	La eficacia de erlotinib y sorafenib en el tratamiento del CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00801385 / La eficacia de AZD 0530 [saracatinib] en el tratamiento del CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00638937
<i>MPO</i>	1.977	Diagnóstico del CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00450281
<i>OSMR</i>	-6.464	La eficacia de GEFITINIB en el tratamiento del CPCNP. AACR Meeting Abstracts.
<i>B2M</i>	-5.928	La seguridad del cisplatino en el tratamiento de CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00213642
<i>LDHA</i>	-5.845	La eficacia de PAZOPANIB en el tratamiento del CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00367679
<i>CD24</i>	-5.519	Pronóstico del CPCNP. AACR Meeting Abstracts.
<i>CDKN1B</i>	-5.439	Progresión del CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00093756
Abreviaciones: CDH13: Cadherina 13; PRKCB: Proteína cinasa C Beta; DLK1: Ligando de muesca no canónico parecido a delta 1; STAT3: Traductor y activador de señales de transcripción 3; MPO: Mieloperoxidasa; OSMR: Receptor de oncostatina M; B2M: Beta-2-Microglobulina; LDHA: Lactato Deshidrogenasa A; CD24: Molécula CD24; CDKN1B: Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1B.		

Tabla 6. Biomarcadores de la comparación SOL vs LEP		
Biomarcador	Fold Change	Aplicación basada en lo reportado por AACR o ClinicalTrials.gov
<i>PDGFRA</i>	2.121	Pronóstico del cáncer colorrectal. Estudio fase II para el uso de Sorafenib/Avastin® como terapia de rescate en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00826540
<i>PPL</i>	2.067	Diagnóstico en cáncer de vejiga.
<i>APOE</i>	1.942	El papel de los marcadores de inflamación en la predicción de recurrencia a la enfermedad y el desempeño cognitivo en mujeres con un alto riesgo para cáncer de mamá o cáncer de mama localmente avanzado. ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00756132?term=Role+of+Inflammatory+Markers+in+Predicting+Disease+Recurrency&rank=1
<i>XRCC2</i>	-3.346	Diagnóstico de cáncer de páncreas.
<i>TERF1</i>	-2.831	Diagnóstico de CPCNP.
<i>GPC3</i>	-2.064	Diagnóstico de cáncer de hígado y de mama.
<i>ARHGDIB</i>	-1.839	Diagnóstico de cáncer de mama y de cérvix.
Abreviaciones: PDGFRA: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa; PPL: Periplakina; APOE: Apolipoproteína E; XRCC2: X-Ray Repair Cross Complementing 2; TERF1: Factor de unión de repeticiones teloméricas 1; GPC3: Glipican 3; ARHGDIB: Inhibidor de la disociación de Rho GDP Beta.		

Tabla 7. Biomarcadores de la comparación ACN vs LEP		
Biomarcador	Fold Change	Aplicación basada en lo reportado por AACR o ClinicalTrials.gov
<i>APOE</i>	1.619	El papel de los marcadores de inflamación en la predicción de recurrencia a la enfermedad y el desempeño cognitivo en mujeres con un alto riesgo para cáncer de mamá o cáncer de mama localmente avanzado. ClinicalTrials.gov. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00756132?term=Role+of+Inflammatory+Markers+in+Predicting+Disease+Recurrency&rank=1
<i>PPL</i>	1.593	Diagnóstico en cáncer de vejiga.
<i>IGF2</i>	1.421	Diagnóstico de cáncer de ovario, colorrectal y tumor de Wilms. AACR Meeting Abstracts.
<i>ELAVL1</i>	1.303	Eficacia del paclitaxel en el tratamiento del cáncer de mama. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00567554
<i>UCHL1</i>	1.249	Diagnóstico de carcinoma nasofaríngeo, cáncer de hígado y vejiga.
<i>CDKN2A</i>	-2.280	Para medir la eficacia del tratamiento con cisplatino/docetaxel en CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00030771
<i>FN1</i>	-1.775	Diagnóstico de neoplasia pulmonar.
<i>IL6</i>	-1.489	Seguridad de la radioterapia en el tratamiento del CPCNP. https://clinicaltrials.gov/show/NCT00349102
<i>SPP1</i>	-1.483	Diagnóstico del cáncer de ovario, cérvix, mama, carcinoma nasofaríngeo y mesotelioma.
Abreviaciones: APOE: Apolipoproteína E; PPL: Perioplakina; IGF2: Factor de crecimiento parecido a la insulina 2; ELAVL1: Proteína de unión al ARN parecida a ELAV 1; UCHL1: Hidrolasa c-terminal de ubiquitina L1; CDKN2A: Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A; FN1: Fibronectina 1; IL6: Interleucina 6; SPP1: Fosfoproteína secretada 1.		

Tabla 8. Lista de categorías de funciones biológicas de IPA

Función	PAP vs LEP	ACN vs LEP	SOL vs LEP	Únicos LEP
Replicación del ADN	✓	✓	✓	✓
Recombinación y reparación	✓	✓	✓	✓
Ciclo Celular	✓	✓	✓	✓
Supervivencia y muerte celular	✓	✓	✓	
Modificaciones postranscripcionales del ARN	✓	✓	✓	
Cáncer	✓	✓	✓	
Daño y anormalidades del organismo	✓	✓	✓	
Desarrollo celular	✓	✓	✓	
Desarrollo y función del sistema nervioso	✓	✓		
Señalización e interacción célula-célula	✓	✓		
Desarrollo embrionario	✓	✓		
Metabolismo de lípidos	✓			✓
Bioquímica de moléculas pequeñas	✓			✓
Enfermedad del sistema reproductivo	✓		✓	
Desórdenes del desarrollo	✓		✓	
Movimiento celular	✓		✓	
Organización y ensamblaje celular	✓	✓		
Morfología celular	✓	✓		
Compromiso celular	✓	✓		
Crecimiento y proliferación celular		✓	✓	
Morfología del tejido	✓			
Respuesta celular a terapias	✓			
Enfermedad metabólica	✓			
Desorden Hereditario	✓			
Expresión génica	✓			
Transporte molecular	✓			
Respuesta inflamatoria	✓			
Desórdenes del sistema endócrino	✓			
Desórdenes del sistema conectivo	✓			
Desarrollo y función del esqueleto-muscular	✓			
Metabolismo de vitaminas y minerales				✓
Enfermedades infecciosas				✓
Plegamiento de proteínas		✓		
Desarrollo y función del tejido		✓		
Desarrollo y función del sistema hematológico			✓	
Función y mantenimiento celular			✓	
Desórdenes esqueleto-musculares			✓	
Enfermedad hematológica			✓	
Tráfico del sistema inmune			✓	

Firma de expresión genética del subtipo histológico lepidico

Como se mencionó previamente, se identificaron 13 genes con expresión diferencial (10 sobre-expresados y 3 sub-expresados) en el patrón lepidico (LEP) al compararlo con los demás patrones histológicos predominantes del estudio (Figura 11 a-b y Tabla 9). El análisis funcional y de enriquecimiento identificó diferentes redes funcionales relacionadas con 6 categorías biológicas diferentes que se mencionan a continuación: metabolismo de lípidos, bioquímica de moléculas pequeñas, metabolismo de minerales y vitaminas, replicación del ADN, recombinación y reparación y ciclo celular. Todas estas categorías incluyen a la gran mayoría de los genes con expresión única ya mencionados (12/13). Tres de las categorías/funciones biológicas (replicación del ADN, ciclo celular, así como recombinación y reparación) son compartidas por todos los subtipos histológicos comparados (Tabla 8).

Los genes sub-expresados incluyen a la apolipoproteína E (*APOE*), periplakina (*PPL*) y a la molécula de adhesión celular 1 (*CHL1*) (Tabla 9).

Los genes sobre-expresados incluyen al gen parecido al supresor vestigial 3 (*VGLL3*), epigene (*EPGN*), motivo de interacción con ubiquitina 1 (*UIMC1*), claspina (*CLSPN*), proteína con bromodominios 9 (*BRD9*), sintasa CTP 1 (*CTPS1*), ARN largo intergénico no-codificante 472 (*LINC00472*), grupo de histonas 1 H2ah (*HIST1H2HA*), pseudogén de la glucosidasa ácida beta 1 (*GBAP1*) y la ribonucleoproteína nuclear pequeña de 40kDa (U5) (*SNRPNP40*) (Tabla 9).

Tabla 9. Función e implicaciones de los genes sobre y sub expresados únicamente en el patrón LEP vs (PAP, SOL, ACN). ↓: sub-expresado; ↑: sobre-expresado.		
Símbolo	Fx	Lo reportado
↓ <i>APOE</i>	Esencial en el catabolismo de constituyentes de lipoproteínas ricas en triglicéridos.	Al estar sobre expresado, promueve la proliferación y migración celular.
↓ <i>PPL</i>	Fx en vía de señalización de AKT1/PKB, esta es importante en procesos de supervivencia y crecimiento celular.	Baja expresión promueve un fenotipo metastásico en ADC escamoso.
↓ <i>CHL1</i>	Molécula de reconocimiento neural que podría estar envuelta en vías de transducción de señales.	Cuando su expresión es alta, ha correlacionado con progresión, propagación y metástasis en NSCLC.
↑ <i>VGLL3</i>	Esta molécula podría fx como coactivador de los TEFs de mamíferos.	Gen con potencial supresor capaz de inhibir progresión tumoral. Se ha relacionado con la supervivencia global en cáncer de próstata.
↑ <i>EPGN</i>	Ligando de EGFR, juegan un importante rol en supervivencia, proliferación y migración celular.	Su expresión ha sido asociada a una mayor supervivencia en cáncer de mama.
↑ <i>UIMC1</i>	Participa en vías de señalización del ciclo celular, mitosis y daño a ADN.	Su expresión, correlaciona positivamente con supervivencia en ADC pulmonar y cáncer de mama.
↑ <i>CLSPN</i>	Proteína adaptativa del ciclo celular relacionada con Chk1.	Su sobre regulación disminuye la respuesta a la radiación en modelos de xenotransplante en animales.
↑ <i>BRD9</i>	Unión a ácidos nucleicos e histonas. Funciona en la remodelación de la cromatina y regulación de la transcripción. Su función exacta es poco comprendida.	Ha sido propuesta como un posible blanco oncológico para el desarrollo de inhibidores específicos (2019) pues su inhibición resulta en cambios de

		expresión relacionados con la apoptosis. (2020)
↑CTPS1	Conversión catalítica de UTP a CTP. Muy importante en síntesis de fosfolípidos ácidos nucleicos.	La pérdida de fx está asociada con inmunodeficiencia.
↑LINC00472	ARN de clase no codificante.	Su sobre expresión inhibe a miR-149-3p y a miR4270 activando la vía de p53 <i>in vivo</i> . (2019)
↑HIST1H2AH	Componente del nucleosoma.	No hay reportes, pero se sabe que la familia H2AH se encuentra comúnmente alterada en cáncer.
↑GBAP1	Pseudogén que actua como ARNde competencia endógena de su gen GBA, juega un papel importante en la regulación de la enzima glucocerebrosidasa.	Reportado a la alta en pacientes con NSCLC IV al compararlo con estadios tempranos (I, II y III).
↑SNRNP40	Componente del espliceosoma.	En cáncer de mama, una expresión baja de este gen, correlaciona con metástasis. (2016)

Discusión

Varios estudios han determinado el valor pronóstico de la nueva clasificación de subtipos histológicos de adenocarcinoma (ADC) propuesta por IASLC/ATS/ERS para pacientes con enfermedad temprana [128, 157-160]. En estadios avanzados de la enfermedad, los subtipos histológicos como lepidico (LEP) y acinar (ACN), exhiben asociaciones con mutaciones de EGFR, mientras que los tumores mucinosos se relacionan con mutaciones de KRAS. Los patrones histológicos de alto grado, como micropapilar (MIC) y sólido (SOL), presentan una elevada frecuencia de metástasis mediastinales en los nódulos linfáticos, baja recurrencia, y una sobrevida global disminuida. Por otra parte, el patrón histológico puede predecir el beneficio de quimioterapia y/o radioterapia coadyuvante. Adicionalmente, los tumores con patrones MIC y SOL pueden tener mejor respuesta a la quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) avanzado [129].

Muchos estudios han evaluado la relación entre los perfiles de expresión tumoral y los resultados clínicos. En este sentido, reportes recientes, han identificado una correlación entre algunos perfiles de expresión, el tiempo libre de progresión y la sobrevida global [161]. Adicionalmente, las firmas de expresión genética han sido capaces de correlacionar de manera molecular, adenocarcinomas (ADC's) pulmonares en estadios tempranos y tardíos que comparten características clínicas y pronósticas [162].

Estudios de expresión génica realizados en pacientes con CPCNP demostraron las diferencias de expresión entre los tipos histológicos de ADC y carcinoma de células escamosas que podrían tener un impacto pronóstico y pueden servir para identificar potenciales biomarcadores y oncogenes [144]. Además, existen otros reportes sobre firmas de expresión que distinguen entre los tipos histológicos ya mencionados [144-147]. Sin embargo, ningún estudio ha analizado la expresión génica entre los diferentes subtipos histológicos de ADC.

En nuestro estudio, analizamos diferentes subtipos histológicos de ADC pulmonar para tratar de identificar las diferencias moleculares que puedan explicar sus distintos comportamientos biológicos, así como sus implicaciones en el pronóstico del paciente.

En los resultados, pudimos observar una marcada diferencia de expresión génica en el patrón lepidico (LEP) al compararlo con otros 3 subtipos de patrones histológicos presentes: papilar (PAP), acinar (ACN) y sólido (SOL) (Figuras 8-10). El análisis funcional, mostró que 8 categorías biológicas importantes, se encontraban afectadas al comparar LEP con los otros subtipos: Replicación de ADN, recombinación y reparación, ciclo celular, supervivencia y muerte celular, modificaciones postranscripcionales del ARN, cáncer, anomalías y daño al organismo, así como desarrollo celular (Tabla 8). En concordancia con estos resultados, un estudio realizado por Girad, L. et al., en donde se generó una firma de expresión capaz de diferenciar entre adenocarcinoma (ADC) y carcinoma de células escamosas (CCE), encontró que había diferencia en la calificación del grado de diferenciación que obtenían los subtipos histológicos de ADC una vez que caían dentro del corte para calificar como ADC. En un subanálisis de este estudio, encontraron que el subtipo LEP presenta una calificación de diferenciación superior a la de los tumores con patrón SOL [132].

Adicionalmente, identificamos una firma de 13 genes con expresión diferencial en LEP al compararlo con todos los subtipos histológicos (Figuras 11 a-b). Esta firma incluye varios genes que correlacionan con el pronóstico de la enfermedad. La expresión de *APOE* en ADC pulmonar promueve la proliferación y migración celular, así que su sobre-expresión en los subtipos SOL, PAP y ACN, correlaciona con la pobre supervivencia que estos patrones presentan en comparación con el patrón LEP [163]. Otro gen sub expresado en LEP es *PPL*. La baja expresión de este, debido a hipermetilaciones de CpG, promueve un fenotipo metastásico en ADC escamoso, una característica que no es compatible con el desenlace clínico del patrón LEP [164]. Como *PPL*, el transcrito de *CHL* se encuentra sub-expresado en LEP. Su sobre-expresión se ha relacionado con progresión, propagación y metástasis en cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) [165, 166] (Tabla 9).

Por otro lado, *EPGN*, *VGLL3*, *UIMC1* y *LINC00472* están sobre expresados en el patrón LEP y se encuentran asociados a la supervivencia global y a un mejor pronóstico en los pacientes. *EPGN*, es un receptor de la familia de EGFR que ha sido asociado a una mayor supervivencia en pacientes con cáncer de mama [167]; *VGLL3* es un gen con potencial supresor, capaz de inhibir la progresión tumoral y se ha relacionado con la supervivencia

global en pacientes con cáncer de próstata [168, 169]. *UIMC1* ha sido observado trabajando en conjunto con *BRCA1* en la respuesta a reparación por daño [170]; también, cumple una función como guardián, al impedir la transición epitelial-mesenquimal relacionada con metástasis/malignidad y sus niveles de expresión correlacionan positivamente con las tasas de supervivencia en pacientes con adenocarcinoma (ADC) pulmonar y cáncer de mama [171]. Además, en un estudio clínico fase II, la expresión de *BRCA1* y *UIMC1* correlaciona con un efecto crucial de modulación, en un modelo de quimioterapia personalizada [172]. *LINC00472* pertenece a la familia de ARN largos no codificantes, en general estos presentan tamaños de alrededor de 200 nucleótidos con una nula o limitada capacidad para codificar proteínas y han sido implicados en una gran variedad de procesos biológicos, como la regulación transcripcional, el crecimiento celular y la tumorigénesis. En el caso del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), se ha observado que los ARN largos no codificantes y los micro ARN's como participantes en la progresión de la enfermedad. En el caso de *LINC00472*, Aimei et. al. reportó que su sobre-expresión, es capaz de inhibir la expresión de miR-149-3p y miR4270, activando la vía de p53 in vivo, dando como resultado la inhibición de la invasión, migración y la transición epitelial-mesenquimal en CPCNP. Esto coloca a *LINC00472* como un potencial blanco terapéutico contra el CPCNP [173].

En contraste, *CLSPN*, *BRD9* y *SNRP40* se encuentran sobre expresados en el patrón LEP, a pesar de que estas moléculas han sido correlacionadas con un pronóstico clínico malo. *CLSPN* es una proteína adaptativa del ciclo celular relacionada con Chk1 y su sobre expresión disminuye la respuesta a la radiación en modelos de xenotransplante en animales [174]. *BRD9* es parte de los componentes del interruptor/sacarosa no fermentable del complejo de remodelación de cromatina (SWI/SNF) y es importante en la estabilidad/corrección del ADN, actuando como un lector de la cromatina capaz de unirse a histonas acetiladas [175]. Su inhibición resulta en cambios de expresión génica relacionados con la regulación de la apoptosis y la regulación del desarrollo [176] y se ha observado que su sobre expresión, facilita la proliferación, migración, invasión así como, la transición epitelial-mesenquimal en células de hepatocarcinoma humano (Hep3B) [177]. Se ha reportado que *BRD9* se encuentra mutado de forma recurrente en tumores y ha sido propuesto como un posible blanco oncológico. Recientemente, Laetita et. al. reportó

el diseño de inhibidores potentes y específicos contra BRD9, lo cual representa una opción terapéutica interesante para el desarrollo de terapias específicas para tratar el CPCNP con patrón LEP [178, 179] (Tabla 9). *SNRP40* es un componente del complejo nuclear pequeño de ribonucleoproteína U5 (subunidad 40). En cáncer de mama, una expresión baja de este gen, correlaciona con metástasis. La variabilidad en la expresión génica asociada al complejo proteico de empalme alternativo (espliceosoma), puede ser un mecanismo por el cual, poblaciones clonales del tumor pueden aumentar la variabilidad de estados de expresión genética con el potencial de amplificar alteraciones en redes génicas que le permitan al tumor aumentar su capacidad de adecuación ante tratamientos, así como sus capacidades metastásicas [180].

Para los tratamientos blanco moleculares, los objetivos más importantes son el poder predecir o superar la resistencia adquirida, el desarrollo de inhibidores potentes para mutaciones raras y la determinación de las mejores secuencias de manejo tanto de las terapias existentes como de las que están por venir [9]. Más aún, los casos de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) sin un diagnóstico definitivo, o peor aún, mal clasificados, no recibirán la terapia óptima o pueden ser no elegibles para ensayos clínicos estratificados mediante su clasificación histológica. Mientras que el uso de pequeños paneles de inmunotinciones han sido de gran ayuda para evitar esto, entre un 5-10% de las biopsias pequeñas tomadas en los grandes centros médicos serán clasificados como CPCNP- sin patrón específico (CPCNP-NOS), esto equivale a alrededor de unos 22 mil casos solo en Estados Unidos, mientras que un porcentaje desconocido de casos será clasificado erróneamente [132]. Por ello, se piensa que el uso de la transcriptómica puede incrementar de forma sustancial el porcentaje de pacientes que pueden recibir un diagnóstico más certero o una terapia molecular blanco ya existente [142]. En la práctica clínica, los estudios de expresión ya han demostrado algunos casos de éxito clínico en pacientes con CPCNP y otros tipos de cáncer. Zhao et al. reportó que los pacientes con CPCNP con alta expresión de pJAK2, que fueron sometidos a cirugía, presentaron tasas pobres de supervivencia global al compararlos con aquellos con una baja expresión de pJAK2 y correlacionaron la alta expresión con una mayor densidad de los vasos sanguíneos tumorales [113]. Rodon, J., et al. trató a una paciente con un tumor refractario neuroendocrino gastrointestinal usando

transcriptómica pues su tumor no mostraba alteraciones genómicas conocidas o con blancos terapéuticos. El perfil de expresión de la paciente reveló una elevada expresión de *AKT2* y *AKT3*, esto permitió que fuera tratada de forma satisfactoria con everolimus, un inhibidor de mTOR (Diana de rapamicina). Resultando en enfermedad estable por 3 años (último seguimiento). Esta respuesta es de sumo interés ya que la terapia efectiva fue basada en resultados transcriptómicos y porque los inhibidores de mTOR usados como agentes únicos (en lugar de combinados con otros fármacos) son raramente efectivos a pesar de ser usados contra alteraciones del ADN para los que han sido diseñados, presumiblemente por que estas se presentan en combinación con otras alteraciones genómicas [138, 181-183].

Mientras que algunos patólogos cuestionan la necesidad de una clasificación molecular del CPCNP, el gran número de casos no clasificados y la falta de reproducibilidad diagnóstica entre los mismos patólogos apuntan hacia la necesidad de pruebas de clasificación no subjetivas. Esto, inclusive puede convertirse en una necesidad en instituciones de países en donde las inmunotinciones no son usadas rutinariamente y donde los patólogos pueden aplicar de una forma altamente variable, su criterio diagnóstico. Un uso especialmente relevante de una clasificación molecular, además de la identificación de pacientes candidatos a terapias blanco, el diagnóstico clínico y el pronóstico clínico, es la selección de pacientes en ensayos clínicos multinacionales [132].

Conclusión

En este estudio, pudimos observar una expresión génica diferencial entre los subtipos histológicos papilar (PAP), sólido (SOL) y acinar (ACN) al compararlos contra lepidico (LEP). Estas diferencias en la expresión génica pueden explicar en parte, la gran diversidad observada en el pronóstico clínico de los subtipos histológicos de ADC y pueden ayudar a guiar las decisiones clínicas. Solo mejorando nuestro entendimiento molecular, los pacientes diagnosticados con algún subtipo de adenocarcinoma (ADC), podrán verse aún más beneficiados con el creciente número de tratamientos blanco en desarrollo para atender el cáncer de pulmón (CP). Los datos de este estudio sugieren que el ADC podría ser estratificado en distintos grupos mediante perfiles de expresión [184].

En este estudio, identificamos una firma de expresión de 13 genes con un comportamiento único para el patrón histológico LEP que podría usarse, no sólo para identificarlo, también abre la puerta de nuevos blancos terapéuticos para este subtipo, como es el caso de los inhibidores de BRD9 [178, 179]. Nuestras observaciones también demuestran la importancia de la nueva clasificación histológica, sin embargo, en la era de la medicina personalizada, la clasificación histológica propuesta por la OMS tiene aún un largo camino para ser perfeccionada. Estudios adicionales enfocados en la clasificación propuesta por IASLC/ATS/ERS son necesarios para definir firmas genéticas específicas relacionadas con cada subtipo histológico de adenocarcinoma (ADC) [185]. En un futuro cercano, la clasificación necesitará ser revisada nuevamente para permitirle reflejar de forma confiable y con significancia clínica el diagnóstico tumoral, para que este se base en el conocimiento que se genera a diario sobre las características moleculares del cáncer de pulmón [8].

Perspectivas del trabajo

Un mejor entendimiento de las bases moleculares de los diferentes subtipos de adenocarcinoma y de sus características clínicas, nos puede guiar de manera racional en el desarrollo de estrategias de tratamiento. Los datos obtenidos en este estudio, entre ellos la firma de expresión de 13 genes con un comportamiento único para el patrón histológico lepidico (LEP), arrojan nueva luz detrás de las diferencias clínicas, mutacionales, pronósticas y de respuesta a tratamiento de cada subtipo de ADC. Sin embargo, el reto más importante antes de que un biomarcador o una firma de expresión puedan ser usados de forma rutinaria en la práctica clínica, es la necesidad de una validación de su utilidad clínica [186, 187]. En este caso, el estudio además de carecer de una validación para la firma de expresión observada, no pudo comparar la expresión génica de los cuatro subtipos histológicos de ADC (acinar (ACN), papilar (PAP), sólido (SOL) y LEP) contra el subtipo histológico micropapilar (MIP) pues, no pudimos contar con ninguna biopsia de este ya que su incidencia es muy baja. Ambas carencias, podrían ser atendidas mediante un estudio clínico prospectivo o mediante una combinación de estudio prospectivo-retrospectivo más amplios para poder incluir un mayor número de casos, sobre todo de los subtipos histológicos menos comunes (MIP, PAP y LEP).

Adicionalmente, el camino que debe recorrer una “firma de expresión” es aún mayor que el de una molécula única, esto debido a la exacerbación de las dificultades típicas relacionadas con el desarrollo de biomarcadores utilizando tecnologías “ómicas” [186]. Habiendo señalado las carencias del estudio, es importante mencionar que los datos transcriptómicos obtenidos en él, no solo han resultado en línea a otro estudio ya publicado [132]; también pueden ayudar a direccionar estudios en una amplia gama de aplicaciones que incluyen las áreas de marcadores de diagnóstico, pronóstico y estratificación de pacientes así como, las de blancos terapéuticos y mecanismos de resistencia [187].

Referencias:

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(1): p. 7-30.
3. Zheng, M., *Classification and Pathology of Lung Cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2016. **25**(3): p. 447-68.
4. Herbst, R.S., J.V. Heymach, and S.M. Lippman, *Lung cancer*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1367-80.
5. 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, 2011. **6**(2): p. 244-85.
6. 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, 2015. **10**(9): p. 1243-60.
7. Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson, A. G., *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.*, ed. WHO. 2015, 1211 Geneva 27, Switzerland: WHO Press.
8. Inamura, K., *Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 193.
9. Yang, C.Y., J.C. Yang, and P.C. Yang, *Precision Management of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer*. Annu Rev Med, 2020. **71**: p. 117-136.
10. Monteagudo Canto, A., R.E. Romero Sánchez, and C.E. Salazar Cueto, *Cáncer de pulmón, propuesta ética para agilizar su diagnóstico %J Humanidades Médicas*. 2007. **7**: p. 0-0.
11. Myrdal, G., et al., *Effect of delays on prognosis in patients with non-small cell lung cancer*. Thorax, 2004. **59**(1): p. 45-9.
12. Gould, M.K., et al., *Accuracy of positron emission tomography for diagnosis of pulmonary nodules and mass lesions: a meta-analysis*. JAMA, 2001. **285**(7): p. 914-24.
13. Detterbeck, F.C., et al., *Seeking a home for a PET, part 1: Defining the appropriate place for positron emission tomography imaging in the diagnosis of pulmonary nodules or masses*. Chest, 2004. **125**(6): p. 2294-9.
14. Spiro, S.G., et al., *Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 149S-160S.
15. Schwartz, A.M., D.E. Henson, and P. American College of Chest, *Diagnostic surgical pathology in lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition)*. Chest, 2007. **132**(3 Suppl): p. 78S-93S.
16. Travis, W.D., E. Brambilla, and G.J. Riely, *New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 992-1001.
17. Mukhopadhyay, S. and A.L. Katzenstein, *Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6*. Am J Surg Pathol, 2011. **35**(1): p. 15-25.

18. Travis, W.D., et al., *Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification*. Arch Pathol Lab Med, 2013. **137**(5): p. 685-705.
19. Jones, K.D., et al., *Data set for reporting of lung carcinomas: recommendations from International Collaboration on Cancer Reporting*. Arch Pathol Lab Med, 2013. **137**(8): p. 1054-62.
20. Gellert, A.R., et al., *Fibreoptic bronchoscopy: effect of multiple bronchial biopsies on diagnostic yield in bronchial carcinoma*. Thorax, 1982. **37**(9): p. 684-7.
21. Travis, W.D. and I.S. Committee, *Reporting lung cancer pathology specimens. Impact of the anticipated 7th Edition TNM classification based on recommendations of the IASLC Staging Committee*. Histopathology, 2009. **54**(1): p. 3-11.
22. Mason, K.A., et al., *Biology-based combined-modality radiotherapy: workshop report*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **50**(4): p. 1079-89.
23. van Tilburg, P.M., et al., *Pre-operative pulmonary evaluation of lung cancer patients: a review of the literature*. Eur Respir J, 2009. **33**(5): p. 1206-15.
24. Khazaie, K., V. Schirmacher, and R.B. Lichtner, *EGF receptor in neoplasia and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1993. **12**(3-4): p. 255-74.
25. Loo, P.S., et al., *Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens*. J Thorac Oncol, 2010. **5**(4): p. 442-7.
26. Shah, P.L., et al., *The role of transbronchial fine needle aspiration in an integrated care pathway for the assessment of patients with suspected lung cancer*. J Thorac Oncol, 2006. **1**(4): p. 324-7.
27. Gazdar, A.F., *Should we continue to use the term non-small-cell lung cancer?* Ann Oncol, 2010. **21 Suppl 7**: p. vii225-9.
28. Ettinger, D.S., et al., *Non-Small Cell Lung Cancer, Version 6.2015*. J Natl Compr Canc Netw, 2015. **13**(5): p. 515-24.
29. Li, C. and H. Lu, *Adenosquamous carcinoma of the lung*. Onco Targets Ther, 2018. **11**: p. 4829-4835.
30. Jones, K.D., *Whence lepidic?: the history of a Canadian neologism*. Arch Pathol Lab Med, 2013. **137**(12): p. 1822-4.
31. Tsao, M.S., et al., *Subtype Classification of Lung Adenocarcinoma Predicts Benefit From Adjuvant Chemotherapy in Patients Undergoing Complete Resection*. J Clin Oncol, 2015.
32. Kadota, K., et al., *The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype*. Mod Pathol, 2014. **27**(5): p. 690-700.
33. Nonaka, D., *A study of DeltaNp63 expression in lung non-small cell carcinomas*. Am J Surg Pathol, 2012. **36**(6): p. 895-9.
34. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
35. Kris, M.G., et al., *Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs*. JAMA, 2014. **311**(19): p. 1998-2006.
36. Sequist, L.V., et al., *Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice*. Ann Oncol, 2011. **22**(12): p. 2616-24.
37. Timar, J., *The clinical relevance of KRAS gene mutation in non-small-cell lung cancer*. Curr Opin Oncol, 2014. **26**(2): p. 138-44.

38. Arrieta, O., et al., *Updated Frequency of EGFR and KRAS Mutations in NonSmall-Cell Lung Cancer in Latin America: The Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLICaP)*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(5): p. 838-43.
39. Rangachari, D., et al., *Brain metastases in patients with EGFR-mutated or ALK-rearranged non-small-cell lung cancers*. Lung Cancer, 2015. **88**(1): p. 108-11.
40. Wistuba, II, L. Mao, and A.F. Gazdar, *Smoking molecular damage in bronchial epithelium*. Oncogene, 2002. **21**(48): p. 7298-306.
41. Wells, A., *EGF receptor*. Int J Biochem Cell Biol, 1999. **31**(6): p. 637-43.
42. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 127-37.
43. De Luca, A., et al., *The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment*. J Cell Physiol, 2008. **214**(3): p. 559-67.
44. Mosesson, Y. and Y. Yarden, *Oncogenic growth factor receptors: implications for signal transduction therapy*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(4): p. 262-70.
45. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1160-74.
46. Sakurada, A., F.A. Shepherd, and M.S. Tsao, *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: impact of primary or secondary mutations*. Clin Lung Cancer, 2006. **7 Suppl 4**: p. S138-44.
47. da Cunha Santos, G., F.A. Shepherd, and M.S. Tsao, *EGFR mutations and lung cancer*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 49-69.
48. Eberhard, D.A., et al., *Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 5900-9.
49. Riely, G.J., et al., *Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(24): p. 7232-41.
50. Sasaki, H., et al., *EGFR and erbB2 mutation status in Japanese lung cancer patients*. Int J Cancer, 2006. **118**(1): p. 180-4.
51. Chou, T.Y., et al., *Mutation in the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor is a predictive and prognostic factor for gefitinib treatment in patients with non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(10): p. 3750-7.
52. Liu, H.L., et al., *Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer patients harboring different types of EGFR mutations: A retrospective analysis*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2017. **37**(6): p. 864-872.
53. Mok, T.S., et al., *Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(10): p. 947-57.
54. Rosell, R., et al., *Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012. **13**(3): p. 239-46.
55. Sequist, L.V., et al., *Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors*. Sci Transl Med, 2011. **3**(75): p. 75ra26.
56. 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, 2013. **19**(8): p. 2240-7.

57. Kobayashi, S., et al., *EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib*. N Engl J Med, 2005. **352**(8): p. 786-92.
58. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
59. Janne, P.A., et al., *AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2015. **372**(18): p. 1689-99.
60. Hasanovic, A., et al., *Advances in fine needle aspiration cytology for the diagnosis of pulmonary carcinoma*. Patholog Res Int, 2011. **2011**: p. 897292.
61. Yang, J.C., et al., *Symptom control and quality of life in LUX-Lung 3: a phase III study of afatinib or cisplatin/pemetrexed in patients with advanced lung adenocarcinoma with EGFR mutations*. J Clin Oncol, 2013. **31**(27): p. 3342-50.
62. Riely, G.J., J. Marks, and W. Pao, *KRAS mutations in non-small cell lung cancer*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(2): p. 201-5.
63. Horn, L. and W. Pao, *EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4232-5.
64. Bos, J.L., *ras oncogenes in human cancer: a review*. Cancer Res, 1989. **49**(17): p. 4682-9.
65. Forbes, S., et al., *Cosmic 2005*. Br J Cancer, 2006. **94**(2): p. 318-22.
66. Soda, M., et al., *Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer*. Nature, 2007. **448**(7153): p. 561-6.
67. Guan, J.L., et al., *KRAS mutation in patients with lung cancer: a predictor for poor prognosis but not for EGFR-TKIs or chemotherapy*. Ann Surg Oncol, 2013. **20**(4): p. 1381-8.
68. Campos-Parra, A.D., et al., *KRAS mutation as the biomarker of response to chemotherapy and EGFR-TKIs in patients with advanced non-small cell lung cancer: clues for its potential use in second-line therapy decision making*. Am J Clin Oncol, 2015. **38**(1): p. 33-40.
69. Iwahara, T., et al., *Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system*. Oncogene, 1997. **14**(4): p. 439-49.
70. Morris, S.W., et al., *ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)*. Oncogene, 1997. **14**(18): p. 2175-88.
71. Morris, S.W., et al., *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma*. Science, 1994. **263**(5151): p. 1281-4.
72. Mano, H., *Non-solid oncogenes in solid tumors: EML4-ALK fusion genes in lung cancer*. Cancer Sci, 2008. **99**(12): p. 2349-55.
73. Webb, T.R., et al., *Anaplastic lymphoma kinase: role in cancer pathogenesis and small-molecule inhibitor development for therapy*. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. **9**(3): p. 331-56.
74. Rikova, K., et al., *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1190-203.
75. Takeuchi, K., et al., *KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 3143-9.
76. 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, 2010. **16**(22): p. 5581-90.

77. Shaw, A.T., et al., *Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK*. J Clin Oncol, 2009. **27**(26): p. 4247-53.
78. Camidge, D.R., et al., *Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in non-small cell lung cancer are associated with prolonged progression-free survival on pemetrexed*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(4): p. 774-80.
79. Lee, J.O., et al., *Anaplastic lymphoma kinase translocation: a predictive biomarker of pemetrexed in patients with non-small cell lung cancer*. J Thorac Oncol, 2011. **6**(9): p. 1474-80.
80. Kwak, E.L., et al., *Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2010. **363**(18): p. 1693-703.
81. Shaw, A.T., et al., *Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer*. N Engl J Med, 2013. **368**(25): p. 2385-94.
82. Katayama, R., et al., *Mechanisms of acquired crizotinib resistance in ALK-rearranged lung Cancers*. Sci Transl Med, 2012. **4**(120): p. 120ra17.
83. Shaw, A.T., et al., *Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2014. **370**(13): p. 1189-97.
84. Shaw, A.T. and J.A. Engelman, *ALK in lung cancer: past, present, and future*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 1105-11.
85. Mino-Kenudson, M., et al., *A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(5): p. 1561-71.
86. Marsilje, T.H., et al., *Synthesis, structure-activity relationships, and in vivo efficacy of the novel potent and selective anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor 5-chloro-N²-(2-isopropoxy-5-methyl-4-(piperidin-4-yl)phenyl)-N⁴-(2-(isopropylsulfonyl)phenyl)pyrimidine-2,4-diamine (LDK378) currently in phase 1 and phase 2 clinical trials*. J Med Chem, 2013. **56**(14): p. 5675-90.
87. Li N, M.P., Kim S, et al., *Activity of a potent and selective phase I ALK inhibitor LDK378 in naive and crizotinib-resistant preclinical tumor models*. AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 2011: p. 12-16.
88. Shaw, A.T., et al., *Ceritinib versus chemotherapy in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer previously given chemotherapy and crizotinib (ASCEND-5): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2017. **18**(7): p. 874-886.
89. Kim, D.W., et al., *Brigatinib in Patients With Crizotinib-Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase II Trial*. J Clin Oncol, 2017. **35**(22): p. 2490-2498.
90. Novello, S., et al., *Alectinib versus chemotherapy in crizotinib-pretreated anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive non-small-cell lung cancer: results from the phase III ALUR study*. Ann Oncol, 2018. **29**(6): p. 1409-1416.
91. Toyokawa, G. and T. Seto, *Updated Evidence on the Mechanisms of Resistance to ALK Inhibitors and Strategies to Overcome Such Resistance: Clinical and Preclinical Data*. Oncol Res Treat, 2015. **38**(6): p. 291-8.
92. Lin, J.J., et al., *Impact of EML4-ALK Variant on Resistance Mechanisms and Clinical Outcomes in ALK-Positive Lung Cancer*. J Clin Oncol, 2018. **36**(12): p. 1199-1206.
93. Davies, K.D., et al., *Identifying and targeting ROS1 gene fusions in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(17): p. 4570-9.

94. Awad, M.M., et al., *Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1*. N Engl J Med, 2013. **368**(25): p. 2395-401.
95. Vaishnavi, A., et al., *EGFR Mediates Responses to Small-Molecule Drugs Targeting Oncogenic Fusion Kinases*. Cancer Res, 2017. **77**(13): p. 3551-3563.
96. Yu, H. and R. Jove, *The STATs of cancer--new molecular targets come of age*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 97-105.
97. Mukohara, T., et al., *Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and downstream-activated peptides in surgically excised non-small-cell lung cancer (NSCLC)*. Lung Cancer, 2003. **41**(2): p. 123-30.
98. Gao, S.P., et al., *Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3846-56.
99. Chen, K.F., et al., *Sorafenib overcomes TRAIL resistance of hepatocellular carcinoma cells through the inhibition of STAT3*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(21): p. 5189-99.
100. Gilbert, L.A. and M.T. Hemann, *DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche*. Cell, 2010. **143**(3): p. 355-66.
101. Yao, Z., et al., *TGF-beta IL-6 axis mediates selective and adaptive mechanisms of resistance to molecular targeted therapy in lung cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(35): p. 15535-40.
102. Bromberg, J., *Stat proteins and oncogenesis*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1139-42.
103. Aggarwal, B.B., et al., *Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?* Ann N Y Acad Sci, 2009. **1171**: p. 59-76.
104. Johnston, J.A., et al., *Phosphorylation and activation of the Jak-3 Janus kinase in response to interleukin-2*. Nature, 1994. **370**(6485): p. 151-3.
105. Looyenga, B.D., et al., *STAT3 is activated by JAK2 independent of key oncogenic driver mutations in non-small cell lung carcinoma*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30820.
106. Hedvat, M., et al., *The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors*. Cancer Cell, 2009. **16**(6): p. 487-97.
107. Harada, D., N. Takigawa, and K. Kiura, *The Role of STAT3 in Non-Small Cell Lung Cancer*. Cancers (Basel), 2014. **6**(2): p. 708-22.
108. Yeh, H.H., et al., *Autocrine IL-6-induced Stat3 activation contributes to the pathogenesis of lung adenocarcinoma and malignant pleural effusion*. Oncogene, 2006. **25**(31): p. 4300-9.
109. Ishihara, K. and T. Hirano, *Molecular basis of the cell specificity of cytokine action*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 281-96.
110. Kishimoto, T., *Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 1-21.
111. Scheller, J., N. Ohnesorge, and S. Rose-John, *Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer*. Scand J Immunol, 2006. **63**(5): p. 321-9.
112. Wu, K., et al., *Gefitinib resistance resulted from STAT3-mediated Akt activation in lung cancer cells*. Oncotarget, 2013. **4**(12): p. 2430-8.
113. Zhao, M., et al., *JAK2/STAT3 signaling pathway activation mediates tumor angiogenesis by upregulation of VEGF and bFGF in non-small-cell lung cancer*. Lung Cancer, 2011. **73**(3): p. 366-74.
114. Tissot, C., et al., *Clinical characteristics and outcome of patients with lung cancer harboring BRAF mutations*. Lung Cancer, 2016. **91**: p. 23-8.

115. Planchard, D., et al., *Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(10): p. 1307-1316.
116. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(4): p. 252-64.
117. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
118. Borghaei, H., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(17): p. 1627-39.
119. Brahmer, J., et al., *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(2): p. 123-35.
120. 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*, 2016. **387**(10027): p. 1540-1550.
121. 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*, 2017. **389**(10066): p. 255-265.
122. Mok, T.S.K., et al., *Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial*. *Lancet*, 2019. **393**(10183): p. 1819-1830.
123. Peters, S., et al., *Abstract CT082: Impact of tumor mutation burden on the efficacy of first-line nivolumab in stage iv or recurrent non-small cell lung cancer: An exploratory analysis of CheckMate 026*. 2017. **77**(13 Supplement): p. CT082-CT082.
124. Gazdar, A.F. and J.D. Minna, *Precision medicine for cancer patients: lessons learned and the path forward*. *J Natl Cancer Inst*, 2013. **105**(17): p. 1262-3.
125. Cancer Genome Atlas Research, N., *Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma*. *Nature*, 2014. **511**(7511): p. 543-50.
126. Yoshizawa, A., et al., *Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases*. *Mod Pathol*, 2011. **24**(5): p. 653-64.
127. Russell, P.A., et al., *Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification*. *J Thorac Oncol*, 2011. **6**(9): p. 1496-504.
128. Warth, A., et al., *The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival*. *J Clin Oncol*, 2012. **30**(13): p. 1438-46.
129. Campos-Parra, A.D., et al., *Relevance of the novel IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in advanced disease*. *Eur Respir J*, 2014. **43**(5): p. 1439-47.
130. Matsuo, N., et al., *Association of EGFR Exon 19 Deletion and EGFR-TKI Treatment Duration with Frequency of T790M Mutation in EGFR-Mutant Lung Cancer Patients*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 36458.
131. Charkiewicz, R., et al., *New monoallelic combination of KRAS gene mutations in codons 12 and 13 in the lung adenocarcinoma*. *Adv Med Sci*, 2013. **58**(1): p. 83-9.

132. Girard, L., et al., *An Expression Signature as an Aid to the Histologic Classification of Non-Small Cell Lung Cancer*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(19): p. 4880-4889.
133. Cagle, P.T., et al., *Revolution in lung cancer: new challenges for the surgical pathologist*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(1): p. 110-6.
134. Thunnissen, E., et al., *Reproducibility of histopathological diagnosis in poorly differentiated NSCLC: an international multiobserver study*. J Thorac Oncol, 2014. **9**(9): p. 1354-62.
135. Sinna, E.A., N. Ezzat, and G.M. Sherif, *Role of thyroid transcription factor-1 and P63 immunocytochemistry in cytologic typing of non-small cell lung carcinomas*. J Egypt Natl Canc Inst, 2013. **25**(4): p. 209-18.
136. Charkiewicz, R., et al., *Gene Expression Signature Differentiates Histology But Not Progression Status of Early-Stage NSCLC*. Transl Oncol, 2017. **10**(3): p. 450-458.
137. Manegold, C., *Treatment algorithm in 2014 for advanced non-small cell lung cancer: therapy selection by tumour histology and molecular biology*. Adv Med Sci, 2014. **59**(2): p. 308-13.
138. Schwaederle, M., et al., *Association of Biomarker-Based Treatment Strategies With Response Rates and Progression-Free Survival in Refractory Malignant Neoplasms: A Meta-analysis*. JAMA Oncol, 2016. **2**(11): p. 1452-1459.
139. Jardim, D.L., et al., *Impact of a Biomarker-Based Strategy on Oncology Drug Development: A Meta-analysis of Clinical Trials Leading to FDA Approval*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(11).
140. Schwaederle, M., et al., *Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials*. J Clin Oncol, 2015. **33**(32): p. 3817-25.
141. Greenhalgh, J., et al., *First-line treatment of advanced epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation positive non-squamous non-small cell lung cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2016(5): p. CD010383.
142. Rodon, J., et al., *Genomic and transcriptomic profiling expands precision cancer medicine: the WINTHER trial*. Nat Med, 2019. **25**(5): p. 751-758.
143. Pikor, L.A., et al., *Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications*. Lung Cancer, 2013. **82**(2): p. 179-89.
144. Skrzypski, M., et al., *Main histologic types of non-small-cell lung cancer differ in expression of prognosis-related genes*. Clin Lung Cancer, 2013. **14**(6): p. 666-673 e2.
145. Lazar, V., et al., *Integrated molecular portrait of non-small cell lung cancers*. BMC Med Genomics, 2013. **6**: p. 53.
146. Watanabe, T., et al., *Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR*. Cancer Cell Int, 2010. **10**: p. 2.
147. Girard, L., et al., *An Expression Signature as an Aid to the Histologic Classification of Non-Small Cell Lung Cancer*. Clin Cancer Res, 2016.
148. Affymetrix. *Technical Note GeneChip® Gene 1.0 ST Array Design*. 2007 [cited 2021 February, 24th]; Technical Note]. Available from: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fbrochures%2Fgene_1_0_st_technote.pdf&title=VGVjaG5pY2FsIE5vdGVzOiBHZW5lQ2hpcCZyZWc7IEdlbmUgMS4wIFNUIEFycmF5IERlc2lnbg==.
149. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.

150. Gentleman, R.C., et al., *Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics*. Genome Biol, 2004. **5**(10): p. R80.
151. Team, R.C. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, R Foundation for Statistical Computing. 2013 [cited 2013; Available from: <https://www.r-project.org/>].
152. GK, S., *limma: Linear Models for Microarray Data*. . Bioinforma. Comput. Biol. Solut. Using R Bioconductor ed. C.V. Gentleman R, Huber W, Irizarry RA, Dudoit S. 2005, New York: Springer.
153. Benjamini Y, H.Y., *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing*. J R Stat Soc Ser B Methodol, 1995. **57**: p. 289-300.
154. Warnes GR, B.B., Bonebakke L, Gentleman R. *gplots: Various R Programming Tools for Plotting Data*. 2015; Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>.
155. Kramer, A., et al., *Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis*. Bioinformatics, 2014. **30**(4): p. 523-30.
156. Ortega-Gomez, A., et al., *Gene-expression profiles in lung adenocarcinomas related to chronic wood smoke or tobacco exposure*. Respir Res, 2016. **17**(1): p. 42.
157. Zhang, J., et al., *Why do pathological stage IA lung adenocarcinomas vary from prognosis?: a clinicopathologic study of 176 patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma based on the IASLC/ATS/ERS classification*. J Thorac Oncol, 2013. **8**(9): p. 1196-202.
158. Ujiie, H., et al., *Solid Predominant Histologic Subtype in Resected Stage I Lung Adenocarcinoma Is an Independent Predictor of Early, Extrathoracic, Multisite Recurrence and of Poor Postrecurrence Survival*. J Clin Oncol, 2015. **33**(26): p. 2877-84.
159. Murakami, S., et al., *Prognostic value of the new IASLC/ATS/ERS classification of clinical stage IA lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2015. **90**(2): p. 199-204.
160. Hung, J.J., et al., *Predictive value of the international association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of lung adenocarcinoma in tumor recurrence and patient survival*. J Clin Oncol, 2014. **32**(22): p. 2357-64.
161. Chen, H.Y., et al., *A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(1): p. 11-20.
162. Dama, E., et al., *An aggressive subtype of stage I lung adenocarcinoma with molecular and prognostic characteristics typical of advanced lung cancers*. Clin Cancer Res, 2016.
163. Su, W.P., et al., *Apolipoprotein E expression promotes lung adenocarcinoma proliferation and migration and as a potential survival marker in lung cancer*. Lung Cancer, 2011. **71**(1): p. 28-33.
164. Otsubo, T., et al., *Aberrant DNA hypermethylation reduces the expression of the desmosome-related molecule periplakin in esophageal squamous cell carcinoma*. Cancer Med, 2015. **4**(3): p. 415-25.
165. Senchenko, V.N., et al., *Differential expression of CHL1 gene during development of major human cancers*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e15612.
166. He, L.H., et al., *CHL1 is involved in human breast tumorigenesis and progression*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **438**(2): p. 433-8.
167. McIntyre, E., et al., *The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are co-ordinately expressed in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2010. **122**(1): p. 105-10.

168. Li, C., et al., *Gene expression biomarkers to predict overall survival of prostate cancer patients*. J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 2012. **30**(15_suppl): p. 4561-.
169. Gambaro, K., et al., *VGLL3 expression is associated with a tumor suppressor phenotype in epithelial ovarian cancer*. Mol Oncol, 2013. **7**(3): p. 513-30.
170. Yan, J., et al., *Ubiquitin-interaction motifs of RAP80 are critical in its regulation of estrogen receptor alpha*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(5): p. 1673-86.
171. Park, S.Y., et al., *RAP80 regulates epithelial-mesenchymal transition related with metastasis and malignancy of cancer*. Cancer Sci, 2016. **107**(3): p. 267-73.
172. Rosell, R., et al., *Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5133.
173. Zou, A., et al., *LINC00472 Acts as a Tumor Suppressor in NSCLC through KLLN-Mediated p53-Signaling Pathway via MicroRNA-149-3p and MicroRNA-4270*. Mol Ther Nucleic Acids, 2019. **17**: p. 563-577.
174. Choi, S.H., et al., *TopBP1 and Claspin contribute to the radioresistance of lung cancer brain metastases*. Mol Cancer, 2014. **13**: p. 211.
175. Flynn, E.M., et al., *A Subset of Human Bromodomains Recognizes Butyryllysine and Crotonyllysine Histone Peptide Modifications*. Structure, 2015. **23**(10): p. 1801-1814.
176. Wang, X., et al., *BRD9 defines a SWI/SNF sub-complex and constitutes a specific vulnerability in malignant rhabdoid tumors*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1881.
177. Dou, C., et al., *Bromodomain-containing protein 9 promotes the growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by activating the TUFT1/AKT pathway*. Cell Death Dis, 2020. **11**(9): p. 730.
178. Hay, D.A., et al., *Design and synthesis of potent and selective inhibitors of BRD7 and BRD9 bromodomains*. MedChemComm, 2015. **6**(7): p. 1381-1386.
179. Huang, H.T., et al., *Loss of function of SWI/SNF chromatin remodeling genes leads to genome instability of human lung cancer*. Oncol Rep, 2015. **33**(1): p. 283-91.
180. Nguyen, A., et al., *Highly variable cancer subpopulations that exhibit enhanced transcriptome variability and metastatic fitness*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11246.
181. Tsimberidou, A.M., et al., *Initiative for Molecular Profiling and Advanced Cancer Therapy (IMPACT): An MD Anderson Precision Medicine Study*. JCO Precis Oncol, 2017. **2017**.
182. Janku, F., et al., *Assessing PIK3CA and PTEN in early-phase trials with PI3K/AKT/mTOR inhibitors*. Cell Rep, 2014. **6**(2): p. 377-87.
183. Rodon, J., et al., *Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials*. Nat Rev Clin Oncol, 2013. **10**(3): p. 143-53.
184. Karlsson, A., et al., *Gene Expression Profiling of Large Cell Lung Cancer Links Transcriptional Phenotypes to the New Histological WHO 2015 Classification*. J Thorac Oncol, 2017. **12**(8): p. 1257-1267.
185. Molina-Romero, C., et al., *Differential gene expression profiles according to the Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society histopathological classification in lung adenocarcinoma subtypes*. Hum Pathol, 2017. **66**: p. 188-199.
186. Vargas, A.J. and C.C. Harris, *Biomarker development in the precision medicine era: lung cancer as a case study*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(8): p. 525-37.
187. Molina-Romero, C., E. Vergara, and O. Arrieta, *A novel biomarker protein panel for lung cancer, a promising first step*. Transl Lung Cancer Res, 2018. **7**(Suppl 4): p. S304-S307.



Original contribution

Differential gene expression profiles according to the Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society histopathological classification in lung adenocarcinoma subtypes[☆]



Camilo Molina-Romero BSc^a, Claudia Rangel-Escareño PhD^b,
Alette Ortega-Gómez PhD^a, Gerardo J. Alanís-Funes PhD^c, Alejandro Avilés-Salas MD^d,
Federico Avila-Moreno PhD^e, Gabriela E. Mercado PhD^f, Andrés F. Cardona MD, PhD^g,
Alfredo Hidalgo-Miranda PhD^h, Oscar Arrieta MD, MSc^{a,*}

^aThoracic Oncology Unit and Laboratory of Personalized Medicine, Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Mexico City, 14080, Mexico

^bComputational Genomics Lab, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City, 14610 Mexico

^cComputational Sciences, Tecnológico de Monterrey, Ciudad de México, 14380 Mexico

^dDepartment of Pathology, INCan, Mexico City, 14080 Mexico

^eLung Diseases and Cancer Epigenomics Laboratory 12, Biomedicine Research Unit (UBIMED), FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, State of Mexico, 54090 Mexico

^fLaboratory of Clinical Genomics, Faculty of Odontology, UNAM, Mexico City, 04510 Mexico

^gClinical and Translational Oncology Group, Institute of Oncology, Clínica del Country, Bogotá, 111071 Colombia

^hLaboratorio de Genómica del Cáncer, INMEGEN, Mexico City, 14610 Mexico

Received 17 March 2017; revised 26 May 2017; accepted 1 June 2017

Keywords:

Lepidic;
Papillary;
Acinar;
Solid;
Microarrays;
Gene expression

Summary The current lung cancer classification from the Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society has considerably changed the pathologic diagnosis of lung invasive adenocarcinoma, identifying disease subtypes with substantial implications for medical practice, such as clinical, radiological, molecular, and prognostic differences. We analyzed the differences in the genetic expression of adenocarcinoma subtypes according to the new classification. Microarray gene expression analysis was performed on a cohort of 29 adenocarcinoma patients treated at the Instituto Nacional de Cancerología of Mexico from 2008 to 2011. All patients had an available biopsy sample and were classified into 4 different subtypes of adenocarcinoma (2015 World Health Organization classification). Lepidic-predominant adenocarcinoma was the only pattern that exhibited a marked gene expression difference compared with other predominant histologic patterns, revealing genes with significant expression ($P < .01$). Moreover, we identified 13 genes with specific differential expression in the lepidic-predominant

[☆] Disclosures: none.

* Corresponding author.

E-mail address: ogar@servidor.unam.mx (O. Arrieta).

adenocarcinoma that could be used as a gene signature. The lepidic-predominant histologic pattern has a differential gene expression profile compared with all predominant histologic patterns. Additionally, we identified a gene expression signature of 13 genes that have a unique behavior in the lepidic histologic pattern; these 13 genes are candidates for follow-up studies for their potential use as biomarkers or therapeutic targets. Results from this study highlight the importance of the new Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification and exemplify the potential clinical implications of correlating histopathology with exclusive molecular beacons.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Lung cancer is the most common cause of cancer-related deaths worldwide. The mortality rate is approximately 27 per 10⁵ persons globally, and most of them present with metastatic disease at diagnosis [1]. Despite important efforts, innovations, and progress in diagnosis and treatment, 5-year overall survival is a mere 15% [2].

Tumor molecular heterogeneity is one of the main reasons why non-small cell lung cancer (NSCLC) patients exhibit different clinical outcomes and nonpredictable responses to treatment [3]. Different genetic mutation status and/or molecular genetic expression profiles can be partially explained due to differences in ethnicities. For example, in Latin America, the prevalence of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) and Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) mutations in NSCLC is 26% and 14%, respectively, representing an intermediate incidence among Asian and white populations. Furthermore, molecular heterogeneity could also be attributed to different lung cancer-associated risk factors [4].

Approximately 85% of lung cancer patients are diagnosed with NSCLC, and adenocarcinoma histology is the most frequent type. To provide an integrated clinical, radiological, molecular, and histologic approach for a better diagnosis and treatment scheme, in 2011, an international multidisciplinary classification was developed as a collaborative effort between the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) [5]. The new classification includes various subtypes of lung adenocarcinoma to help define categories that have distinct clinical, radiologic, genetic mutation, gene molecular expression, and pathological characteristics. In general, lung cancer cases are diagnosed and staged by small biopsies or cytology rather than surgical resection specimens, and for the first time, this recent classification addresses an approach to take these factors into account for clinicopathological diagnoses [5].

According to the fourth edition of the World Health Organization classification published in 2015, between 80% and 90% of lung adenocarcinomas present heterogeneous histologic patterns and are classified as mixed types [6]. In this classification, lung adenocarcinoma subtypes are classified based on the predominant histologic pattern as follows: lepidic (LEP), papillary (PAP), acinar (ACN), micropapillary (MIP), or solid (SOL) [5,6]. Based on this recently published histologic

classification, 14 studies worldwide have validated the clinical relevance of this system. These studies have confirmed a 100% survival outcome of adenocarcinoma in situ with a 100% LEP growth pattern, contrasting with poor survival outcomes in patients with invasive adenocarcinoma with predominantly MIP and SOL histologic patterns [7]. In stage I lung cancer patients from the United States, Australia, and Germany, poor survival rates have been associated with SOL, MIP, and PAP adenocarcinoma histologic subtypes. These cases are of particular interest for clinical practice, as these patients may be candidates for adjuvant therapy [8-10]. Recently, our group has correlated this new adenocarcinoma classification with prognostic differences in patients with advanced or metastatic disease, a situation that might not apply to patients in early stages. Patients with advanced disease and high-grade adenocarcinoma have longer overall survival compared with those with intermediate-grade adenocarcinoma probably because of a better response to chemotherapy [11]. We also noted a trend regarding a higher frequency of *EGFR* mutations in LEP and ACN patterns compared with PAP, MIP, and SOL patterns [11]. The reasons behind the prognostic differences in the lung cancer subtypes according to this new classification are yet to be elucidated; however, it is very likely that an accompanying individual genetic expression fingerprint might explain some of the clinical outcomes of each adenocarcinoma subtype.

Because of the differences in clinical, mutational, prognostic, and treatment responses of lung cancer subtypes, we propose the existence of differential gene expression profiles between the adenocarcinoma histologic subgroups based on the IASLC/ATS/ERS classification. Differentially expressed genes might represent novel biomarkers and therapeutic targets. To the best of our knowledge, this is the first study that evaluates genetic expression profiles based on the fourth edition of the 2015 World Health Organization classification [6].

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The present work is a clinical, longitudinal, prospective, observational, and analytical study using a cohort of lung cancer patients with nonprobabilistic sample type selection. For further details regarding sample size, please consult Supplementary Material.

2.2. Patients and tissue samples

From January 2008 to June 2011, patients admitted to the Instituto Nacional de Cancerología (INCan) with a pulmonary lesion suggestive of a primary lung carcinoma were prospectively biopsied. The clinical protocol was approved by the Scientific and Bioethical Committees at INCan (008102510 M1, CB451), and written informed consent was obtained accordingly. Lung tissues were obtained by computer tomography-guided Tru-Cut (CareFusion, San Diego, CA) in the clinically suspected primary tumor.

Patients with histologically confirmed advanced lung adenocarcinoma (stages IIIB and IV) were eligible for inclusion in the present study. If there was a histologic record that did not indicate primary lung adenocarcinoma, the patient was excluded (Fig. 1).

A complete medical history was included, and all lung tumor specimens had a confirmed diagnosis.

Primary tumor core biopsy was performed prior to any treatment, and the specimen was snap-frozen in liquid nitrogen for RNA extraction. An expert pathologist verified the histologic diagnosis and quantified the number of tumor cells. A total of 29 tumor samples were included in the study (Fig. 1). Twelve patients had an exclusive tobacco history-related adenocarcinoma, and 17 patients presented with adenocarcinoma without a history of tobacco use.

2.3. RNA isolation and microarray assays

RNA was extracted from frozen tumor biopsies, weighted, and cryofractured in liquid nitrogen. The procedure for

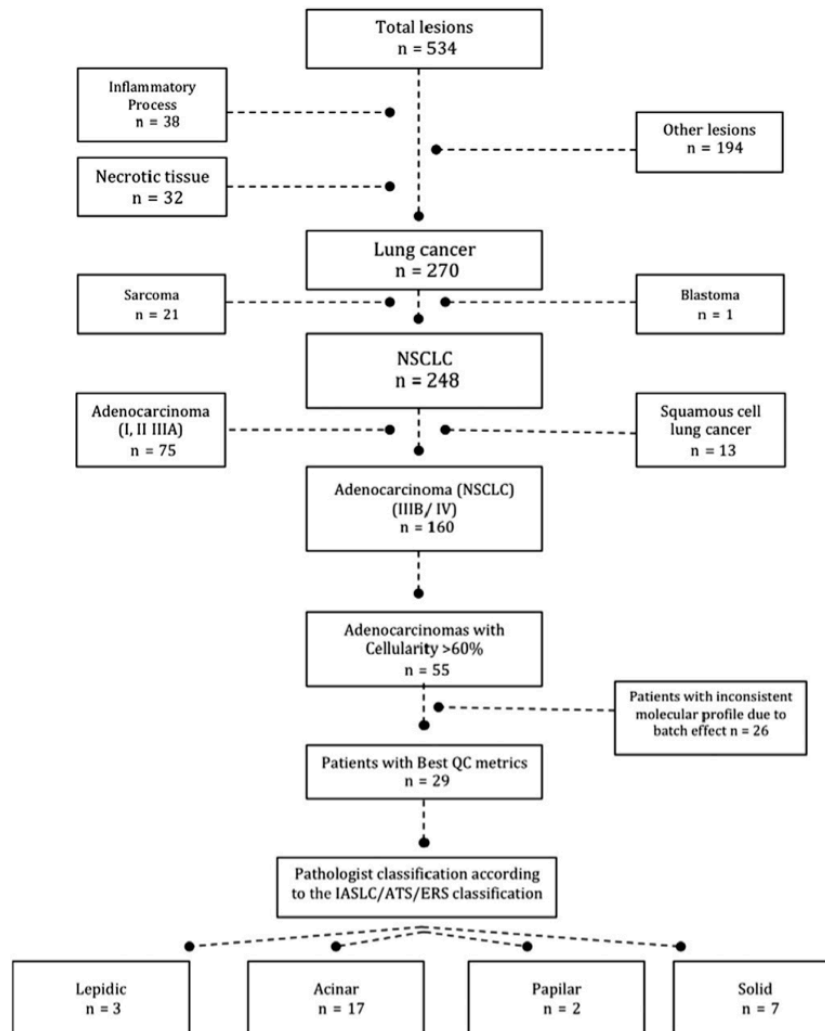


Fig. 1 Consort diagram.

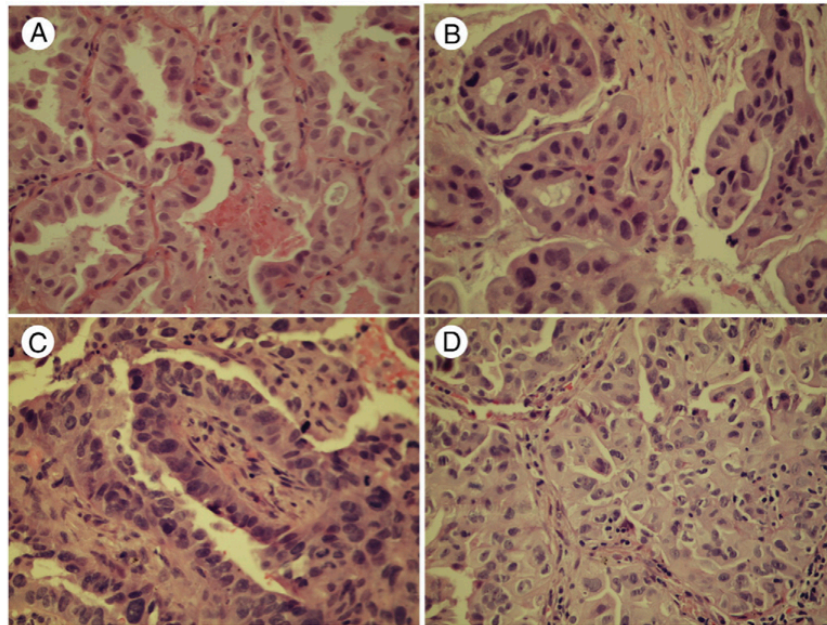


Fig. 2 Micrography showing representative images of the 4 histologic subtypes studied: (A) LEP, (B) ACN, (C) PAP, and (D) SOL.

extraction and purification of total RNA from tissue (up to 5 mg of tissue) was performed using RNeasy Micro Kit (cat. 217 084; Qiagen, Hilden, Germany). The RNA concentration was assessed using the ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). The quality of each RNA sample was validated on an Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), and 150 ng of the best quality samples was processed using Affymetrix Whole Transcript Sense Target Labeling Kit (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA). Fragmented and labeled cDNA was hybridized onto Human Gene 1.0 ST array (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA). The arrays were washed, stained for biotinylated cDNA, and scanned according to the manufacturer's recommendations.

2.4. Gene expression profiling

Samples were classified into 4 main groups, (1) ACN, (2) LEP, (3) PAP, and (4) SOL (Fig. 2A-D), and profiled onto Affymetrix Human Gene ST 1.0 oligo microarrays. Pairwise comparisons between PAP and LEP, SOL and LEP, and ACN and LEP were analyzed to identify differentially expressed genes. Bioinformatics analyses have been previously reported [12]. Genes were selected based on a fold-change >2 (Fold-Ch) and a $P \leq .05$ (Supplementary Figs. 1-3).

For the functional and biomarker analyses, we used Qiagen's Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Qiagen, Redwood City, CA, www.qiagen.com/ingenuity). IPA Software was used to identify gene signaling pathways that were involved in biological processes or functions, and the biomarkers identified are indexed in the IPA database. The filters for identifying biomarkers include the reported use of the genes (eg, diagnosis, prognosis, and efficacy) in NSCLC.

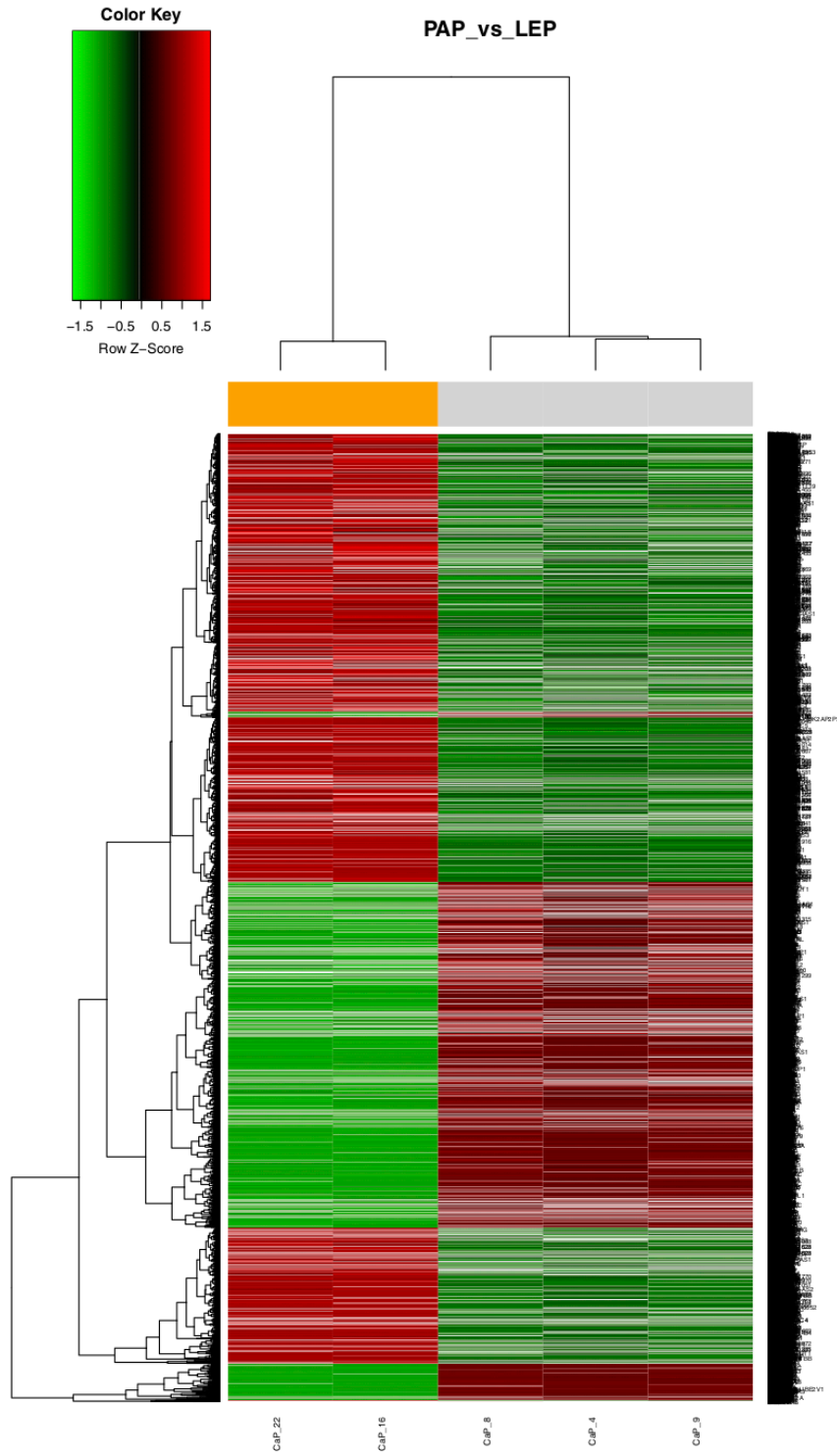
2.5. Ethics approval and consent to participate

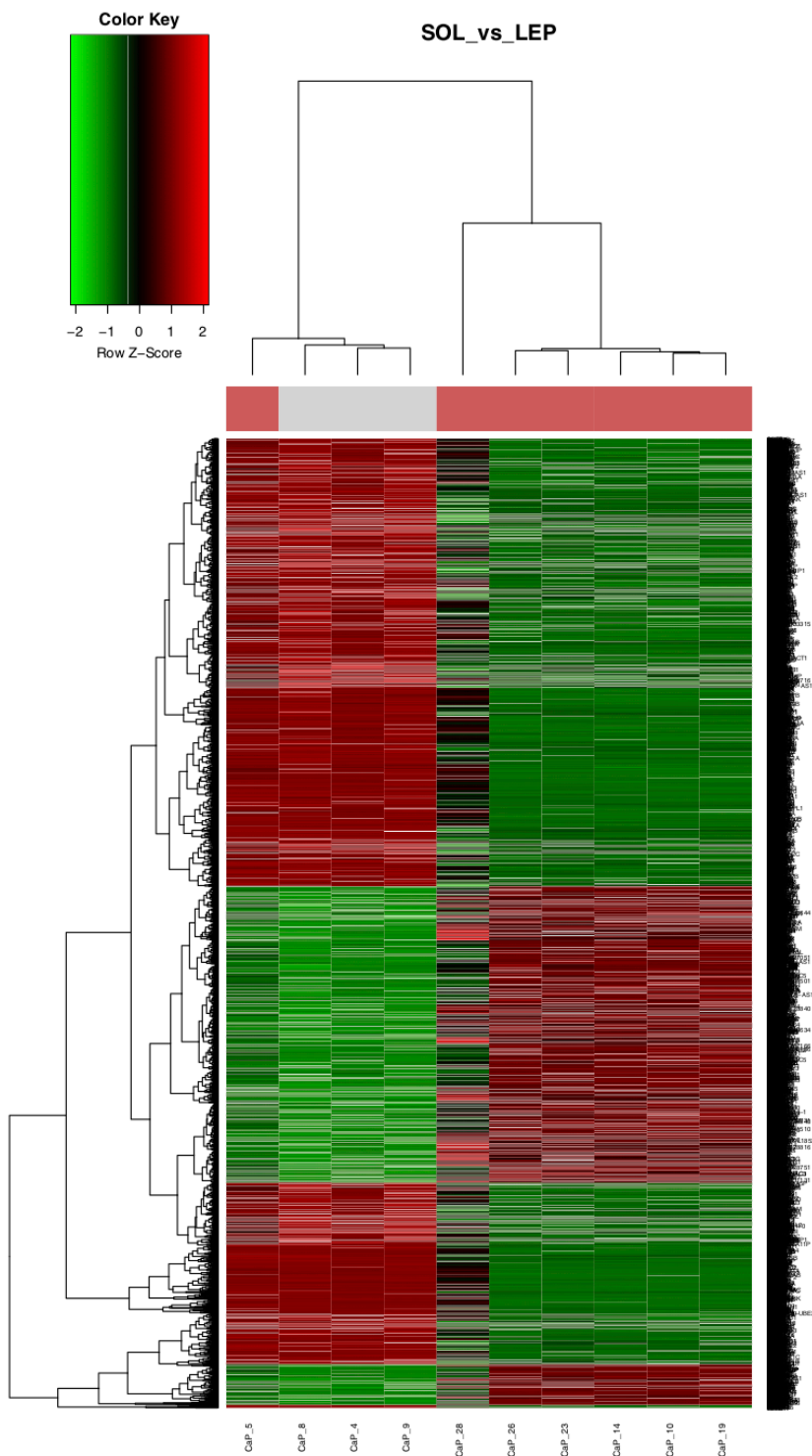
Written informed consent was obtained from all the patients prior to the tumor sampling. The clinical protocol was approved by the Scientific and Bioethical Committees at IN-Can (008102510 M1, CB451).

3. Results

A total of 29 samples from patients with a mean age of 62.4 years were analyzed. Of these, 65.5% were more than 60 years of age, 58.6% (17/29) were female, and 41.4% (12/29) were male. In total, 58.6% of the patients had no tobacco smoke exposure, whereas 41.4% reported tobacco smoke exposure.

Fig. 3 Heat map of an unsupervised hierarchical clustering of significantly different genes of adenocarcinoma patients with PAP (n = 2) versus LEP (n = 3) histologic pattern ($P < .05$). Each column represents a patient, and each row represents a gene. The heat map indicates the level of gene expression. Red: upregulated; green: downregulated.





Regarding mutation profiles, 34.5% of patients had *EGFR* mutations. One patient had *ALK* rearrangement, and another patient was *KRAS* positive. The contralateral lung was affected in greater than half the patients (58.6%). In addition, 20.7% of the patients presented central nervous system involvement with bone metastasis. The most frequent adenocarcinoma histologic pattern subtype was ACN at 58.6% (17/29), followed by SOL at 24.1% (7/29), LEP at 10.3% (3/29), and PAP at 6.8% (2/29) (Fig. 2A-D); we did not have any cases with pure or predominant MIP histologic pattern. Importantly, 13 of the patients exhibited a pure histological pattern, whereas 16 presented with a mixed histology. Most of the patients had an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Performance Status (PS) of 0 to 1 (79.35%). In all patients, the most common response to first-line treatment was progressive disease in 31%, followed by a partial response in 17.2%, stable disease in 13.8%, and complete response 3.4%, but the response was not evaluable in 34.5% of the total cases (Supplementary Table 1S).

We did not identify any statically significant associations among smoking, nonsmoking, an *EGFR*-positive status, and histological pattern subtype. The median follow-up of patients was 12.2 (95% confidence interval, 0-26.9) months. The median overall survival was 34.8 (95% confidence interval, 21.1-48.5) months.

3.1. Identification of differentially expressed genes

Statistically significant differences in gene expression were selected according to fold-change >2 (Fold-Ch) and a $P \leq .05$. Differences in gene expression are presented in Figs. 3-5, which present unsupervised hierarchical clustering of gene expression profiles with significant differences ($P < .05$) between patients with PAP versus LEP, SOL versus LEP, and ACN versus LEP histologic predominant patterns (2 groups top dendrogram clustering). Using these 2 summary statistics, we clearly observed the proportion of up- and downrepresented genes, and the lepidic pattern had clear differences compared with other histologic subtypes.

3.2. Differential expression between groups in adenocarcinoma

Paired comparison by supervised hierarchical clustering analyses between all 4 histologic patterns was performed. The only comparisons that revealed gene expression associations with a statistically significant ($P < .01$) genetic expression profile were between the predominant histologic patterns of PAP versus LEP, SOL versus LEP, and ACN versus LEP (Figs. 3-5). For the histologic predominant pattern PAP versus LEP, a total of 4066 upregulated genes and 3934 downregulated genes were identified (Fig. 3). For the

histologic predominant pattern SOL versus LEP, a total of 29 upregulated genes and 106 downregulated genes were identified (Fig. 4). For the histologic predominant pattern ACN versus LEP, a total of 49 upregulated genes and 113 downregulated genes were identified (Fig. 5). Additionally, 13 genes with differential expression in the LEP histologic pattern exhibit a specific genetic expression profile compared with the other histologic predominant patterns analyzed (Fig. 6A and B). To identify biomarkers and the functional impact of these 3 first groups of up- or downregulated genes, we used IPA software.

3.3. Biomarker and functional analysis

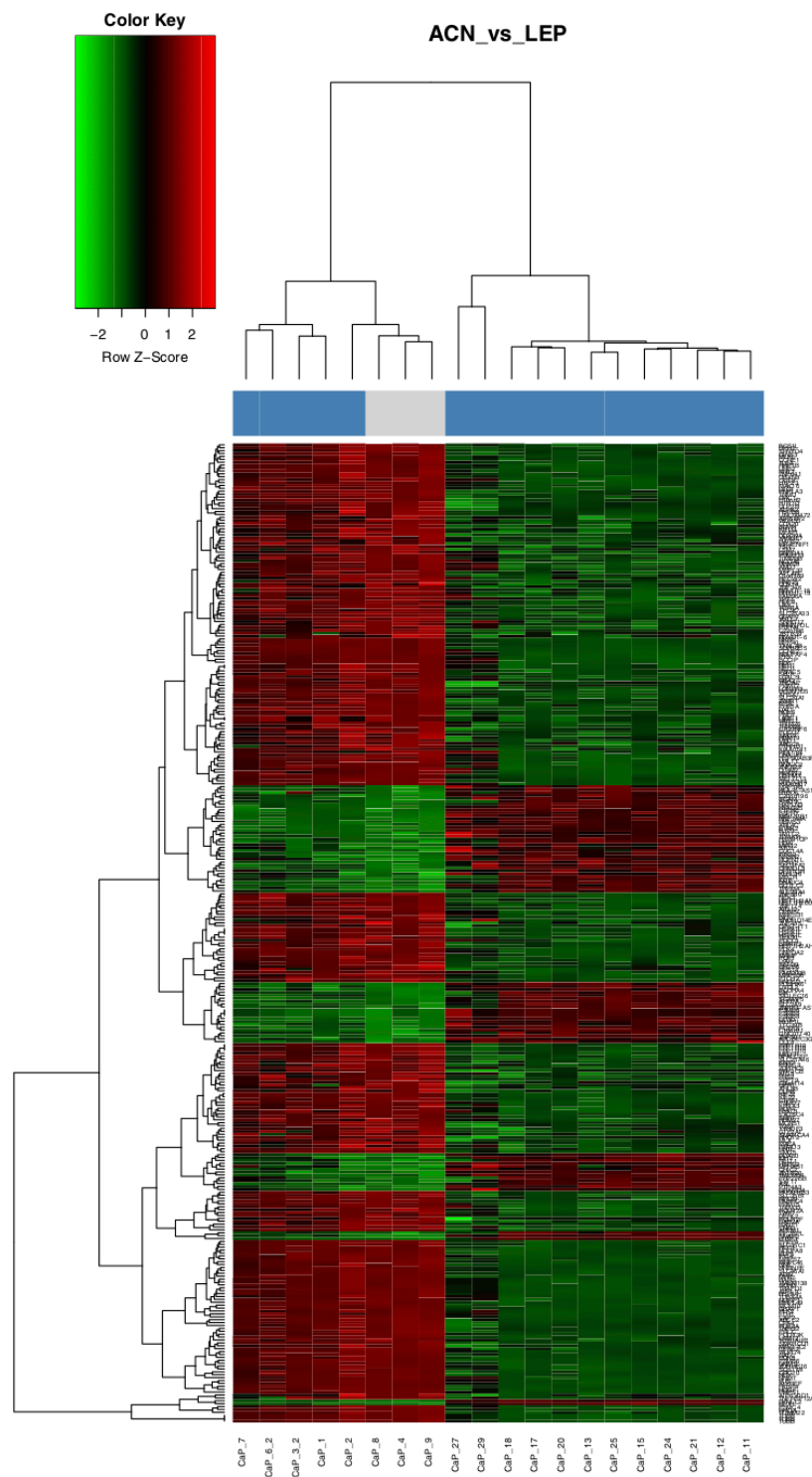
We used IPA software to identify biomarkers and predict the functional impact of 3 groups of up- or downregulated genes (PAP versus LEP, SOL versus LEP, and ACN versus LEP). For the histologic predominant pattern PAP versus LEP, a total of 31 upregulated genes and 45 downregulated genes have reported functions as biomarkers (Supplementary Table 2S) in different NSCLC histologic types and at least 1 of the following categories: diagnosis, disease progression, efficacy, prognosis, safety, and response to therapy. For the histologic predominant pattern SOL versus LEP, a total of 3 upregulated genes and 4 downregulated genes were previously reported as biomarkers (Supplementary Table 3S). All of these genes were described in different carcinomas (NSCLC, renal, colorectal, pancreatic, breast, brain, cervical, and bladder cancer) and are involved in at least 1 of the following functional categories: diagnosis, disease progression, efficacy, and prognosis. For the histologic predominant pattern ACN versus LEP, a total of 6 upregulated and 7 downregulated genes were identified as probable biomarkers (Supplementary Table 4S). All of the genes were previously reported in different malignant carcinomas (NSCLC, renal, colorectal, endometrial, head and neck, breast, brain, liver, and bladder cancer) and were functionally associated with the following categories: diagnosis, disease progression, treatment efficacy, and clinical prognosis.

Enrichment and functional analysis through biological networks was conducted by IPA software. For the comparison of the 4 predominant histologic patterns, the top functional networks were related to 8 different biological categories, as follows: DNA replication, recombination and repair, cell cycle, cell death and survival, RNA posttranscriptional modification, cancer, organismal injury and abnormalities, and cellular development (Supplementary Table 5S).

3.4. Gene expression signature of the LEP histologic pattern

As previously mentioned, 13 genes were identified with a specific differential expression (10 upregulated genes and 3

Fig. 4 Heat map of an unsupervised hierarchical clustering of significantly different genes of adenocarcinoma patients with SOL (n = 7) versus LEP (n = 3) histologic pattern ($P < .05$). Each column represents a patient, and each row represents a gene. The heat map indicates the level of gene expression. Red: upregulated; green: downregulated.



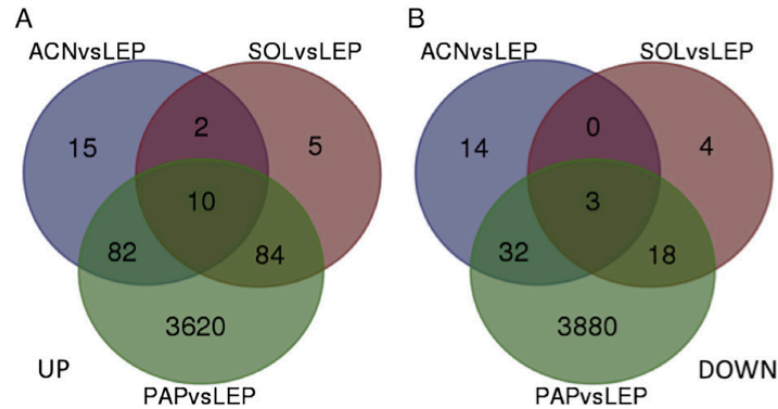


Fig. 6 Venn-histology analyses showing a shared profile of the up- (A) and downregulated (B) genes identifying a unique pattern of gene expression for LEP contrasting PAP, SOL, and ACN histologic patterns.

downregulated) in the LEP pattern compared with all other histologic predominant patterns (Fig. 6A and B, and Table). Enrichment and functional prediction analysis conducted identified different functional networks related to 6 different biological categories as follows: lipid metabolism, biochemistry of small molecules, vitamin and mineral metabolism, DNA replication, recombination and repair, and cell cycle. All of these categories involved a larger number of differentially expressed unique genes (12/13). Three of the biological functions categories (DNA replication, recombination and repair, and cell cycle) are shared among all histologic comparisons (Supplementary Table 5S).

Downregulated genes include apolipoprotein E (*APOE*), perioplakin (*PPL*), and cell adhesion molecule 1 (*CHLI*) (Table).

Upregulated genes include vestigial like 3 suppressor gene (*VGLL3*), epigene (*EPGN*), ubiquitin interaction motive 1 (*UIMC1*), claspin (*CLSPN*), bromodomain containing 9 (*BRD9*), CTP synthase 1 (*CTPS1*), long intergenic nonprotein coding RNA 472 (*LINC00472*), histone cluster 1 H2ah (*HIST1H2AH*), glucosidase beta acid pseudogene 1 (*GBAP1*), and small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa (U5) (*SNRNP40*) (Table).

4. Discussion

Several studies have shown that histopathological subtypes of lung adenocarcinoma based on the IASLC/ATS/ERS classification can predict prognosis in patients with early disease [10,13-16]. In late stages, histologic subtypes, such as LEP and ACN, exhibit associations with *EGFR* mutations, and

mucinous tumors are related to *KRAS* mutations. High-grade histology patterns, such as MIC and SOL, present an elevated frequency of mediastinal lymph node metastases, low recurrence, and dismal overall survival. Moreover, the histology pattern can predict the benefit of adjuvant chemotherapy or/and radiotherapy. In addition, tumors with MIC and SOL patterns could have a better response to chemotherapy in advanced NSCLC [11].

Several studies have investigated the relationship between tumor expression profiles and clinical outcomes. In this regard, recent reports have identified a correlation between gene signatures and relapse-free and overall survival [17]. Additionally, gene signatures have been able to link, in a molecular manner, early and late-stage lung adenocarcinomas, which share prognostic features and clinical outcomes [18].

Gene expression studies in NSCLC patients demonstrated significantly different gene expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma that could have a prognostic impact and identified biomarkers and potential drivers [19]. In addition, there are other reports of gene expression profiles for distinguishing between these different histologic types [19-22]. Nonetheless, no study has analyzed the genetic expression of the different histologic subtypes of adenocarcinoma. This information could reveal physiological, pathological, and molecular potential biomarkers for each histologic subtype.

In our study, we analyzed different histologic subtypes of lung adenocarcinoma to identify molecular differences that could explain their behavior and its implication in patient outcomes. We observed a marked difference in gene expression in the LEP compared with the other 3 histologic patterns observed in our cohort (PAP, ACN, and SOL) (Figs. 3-5). The functional analysis shows 8 important biological categories that were affected compared with the other subtypes: DNA

Fig. 5 Heat map of an unsupervised hierarchical clustering of significantly different genes of adenocarcinoma patients with ACN (n = 17) versus LEP (n = 3) histology ($P < .05$). Each column represents a patient, and each row represents a gene. The heat map indicates the level of gene expression. Red: upregulated; green: downregulated.

Table Genes from the unique pattern of expression of LEP histology compared with PAP, SOL and ACN			
Symbol	Entrez gene name	Expression	FX
<i>APOE</i>	Apolipoprotein E	Down in LEP	A major apoprotein of the chylomicron. It binds to a specific liver and peripheral cell receptor and is essential for the normal catabolism of triglyceride-rich lipoprotein constituents. Mutations in this gene result in familial dysbetalipoproteinemia or type III hyperlipoproteinemia).
<i>PPL</i>	Periplakin	Down in LEP	Component of desmosomes and of the epidermal cornified envelope in keratinocytes. Interacts with <i>AKT1/PKB</i> signaling, which mediates a variety of cell growth and survival processes.
<i>CHL1</i>	Cell adhesion molecule L1-like	Down in LEP	Member of the L1 gene family of neural cell adhesion molecules. It is a neural recognition molecule that may be involved in signal transduction pathways. This protein may also play a role in the growth of certain cancers (provided by RefSeq, Nov 2011).
<i>VGLL3</i>	Vestigial-like family member 3	Up in LEP	<i>VGLL3</i> is a protein coding gene. <i>VGLL2</i> is an important paralog of this gene. This gene may act as a specific coactivator for the mammalian TEFs.
<i>EPGN</i>	Epithelial mitogen	Up in LEP	Member of the epidermal growth factor family. Members of this family are ligands for EGFR and play a role in cell survival, proliferation, and migration. Expression of this transcript and protein has been reported in cancer specimens of the breast, bladder, and prostate (provided by RefSeq, Aug 2012).
<i>UIMC1</i>	Ubiquitin interaction motif containing 1	Up in LEP	Diseases associated with <i>UIMC1</i> include familial breast cancer. Among its related pathways are cell cycle, mitotic and DNA damage. It is a ubiquitin-binding protein that specifically recognizes and binds Lys-63-linked ubiquitin. The protein plays a central role in the <i>BRCA1-A</i> complex by specifically binding Lys-63-linked ubiquitinated histones H2A and H2AX at DNA lesions sites, leading to targeting the BRCA1-BARD1 heterodimer to sites of DNA damage at DSBs.
<i>CTPS1</i>	CTP synthase 1	Up in LEP	Enzyme responsible for the catalytic conversion of UTP to CTP. This reaction is an important step in the biosynthesis of phospholipids and nucleic acids. The activity of this protein is important in the immune system, and loss of function of this gene is associated with immunodeficiency (provided by RefSeq, Jul 2014).
<i>CLSPN</i>	Claspin	Up in LEP	Essential upstream regulator of checkpoint kinase 1 and can trigger checkpoint arrests of the cell cycle in response to replicative stress or DNA damage by both ionizing and UV irradiation. The protein is also required for efficient DNA replication during normal S phase (provided by RefSeq, Jun 2010). It is an adapter protein that binds to BRCA1 and the checkpoint kinase CHEK1 and facilitates the ATR-dependent phosphorylation of both proteins. It also specifically binds to branched DNA structures and may associate with S-phase chromatin following the formation of the pre-replication complex. This activity may indicate a role for this protein as a sensor that monitors the integrity of DNA replication forks.
<i>LINC00472</i>	Long intergenic nonprotein coding RNA 472	Up in LEP	<i>LINC00472</i> is an RNA gene and is affiliated with the noncoding RNA class.
<i>BRD9</i>	Bromodomain containing 9	Up in LEP	GO annotations related to this gene include nucleic acid binding and lysine-acetylated histone binding. An important paralog of this gene is <i>BRD7</i> . It may play a role in chromatin remodeling and regulation of transcription.
<i>HIST1H2AH</i>	Histone cluster 1, H2ah	Up in LEP	It is a core component of nucleosome. Nucleosomes wrap and compact DNA into chromatin, limiting DNA accessibility to the cellular machinery that requires DNA as a template. Histones thereby play a central role in transcription regulation, DNA repair, DNA replication, and chromosomal stability (provided by RefSeq, Aug 2015).
<i>GBAP1</i>	Glucosidase, beta, acid pseudogene 1	Up in LEP	Pseudogene
<i>SNRNP40</i>	Small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa (U5)	Up in LEP	This gene encodes a component of the snRNP particle. The U5 snRNP is part of the spliceosome, a multiprotein complex that catalyzes the removal of introns from premessenger RNAs (provided by RefSeq, Jul 2008).

Abbreviations: CTP, cytidine triphosphate; DSBs, double-stranded breaks; UTP, uridine triphosphate.

replication, recombination and repair, cell cycle, cell death and survival, RNA posttranscriptional modification, cancer, organismal injury and abnormalities, and cellular development (Supplementary Table 5S). Additionally, we identified 13 genes differentially expressed that could be used as a transcriptome signature for the LEP histologic pattern (Fig. 6A and B). This signature includes various genes that correlate with the better prognosis of the LEP histologic pattern. *APOE* appears upregulated in all histologic patterns but not in LEP. *APOE* expression promotes proliferation and migration in lung adenocarcinoma, so its upregulation in the SOL, PAP, and ACN subtypes correlates with their worse survival compared with LEP pattern [23]. Another downregulated gene in LEP is *PPL*. Low expression of *PPL* due to CpG hypermethylation promotes a metastatic phenotype in squamous adenocarcinoma, a feature that is not compatible with the better outcome of the LEP histology [24]. Like *PPL*, *CHL* is downregulated in LEP, and its upregulation is related to progression, spread, and metastasis in NSCLC [25,26] (Table).

On the other hand, *EPGN*, *VGLL3*, and *UIMC1* are upregulated in LEP and are associated with overall survival and better prognosis. *EPGN* is a receptor of the *EGFR* family associated with improved survival in breast cancer [27]; *VGLL3* is a potential suppressor gene that inhibits tumor progression and is related to overall survival in prostate cancer patients [28,29]. *UIMC1* has been seen to work with *BRCA1* in the damage repair response [30]; it also works as a gatekeeper in impeding the epithelial-mesenchymal transition related to metastasis/malignancy, and its expression level positively correlated with the survival rate in lung adenocarcinoma and breast cancer patients [31]. Moreover, in a phase II clinical trial, *BRCA1* and *UIMC1* expression correlated with a crucial modulating effect on a model of customized chemotherapy [32]. On the contrary, *CLSPN* and *BRD9* are upregulated in the LEP pattern; however, these molecules correlate with poor prognosis. *CLSPN* is a cell cycle adaptive protein related to *Chk1*, and its upregulation decreases the radiation response in metastatic xenograft animal models [33]. *BRD9* is involved in DNA stability/correction, and it has been proposed as a new oncology target for the development of potent and selective inhibitors, thus representing an interesting therapeutic option for the rational development of novel LEP NSCLC therapy [34,35] (Table).

5. Conclusion

A better understanding of the molecular backgrounds of the different subtypes of adenocarcinoma and their clinical characteristics will lead to the development of rational treatment strategies. We found a differential gene expression among PAP, SOL, and ACN versus LEP patterns. These differences in gene expression might partly explain the difference in prognosis in each adenocarcinoma subtype and could help to guide treatment decisions via the identification of new molecular

targets. We identified a gene expression signature of 13 genes with a unique behavior in the LEP histologic pattern that could be used to recognize specifically this subtype. Our findings also highlight the importance of the new IASLC/ATS/ERS classification. Additional studies focused on the IASLC/ATS/ERS classification are needed to define specific gene expression profiles related to each adenocarcinoma subtype.

Availability of data and material

The raw data are accessible with the series record GSE87026 in the GEO Web page or through the following URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE87026>.

Authors' contributions

O. A. and C. R. E. are the guarantors of the content of the manuscript, including the data and analysis. O. A. and F. A. M. made substantial contributions to conception and design. C. M. R., A. O. G., A. A. S., and G. J. A. F. acquired data. C. R. E., G. E. M., A. F. C., A. H. M., and O. A. analyzed the data. C. M. R., A. O. G., G. J. A. F., and O. A. drafted the manuscript. All authors revised the manuscript and approved the final version.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2017.06.002>.

References

- [1] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. The global burden of cancer 2013. *JAMA Oncol* 2015;1:505-27.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5-29.
- [3] Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med* 2008;359:367-80.
- [4] Arrieta O, Cardona AF, Martin C, et al. Updated frequency of EGFR and KRAS mutations in non-small-cell lung cancer in Latin America: the Latin-American Consortium for the Investigation of Lung Cancer (CLI-CaP). *J Thorac Oncol* 2015;10:838-43.
- [5] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, 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* 2011;6:244-85.
- [6] Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. 4th ed. Geneva: WHO Press; 2015.
- [7] Tsao MS, Marguet S, Le Teuff G, et al. Subtype classification of lung adenocarcinoma predicts benefit from adjuvant chemotherapy in patients undergoing complete resection. *J Clin Oncol* 2015;33:3439-46.

- [8] Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol* 2011;24:653-64.
- [9] Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival? A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol* 2011;6:1496-504.
- [10] Warth A, Muley T, Meister M, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol* 2012;30:1438-46.
- [11] Campos-Parra AD, Aviles A, Contreras-Reyes S, et al. Relevance of the novel IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma in advanced disease. *Eur Respir J* 2014;43:1439-47.
- [12] Ortega-Gomez A, Rangel-Escareno C, Molina-Romero C, et al. Gene-expression profiles in lung adenocarcinomas related to chronic wood smoke or tobacco exposure. *Respir Res* 2016;17:42.
- [13] Zhang J, Wu J, Tan Q, Zhu L, Gao W. Why do pathological stage IA lung adenocarcinomas vary from prognosis? A clinicopathologic study of 176 patients with pathological stage IA lung adenocarcinoma based on the IASLC/ATS/ERS classification. *J Thorac Oncol* 2013;8:1196-202.
- [14] Ujicie H, Kadota K, Chaff JE, et al. Solid predominant histologic subtype in resected stage I lung adenocarcinoma is an independent predictor of early, extrathoracic, multisite recurrence and of poor post-recurrence survival. *J Clin Oncol* 2015;33:2877-84.
- [15] Murakami S, Ito H, Tsubokawa N, et al. Prognostic value of the new IASLC/ATS/ERS classification of clinical stage IA lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2015;90:199-204.
- [16] Hung JJ, Yeh YC, Jeng WJ, et al. Predictive value of the International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of lung adenocarcinoma in tumor recurrence and patient survival. *J Clin Oncol* 2014;32:2357-64.
- [17] Chen HY, Yu SL, Chen CH, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007;356:11-20.
- [18] Dama E, Melocchi V, Dezi F, et al. An aggressive subtype of stage I lung adenocarcinoma with molecular and prognostic characteristics typical of advanced lung cancers. *Clin Cancer Res* 2016;23:62-72.
- [19] Skrzypski M, Dziadziuszko R, Jassem E, et al. Main histologic types of non-small-cell lung cancer differ in expression of prognosis-related genes. *Clin Lung Cancer* 2013;14:666-73.
- [20] Lazar V, Suo C, Orear C, et al. Integrated molecular portrait of non-small cell lung cancers. *BMC Med Genomics* 2013;6:53.
- [21] Watanabe T, Miura T, Degawa Y, et al. Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR. *Cancer Cell Int* 2010;10:2.
- [22] Girard L, Rodriguez-Canales J, Behrens C, et al. An expression signature as an aid to the histologic classification of non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:4880-9.
- [23] Su WP, Chen YT, Lai WW, Lin CC, Yan JJ, Su WC. Apolipoprotein E expression promotes lung adenocarcinoma proliferation and migration and as a potential survival marker in lung cancer. *Lung Cancer* 2011;71:28-33.
- [24] Otsubo T, Hagiwara T, Tamura-Nakano M, et al. Aberrant DNA hypermethylation reduces the expression of the desmosome-related molecule periplakin in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Med* 2015;4:415-25.
- [25] Senchenko VN, Krasnov GS, Dmitriev AA, et al. Differential expression of CHL1 gene during development of major human cancers. *PLoS One* 2011;6:e15612.
- [26] He LH, Ma Q, Shi YH, et al. CHL1 is involved in human breast tumorigenesis and progression. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;438:433-8.
- [27] McIntyre E, Blackburn E, Brown PJ, Johnson CG, Gullick WJ. The complete family of epidermal growth factor receptors and their ligands are coordinately expressed in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;122:105-10.
- [28] Li C, Peng Z, Skoog L, et al. Gene expression biomarkers to predict overall survival of prostate cancer patients. *J Clin Oncol (Meet Abstr)* 2012;30:4561.
- [29] Gambaro K, Quinn MC, Wojnarowicz PM, et al. VGLL3 expression is associated with a tumor suppressor phenotype in epithelial ovarian cancer. *Mol Oncol* 2013;7:513-30.
- [30] Yan J, Kim YS, Yang XP, et al. The ubiquitin-interacting motif containing protein RAP80 interacts with BRCA1 and functions in DNA damage repair response. *Cancer Res* 2007;67:6647-56.
- [31] Park SY, Korm S, Chung HJ, et al. RAP80 regulates epithelial-mesenchymal transition related with metastasis and malignancy of cancer. *Cancer Sci* 2016;107:267-73.
- [32] Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on EGFR mutations and BRCA1 mRNA expression. *PLoS One* 2009;4:e5133.
- [33] Choi SH, Yang H, Lee SH, Ki JH, Nam DH, Yoo HY. TopBP1 and Claspin contribute to the radioresistance of lung cancer brain metastases. *Mol Cancer* 2014;13:211.
- [34] Hay DA, Rogers CM, Fedorov O, et al. Design and synthesis of potent and selective inhibitors of BRD7 and BRD9 bromodomains. *MedChemComm* 2015;6:1381-6.
- [35] Huang HT, Chen SM, Pan LB, Yao J, Ma HT. Loss of function of SWI/SNF chromatin remodeling genes leads to genome instability of human lung cancer. *Oncol Rep* 2015;33:283-91.

