

Biomarcadores agnósticos de fusiones génicas en oncología: revisión diagnóstica y terapéutica

Tumor-agnostic biomarkers in Oncology: a review of diagnostic and therapeutic management

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS)
Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS



Biomarcadores agnósticos de fusiones génicas en oncología: revisión diagnóstica y terapéutica

Tumor-agnostic biomarkers in Oncology: a review of diagnostic and therapeutic management

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias (AETS)
Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS



GOBIERNO
DE ESPAÑA



RED ESPAÑOLA DE AGENCIAS DE EVALUACIÓN
DE TECNOLOGÍAS Y PROCEDIMIENTOS DEL SISTEMA NACIONAL DE SALUD



AETS Agencia de Evaluación
de Tecnologías Sanitarias
Instituto de Salud
Carlos III

Biomarcadores agnósticos de fusiones génicas en oncología: revisión diagnóstica y terapéutica. Cristina Asensio del Barrio. Ministerio de Sanidad. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III. 2024.

1 archivo pdf; - (Informes, Estudios e Investigación).

Palabras clave: biomarcadores agnósticos de fusión, fusión de genes *NTRK*, reordenamientos de gen *ALK*, *RET* y *ROS1*, tests diagnósticos, algoritmo diagnóstico, estudio inmunohistoquímico, IHC, PCR, hibridación *in situ* por fluorescencia, FISH, secuenciación de nueva generación, NGS, terapia dirigida o de precisión, efectividad diagnóstica, efectividad terapéutica, seguridad.

Keywords: biomarkers, tumor agnostic, fusion *NTRK* positive tumor, rearrangement *ALK*, *RET* and *ROS1*, diagnostic tests, FISH, Immunohistochemistry, IHC, new generation sequence, NGS, diagnostic accuracy, clinical effectiveness, safety.

Convenio de colaboración/financiación:

Este documento ha sido realizado por la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III en el marco de la financiación del Ministerio de Sanidad para el desarrollo de las actividades del Plan anual de Trabajo de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del SNS, aprobado en el Pleno del Consejo Interterritorial del SNS del 26 de mayo de 2021.

El contenido del presente informe es responsabilidad exclusiva de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III sin que la colaboración de los revisores presuponga por su parte la completa aceptación del mismo.

Para citar este informe:

Asensio del Barrio C. *Biomarcadores agnósticos de fusiones génicas en oncología: revisión diagnóstica y terapéutica*. Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías y Prestaciones del SNS. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (AETS-ISCI), Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Madrid. 2024. Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.

Información editorial

Editat: Ministerio de Sanidad. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Instituto de Salud Carlos III. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias.

Fecha de edición: 2024.

Contacto: crisasensio@isciii.es

Instituto de Salud Carlos III

NIPO pdf: 156240172

NIPO Epub: 156240188

Ministerio de Sanidad:

NIPO pdf: 133-24-007-1

NIPO Epub: 133-24-008-7

Maquetación: Diseño Gráfico Gallego y Asociados, S. L.

Este documento puede ser reproducido total o parcialmente, por cualquier medio, para su uso no comercial, siempre que se cite explícitamente su procedencia.

Información preliminar

Autoría

Autoría completa del informe

Cristina Asensio del Barrio. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (AETS-ISCIII).

Otros participantes

Documentalista

Esther Elena García Carpintero. AETS-ISCIII.

Revisión interna

Este informe de evaluación ha sido sometido a un proceso de revisión interna realizada por el **Dr. Luis M^o Sánchez Gómez.** AETS-ISCIII.

Revisión externa

Este informe de evaluación ha sido sometido a un proceso de revisión externa.

La AETS-ISCIII agradece su colaboración desinteresada y los comentarios aportados a:

- **Dr. Ramón Colomer Bosch,** Profesor Titular de Oncología, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Jefe de Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid.
- **Dra. Edurne Arriola Aperribay,** Jefa de Sección Cáncer de Pulmón y Genitourinario. Oncología Médica, Hospital del Mar, Barcelona.
- **Dr. Javier de Castro Carpeño,** Jefe de Sección, Oncología Médica, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Agradecimientos

La AETS-ISCIII agradece a la **Dra. Marta Soler Soneira,** del Centro Nacional de Epidemiología (CNE-ISCIII), sus aportaciones sobre lenguaje inclusivo en la redacción del informe.

Declaración de conflictos de interés

La Dra. Edurne Arriola Aperribay ha recibido financiación de Pfizer y Lilly para estudios relacionados con Lorlatinib y Selpercatinib. El equipo evaluador de la AETS-ISCIII ha considerado que estas actividades no debieran impedir su participación como revisora externa del informe. Además, su colaboración no ha requerido el acceso a material sensible o confidencial y sólo ha tenido acceso a la información disponible en los últimos borradores del informe.

El resto de autores, colaboradores y revisores han declarado no presentar conflictos de interés relacionados con el tema objeto de evaluación del presente informe.

Índice

ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
SIGLAS Y ACRÓNIMOS	9
ALGUNAS DEFINICIONES O CONCEPTOS	14
RESUMEN	17
SUMMARY	23
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. Medicina de precisión.....	29
1.2. Biomarcadores tumor-agnósticos de fusión.....	31
1.2.1. Fusiones del gen <i>NTRK</i>	32
1.2.2. Reordenamientos <i>ALK</i>	36
1.2.3. Fusiones del gen <i>ROS1</i>	37
1.2.4. Reordenamientos <i>RET</i>	38
1.3. Técnicas diagnósticas.....	38
1.3.1. IHQ.....	39
1.3.2. FISH	42
1.3.3. RT-PCR	46
1.3.4. NGS	47
1.4. Terapias tumor-agnósticas.....	53
1.4.1. Larotrectinib (Vitrakvi®).....	54
1.4.2. Entrectinib (Rozlytrek®)	55
1.4.3. Otros fármacos	57
2. OBJETIVOS	60
3. METODOLOGÍA	62
3.1. Criterios de selección de estudios.....	62
3.2. Criterios de exclusión	63
3.3. Fuentes de información	64
3.4. Estrategias de búsqueda	64
3.5. Proceso de selección de estudios.....	65
3.6. Extracción de datos.....	66

4. RESULTADOS	67
4.1. Resultados de la búsqueda y selección de estudios	67
4.2. Estudios sobre pruebas diagnósticas para identificar a los biomarcadores agnósticos de fusión.....	68
4.2.1. Informes de ETS	68
4.2.2. Revisiones sistemáticas y meta-análisis.....	71
4.2.3. Propuestas de algoritmos diagnósticos para identificar los biomarcadores de fusión.....	72
4.2.4. Documentos de consenso de sociedades científicas españolas..	83
4.2.5. Recomendaciones de ESMO.....	89
4.2.6. Guías norteamericanas	94
4.2.7. Documentos de consenso, guías y/o recomendaciones de otras Sociedades Científicas.....	100
4.3. Estudios sobre los tratamientos agnósticos.....	109
4.3.1. Estudios estimativos de efectividad comparada	109
4.3.2. Revisiones sistemáticas.....	113
4.3.2. Guías de evaluación de tecnología, de NICE	114
4.3.4. Documentos de consenso	118
4.4. Estudios económicos	119
4.4.1. Informe de Scottish Medicine Consortium	119
4.4.2. Informe de ETS del Norwegian Institute of Public Health (NIPH)....	120
4.4.3. Estudios originales sobre costes de las pruebas diagnósticas y tratamientos agnósticos.....	121
5. DISCUSIÓN	125
5.1. En relación al diagnóstico de biomarcadores de fusión	125
5.2. En relación a los tratamientos agnósticos	132
5.3. Aspectos económicos y organizativos	136
6. CONCLUSIONES	141
6.1. Para futuras investigaciones.....	144
7. REFERENCIAS	146
8. ANEXOS	165
Anexo I. ESCAT.....	165
Anexo II. Companion Diagnostic (CDx)	167
Anexo III. Estrategias de búsqueda.....	169
Anexo IV. Algoritmos diagnósticos para estudio de fusiones <i>NTRK</i>	173

Índice de tablas

Tabla 1. Frecuencia de fusiones <i>NTRK</i> en algunos tumores	34
Tabla 2. Principales ventajas y desventajas de cada técnica diagnóstica	52
Tabla 3. Criterios de inclusión.....	63
Tabla 4. Estudios incluidos en el Informe de NIPH.....	69
Tabla 5. Niveles ESCAT.....	165
Tabla 6. CDx aprobados por la FDA.....	166

Índice de figuras

Figura 1. Algoritmo diagnóstico propuesto por Marchetti y cols	73
Figura 2. Algoritmo para <i>screening</i> utilizando TMA. Algoritmo propuesto para <i>screening</i> de biomarcadores raros y para seleccionar a los pacientes candidatos a tratamientos tumor-agnósticos. TMA: <i>tissue micro arrays</i>	74
Figura 3. Protocolo propuesto por Zito Marino y cols.....	78
Figura 4. Algoritmo diagnóstico propuesto por Solomon y cols	80
Figura 5. Algoritmo propuesto por Penault y cols	82
Figura 6. Algoritmo para identificar fusiones <i>NTRK</i> , de SEOM, SEAP y SEHOP	86
Figura 7. Propuesta de ESMO para detección de fusiones <i>NTRK</i>	90
Figura 8. Algoritmo propuesto para pacientes con NSCLC	172
Figura 9. Algoritmo propuesto para pacientes con CCR	173
Figura 10. Algoritmo propuesto para pacientes con sarcoma	174
Figura 11. Algoritmo propuesto para pacientes pediátricos	175

Siglas y acrónimos

AHRQ	<i>Agency for Healthcare Research and Quality's</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ALK	<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i>
AMP	Método <i>anchored multiplex PCR</i>
ASCO	<i>American Society of Surgical Oncology</i>
AUC-ROC	Área bajo la curva ROC
AVAC	Años de Vida Ajustados por Calidad
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
<i>BRAF</i>	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
BSC	<i>Best Supportive Care</i>
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CCR	Carcinoma colorrectal
CCRm	Carcinoma colorrectal metastásico
CDx	<i>Companion Diagnostics</i>
CDT	Carcinoma diferenciado de tiroides
cfDNA/RNA	DNA/RNA libre
CISH	Hibridación <i>in situ</i> cromogénica
CMT	Carcinoma medular de tiroides
CPT	Carcinoma papilar de tiroides
cDNA	DNA complementario
CR	Respuesta completa
ctDNA	DNA tumoral circulante
CTC	Células tumorales circulantes
CVRS	Calidad de Vida Relacionada con la Salud
DFS	Supervivencia libre de enfermedad (<i>Disease-free Survival</i>)

dMMR	Deficiencia en la reparación de los errores de emparejamiento (<i>Deficient mismatch-repair</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOR	<i>Odds Ratio</i> Diagnóstica
DoR	Duración de la respuesta
DSS	Supervivencia específica de enfermedad (<i>Disease Specific Survival</i>)
EA	Eventos adversos
EANM	<i>European Association of Nuclear Medicine</i>
ECA	Ensayo clínico aleatorizado
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGAPP	<i>Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention</i>
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMA	Agencia Europea del Medicamento
<i>EML4</i>	<i>Echinoderm Microtubule-Associated Protein 4</i>
EORTC	<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer</i>
ESCAT	<i>ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
ETS	Evaluación de Tecnologías Sanitarias
EUnetHTA	<i>European Network for Health Technology Assessment</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFPE	Fijados en formol e incluidos/embebidos en parafina
FISH	Hibridación <i>in-situ</i> fluorescente (<i>Fluorescence in-situ hybridization</i>)
FN	Falsos Negativos
FP	Falsos Positivos
GIST	Tumor de estroma gastrointestinal
GMI	<i>Growth modulation index</i>
H&E	Hematoxilina y eosina
<i>HER2</i>	Receptor-2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HI	Histología independiente
HR	Hazard Ratio
HTS	<i>High-Throughput o secuenciación de alto rendimiento</i>
IASLC	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IC 95%	Intervalo de confianza al 95%

ICER	Ratio de coste-efectividad incremental
ICr	Intervalo de credibilidad
IHQ	Inmunohistoquímica
INAHTA	Red Internacional de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias
IQR	Rango intercuartílico
JSCO	<i>Japan Society of Medical Oncology</i>
JSMO	<i>Japan Society of Clinical Oncology</i>
<i>KRAS</i>	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene</i>
<i>LMNA</i>	Lamin A/C
LR	Cociente de probabilidad (<i>Likelihood Ratio</i>)
LYs	Años de vida
MASC	Carcinomas análogos a los secretores de mama de glándula salival
MAIC	Comparación indirecta ajustada con emparejamiento (<i>Matching-adjusted indirect comparison</i>)
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEN2	Síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 2
MKI	Inhibidor multiquinasa
MSI	Alta inestabilidad de microsatélites
MSK-IMPACT	<i>Memorial Sloan Kettering Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets</i>
MTB	Comités Moleculares de Tumores (<i>Molecular Tumor Board</i>)
MYCN	Proteína del protooncogén N-myc
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NE	No estimable
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve Growth Factor</i>)
NGS	Secuenciación de nueva generación
NGS-DNA	Secuenciación de nueva generación basada en DNA
NGS-RNA	Secuenciación de nueva generación basada en RNA
NHS	<i>National Health System</i>
NICE	<i>National Institute for Health and Clinical Excellence</i>
NIPH	<i>Norwegian Institute of Public Health</i>
NNS	Número necesario a cribar
NSCLC	<i>Non-Small Cell Lung Carcinoma</i>

NRTK	gen del Receptor de Tirosina Kinasa Neurotrófico (<i>neurotrophic tyrosine receptor kinase</i>)
NTF	Neurotrofina
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
ORR	Tasa de respuesta global (<i>Overall Response Rate</i>)
OS	Supervivencia global (<i>Overall Survival</i>)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PD	Progresión de la enfermedad
PD-1	Proteína 1 de muerte celular programada
PD-L1	Ligando-1 de muerte programada
PFS	Supervivencia libre de progresión
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa (<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>)
PLC- γ	Fosfolipasa C-gamma
PR	Respuesta parcial
Q-PCR	Quantitative-Reacción en Cadena de la Polimerasa
QALYs	Años de vida ajustada por calidad (<i>Quality-adjusted Life Year</i>)
QT	Quimioterapia
RANO	<i>Response Assessment in Neuro-Oncology</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumours</i>
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RFT	Tiempo libre de recurrencia (<i>Recurrence Free Time</i>)
RFS	Supervivencia libre de recurrencia (<i>Recurrence Free Survival</i>)
RM	Resonancia Magnética
RNA	Ácido ribonucleico
ROS1	c-ros proto oncogene
RR	Riesgo Relativo
RT	Radioterapia
RT-PCR	Transcriptasa inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
RWE	Evidencia del mundo real (<i>Real-World Evidence</i>)
SD	Enfermedad estable
Se	Sensibilidad
SE	Error estándar

SEAP	Sociedad Española de Anatomía Patológica
SEHOP	Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SIAPeC	<i>Italian Society of Pathological Anatomy and Cytodiagnostics</i>
SMC	<i>Scottish Medicine Consortium</i>
SMRT	Secuenciación de molécula única (<i>Single Molecule Real-Time</i>)
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema Nacional de Salud
Sp	Especificidad
SPB	Sarcoma de partes blandas
SROC	Curva ROC sumaria
TAT	<i>Turnaround time</i>
TD	Terapia Dirigida (<i>Targeted Therapy</i>)
TFN	Tasa de Falsos Negativos
TKI	Inhibidor de tirosina quinasa
TMA	<i>Tissue micro arrays</i>
TMB	Carga mutacional tumoral
TNM	Sistema de estadificación <i>Tumor Node Metastases</i>
TOS	Taiwan Oncology Society
TRK	Receptor de tropomiosina quinasa o tirosina quinasa
TTP	Tiempo hasta la progresión
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VN	Verdadero Negativo
VP	Verdadero Positivo
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
WES	Secuenciación completa del exoma (<i>Whole Exome Sequencing</i>)
WGS	Secuenciación completa del genoma (<i>Whole Genome Sequencing</i>)
WOS	<i>Web of Science</i>

Algunas definiciones o conceptos

- **Alteraciones en el número de copias:** bien una amplificación o una delección de un gen o de una región del cromosoma (por ejemplo, deleciones en genes supresores de tumores).
- **Biomarcadores predictivos de sensibilidad y de resistencia:** informan sobre la probabilidad de respuesta o no respuesta a un tratamiento concreto. Otros son los **biomarcadores predictivos de efectos adversos**.
- **Biomarcadores pronósticos:** informan de forma precisa sobre la evolución de la enfermedad y la supervivencia del paciente.
- **Carga mutacional del tumor:** número de cambios génicos o mutaciones en una célula cancerosa.
- **Cobertura (*coverage*):** se refiere al porcentaje de bases del genoma de referencia que están siendo secuenciadas una cantidad determinada de veces. Es uno de los factores clave en la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma
- **Concordancia:** es el número de resultados del tests que son concordantes del total de tests analizados.
- **DNA constitucional:** es el DNA en las células germinativas (óvulos y espermatozoides). También se llama **DNA de la línea germinal**.
- **End-to-end study:** estudios que siguen pacientes desde que se realiza el test diagnóstico, incluyendo el tiempo de duración del tratamiento y hasta que se analizan resultados finales de interés.
- **Ensayos en cesta (*basket trials*):** incluyen pacientes en función del perfil molecular, no por el tipo histológico del tumor ni por su localización.
- **Ensayos paraguas (*umbrella trials*):** se analizan pacientes con un solo tipo de tumor y en función del resultado genético de cada uno, se decidirá la terapia dirigida a pautar. Permiten estudiar si fármacos que funcionan en pacientes con tumores en otros órganos son válidos para ese tipo de tumor concreto basándose en el hecho de que compartan el mismo marcador.
- **Gen de fusión (*fusion gene*):** Unión del DNA de dos genes. Los genes de fusión pueden ocurrir como resultado de una translocación, delección o inversión cromosómica.

- **Mutaciones o sustituciones de bases**, que implican un cambio de base en el DNA.
- **Mutaciones *drivers* o conductoras**: aquellas que determinan el inicio de un proceso de carcinogénesis seguido de una proliferación anómala de las células tumorales.
- **Mutación puntual (*point mutation*)**: alteración en la secuencia del DNA causada por el cambio, inserción o delección de un único nucleótido.
- **Profundidad (*depth o depth of coverage*)**: representa el número promedio de veces que cada base del genoma es secuenciada en los fragmentos de DNA. Los valores apropiados de profundidad dependerán del tipo de técnica de secuenciación (panel de genes, exoma o genoma) y de la frecuencia alélica de las variantes que se analizarán (germinales y somáticas).
- **Reordenamiento (*rearrangement*)**: alteración estructural de un cromosoma que implica, normalmente, la rotura y/o la reunión de un segmento de material cromosómico, que da lugar a una configuración anormal, formando un oncogén de fusión; la inversión y la translocación son ejemplos de ello.
- Proceso de **splicing**: corte de intrones y empalme de exones.
- **TAT (*turnaround time*)**: es el tiempo total de un test que incluye la solicitud, la preparación, transporte de la muestra, análisis, interpretación y emisión del informe de resultados.
- **TAT terapéutico**: el intervalo de tiempo desde que se solicita un test hasta que se toma la decisión terapéutica concreta para la persona enferma.
- **Terapia molecular dirigida**: aquella cuya eficacia depende de la presencia o ausencia de mutaciones *drivers*. Esta terapia bloquea las vías de señalización celular que de forma incorrecta se han activado y que están implicadas en la oncogénesis.
- **Transcriptoma**: es el conjunto de genes que se expresan en una célula en un momento dado; el conjunto de todas las «lecturas» de genes presentes en una célula (el DNA debe «leerse» y transcribirse, es decir, copiarse para crear el RNA). Estas «lecturas» se llaman **transcritos**. Dependiendo de la técnica utilizada, a menudo es posible contar el número de transcritos para determinar la cantidad de actividad de los genes, también llamada expresión génica, en un tipo específico de células o tejidos.
- **Translocación**: Este término se refiere al cambio en la ubicación de determinado material cromosómico. Existen dos tipos principales de translocaciones: recíprocas y robertsonianas. En una **translocación recíproca**, se

produce el intercambio de segmentos entre dos cromosomas no homólogos. La **translocación robertsoniana** es la unión de dos cromosomas acrocéntricos por los centrómeros, con pérdida de sus brazos cortos y formando un solo cromosoma y este nuevo cromosoma se denomina «cromosoma por translocación». En los cromosomas acrocéntricos, el centrómero está localizado cerca del extremo del cromosoma; y son el 13, 14, 15, 21 y 22.

- **Utilidad clínica:** evalúa el impacto en salud de un test en términos de riesgos y beneficios; considera su disponibilidad, eficacia, efectividad y seguridad del test en estudio en comparación a la práctica habitual.
- **Validez analítica o rendimiento técnico de un test genético:** es la capacidad del test para medir de forma exacta y fiable un biomarcador de interés en el laboratorio. Viene determinada por la sensibilidad, especificidad, exactitud, precisión, robustez de los resultados y el control de calidad del test.
- **Validez clínica:** evalúa la capacidad del test para detectar de forma exacta y fiable o para predecir una condición clínica. Incluye dos partes: la evaluación de la validez científica, que se refiere a la evidencia de la asociación entre un gen y una enfermedad; y la evaluación del rendimiento diagnóstico del test en términos de sensibilidad, especificidad, valores predictivos y factores de influencia (como la penetrancia, la prevalencia y otros modificadores).

Resumen

Introducción

La presencia de algunas alteraciones moleculares que son dianas biológicas para determinados fármacos en varios tipos tumorales indistintamente ha supuesto un cambio de paradigma en el tratamiento oncológico. El estudio sistemático de los biomarcadores de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROSI* y *RET* se ha convertido en un reto para los sistemas sanitarios para poder seleccionar a pacientes candidatos al tratamiento tumor-agnóstico, que ha demostrado mayor efectividad y seguridad clínica que el tratamiento convencional.

Objetivos

El objetivo de este informe es revisar la literatura científica con el fin de identificar las mejores evidencias sobre el uso de las técnicas IHC, FISH, RT-PCR y NGS para la identificación sistemática de los biomarcadores de fusión de genes *NTRK*, *ALK*, *ROSI* y *RET* en patología oncológica dada su capacidad predictiva de respuesta favorable a terapias agnósticas. También se revisa la efectividad de las terapias agnósticas y su efectividad comparada entre esta terapia dirigida y la terapia estándar, en términos de resultados en salud y seguridad para la persona en tratamiento, así como la repercusión económica asociada a la incorporación de estos tests en la práctica clínica.

Metodología

Se ha realizado una revisión de revisiones de la literatura científica con el fin de sintetizar e integrar toda la evidencia disponible sobre la validez diagnóstica de los diferentes algoritmos, propuestas diagnósticas y recomendaciones de uso de las diferentes técnicas diagnósticas empleadas para la identificación de los biomarcadores agnósticos de genes de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROSI* y *RET*. Se han incluido informes de ETS, documentos de consenso con recomendaciones de las principales sociedades científicas relacionadas con las materias de interés, opiniones de expertos, guías de práctica clínica, revisiones sistemáticas y meta-análisis, propuestas de

algoritmos diagnósticos de grupos de profesionales asistenciales e investigadores y revisiones narrativas de calidad; estudios de comparaciones entre fármacos dirigidos frente a esos biomarcadores y estudios de costes sobre las pruebas diagnósticas y/o los tratamientos agnósticos.

La búsqueda de la literatura se realizó en Medline, Embase, Cochrane Library y otras fuentes de información, recogiendo los estudios publicados a partir de 2015, en inglés o en español, y que cumplieran determinados criterios de selección establecidos a priori. De los estudios seleccionados se han presentado las principales características y resultados de manera narrativa.

Resultados

La búsqueda inicial en Medline permitió localizar 180 referencias sobre las pruebas diagnósticas utilizadas para identificar biomarcadores de fusión y 164 sobre tratamientos agnósticos; en EMBASE, 492 y 208, respectivamente. No se localizaron revisiones Cochrane. Una segunda búsqueda en Medline, permitió recuperar 70 nuevas referencias sobre las pruebas diagnósticas y 208 sobre las terapias. En total, se recuperaron 742 referencias sobre pruebas diagnósticas para biomarcadores y 643 sobre tratamientos tumor-agnósticos. Se eliminaron 263 duplicados. La búsqueda manual a partir de los listados de referencias de algunos documentos y la búsqueda en las páginas web mencionadas en el apartado de fuentes de información, permitió localizar 9 referencias más.

Estudios de efectividad diagnóstica

Se ha seleccionado un total de 25 estudios sobre las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas para identificar los biomarcadores agnósticos de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROS1* y *RET*.

Se han presentado ordenados según el tipo de estudio, recogiendo las principales características y resultados de cada uno de ellos. Dos son informes de ETS, elaborados para ayudar en la toma de decisiones en el sistema sanitario noruego. Uno de ellos sobre el uso de los tests moleculares para la detección de genes *NTRK* de fusión en pacientes con tumores sólidos localmente avanzados o metastásicos, basado en una revisión sistemática de artículos que comparaban la efectividad diagnóstica de las pruebas. El otro, sobre los tests utilizados para detección de alteraciones en el gen *ROS1* en pacientes con NSCLC localmente avanzado o metastásico

en quienes la opción de menor coste para estudiar reordenamientos *ROS1* sería realizar el *screening* con IHQ y a continuación confirmar los resultados positivos mediante FISH u otros métodos por la posibilidad de FP en IHQ.

Una revisión sistemática de la literatura sobre la prevalencia, diagnóstico y tratamientos de tumores con fusiones *NTRK* en población pediátrica. Seis estudios, basados en revisiones de la literatura o en la opinión de personas expertas, con propuestas de algoritmos diagnósticos para identificar los genes de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROS1* y *RET*, junto a principales reflexiones o conclusiones recogidas en estos documentos. Algunos de estos seis estudios se refieren a diferentes tumores con posibles fusiones *NTRK*, otros se limitan al estudio de reordenamientos *ALK* y *ROS1* en cáncer de pulmón. A continuación se presentan tres documentos de consenso elaborados por diferentes sociedades científicas españolas para estudio de fusiones *NTRK* en tumores sólidos, de diferentes biomarcadores en CCR y en cáncer de pulmón. Después se exponen los tres documentos de recomendaciones del grupo de trabajo de Investigación Traslacional y Medicina de Precisión de ESMO, sobre métodos para la detección de fusiones *NTRK*, sobre la detección de fusiones *RET* y sobre el uso de la NGS en pacientes con tumores metastásicos. De las guías americanas, se han seleccionado las de la NCCN para diagnóstico de fusiones *NTRK* en NSCLC, una guía actualizada de CAP-IASLC-AMP en NSCLC y la guía de ASCO sobre diagnóstico de biomarcadores en cáncer de pulmón.

Finalmente, se recogen siete documentos de consenso de otras sociedades científicas de otros países (Canadá, Japón, Taiwán, Australia, India) referidos al estudio de biomarcadores predictivos en distintos tumores sólidos y otro documento de consenso de la red mundial de sarcomas.

Estudios de efectividad terapéutica

No se han encontrado ensayos clínicos controlados y aleatorizados sobre la efectividad de los fármacos tumor-agnósticos larotrectinib y entrectinib en comparación a los quimioterápicos existentes para tratamiento de tumores positivos a fusiones *NTRK*, ni estudios que realicen comparaciones directas entre ambos fármacos y/o con los quimioterápicos. Se han seleccionado 9 estudios de efectividad comparada con diferentes metodologías entre larotrectinib y entrectinib o con los quimioterápicos, 1 revisión sistemática, 3 guías de evaluación de tecnologías de NICE y un documento de consenso.

Uno de los estudios realiza comparaciones indirectas entre los datos de series históricas de pacientes con tumores sólidos en estados avanzados o metastásicos (sin

información sobre la presencia o no de fusiones *NTRK*) sometidos al tratamiento convencional y los datos agregados de los ensayos clínicos de larotrectinib, donde se observa que la ORR del larotrectinib es superior. En otro estudio se utiliza la metodología de comparación indirecta ajustada con emparejamiento entre larotrectinib y entrectinib en pacientes oncológicos con fusiones *NTRK*, encontrando que larotrectinib presenta mejores resultados. Tres estudios son de efectividad comparada intrapaciente, entre los fármacos agnósticos y el tratamiento previo, utilizando el GMI, que permite estudiar el beneficio aportado por el nuevo fármaco en comparación al anterior. Otro estudio utiliza un modelo de supervivencia particional para proyectar la efectividad comparada a largo plazo del larotrectinib frente a entrectinib como tratamientos de segunda línea en pacientes con NSCLC metastásico, encontrando mejores resultados de años de vida y QALYs para el larotrectinib. Otro estudio utiliza un modelo de supervivencia particional, con tres estados de salud mutuamente excluyentes (libre de progresión, progresión y muerte) para comparar la efectividad del larotrectinib vs entrectinib en CCR, SPB y metástasis cerebrales con fusiones *NTRK*, encontrando también mejores resultados para el larotrectinib. Otro estudio de efectividad comparada a largo plazo entre larotrectinib y la terapia estándar en adultos con tumores metastásicos de CDT, CCR y SPB positivos a genes *NTRK* de fusión, utilizando la misma metodología de modelo de supervivencia particional, muestra mejores resultados para el larotrectinib. En otro estudio se realizan comparaciones indirectas ajustadas por emparejamiento, utilizando un *propensity score*, entre entrectinib y crizotinib en pacientes con NSCLC positivos a fusiones *ROS1* y *ALK*, siendo el entrectinib superior.

La revisión sistemática sobre efectividad clínica y evidencia económica de los inhibidores multiquinasa TRK e inhibidores TRK selectivos (entrectinib y larotrectinib), y sobre la calidad de vida de pacientes con tumores positivos a fusiones *NTRK* muestra que los fármacos agnósticos presentaban mejores resultados de efectividad y seguridad.

NICE publica tres guías de evaluación de tecnologías, dos sobre larotrectinib y entrectinib para el tratamiento de tumores sólidos positivos a fusiones *NTRK* y una tercera sobre el entrectinib para el tratamiento de pacientes con NSCLC avanzado positivo a *ROS1*. Se obtiene un ICER de £16,155 por QALY ganado con el larotrectinib en comparación a la práctica clínica. Consideran que no hay suficientes datos para estimar de forma fiable el beneficio del larotrectinib a largo plazo, que no hay evidencia respecto a si la respuesta al larotrectinib es similar en todos los tipos de tumores, que la NGS es necesaria para establecer que paciente es o no candidato a larotrectinib, y que debido a la incertidumbre existente, no es posible recomendar el uso rutinario de larotrectinib. En el segundo informe también concluyen que no se puede recomendar el uso de entrectinib en la práctica rutinaria en el NHS. En

cambio, sí se recomienda el uso de entrectinib en pacientes con NSCLC positivos a fusiones *ROSI*, y especialmente si presentan metástasis cerebrales.

Estudios de evaluación económica

Se han seleccionado 7 estudios de evaluación económica de las pruebas y/o fármacos agnósticos. Un informe elaborado por el SMC para el NHS de Escocia que presenta un análisis de coste-utilidad donde se comparaba el uso de entrectinib con el mejor tratamiento de soporte, utilizando un modelo de supervivencia particionado con tres estados de salud (pre-progresión, progresión y muerte) y se adoptó un horizonte temporal de 30 años. Para el caso base se estimó un ICER de £37,398/QALY. El análisis de sensibilidad de una vía de entrectinib versus BSC fue más sensible a la variación de $\pm 20\%$ en los valores de utilidad de PFS, costes de diagnóstico de la enfermedad y OS.

El estudio de micro-costes incluido en uno de los informes de ETS, estima que la NGS supone un coste de unas 16.000 coronas noruegas por muestra, pero cuando esta prueba se realiza para estudiar varios genes y varias muestras (de *NTRK*, *ROSI*, *RET* y *ALK* en pacientes con NSCLC) los costes se reducen a unas 2.000 coronas por paciente.

De los otros 5 estudios, dos son análisis de micro-costes realizados en Francia; otro es un estudio inglés basado en datos ofrecidos por NICE en el que se estima el número necesario a cribar para identificar pacientes con fusiones *NTRK*; otro es un estudio de coste-efectividad, que estudia los QALYs y el incremento en años de vida del larotrectinib frente al comparador tratamiento estándar (múltiples tipos de tratamientos) realizado en Países Bajos; otro estudio de coste-efectividad para comparar el entrectinib frente al tratamiento estándar en pacientes oncológicos, también realizado en Países Bajos, y donde se incluía el estudio de fusiones *NTRK* en estos pacientes, utilizando un árbol de decisión (para reflejar la fase de diagnóstico) y un modelo de microsimulación (para reflejar el tratamiento) y que llevó a la conclusión de que el entrectinib no era coste-efectivo en comparación la quimioterapia utilizada (podría serlo si se incluyeran los tests genéticos en la práctica habitual).

Conclusiones

La identificación de los biomarcadores tumor-agnósticos de genes de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROSI* y *RET* resulta fundamental dada la posibilidad de acceso a

fármacos dirigidos frente a dichos genes. Las pruebas diagnósticas IHQ, FISH, RT-PCR y NGS permiten detectar fusiones en estos genes. Para la detección de fusiones *NTRK*, la NGS basada en RNA se considera el gold standard. FISH es una prueba de alta Se y Sp para la detección de genes de fusión, como *ALK*, *ROSI* y *RET*. Para *NTRK* se requiere realizar un test FISH para cada gen. La IHQ es una técnica válida y muy empleada por su accesibilidad y facilidad de realización a diferencia de FISH que requiere de experiencia para su realización. La RT-PCR y la biopsia líquida son pruebas no demasiado extendidas en la práctica clínica. La incorporación de paneles NGS en los laboratorios, asociado a un descenso en los costes, podría facilitar que esta tecnología se convirtiera en la prueba de elección para el diagnóstico de fusiones *NTRK* y reordenamientos *ALK*, *ROSI* y *RET*.

Las numerosas propuestas de algoritmos diagnósticos y/o recomendaciones reflejan el elevado interés en este ámbito de la medicina de precisión a la vez que demuestran la falta de un consenso generalizado sobre su mejor utilización.

Son necesarios estudios que incluyan un mayor número de pacientes oncológicos y metodológicamente rigurosos que permitan comparar el rendimiento diagnóstico de las diferentes pruebas en función del tipo de tumor y de los biomarcadores en estudio.

También es necesario estudiar la efectividad de los fármacos escogidos a raíz de los resultados de los tests diagnósticos y su seguridad. Deben analizarse variables de resultado de efectividad terapéutica de interés clínico pero también de interés para las personas tratadas como supervivencia global y calidad de vida. El análisis debe incluir un seguimiento a medio y largo plazo.

Además, son necesarios estudios de evaluación económica que incluyan datos de las pruebas diagnósticas empleadas hasta la evolución de las personas enfermas tras el tratamiento administrado, que se puedan contextualizar a los distintos sistemas sanitarios. Igualmente resultan necesarios estudios sobre aspectos organizativos claves para la implementación de los mejores algoritmos diagnósticos y de los tratamientos más adecuados en el ámbito de la medicina de precisión.

Summary

Introduction

The presence of some molecular alterations that are biological targets for certain drugs has led to a paradigm shift in cancer treatment. The systematic study of the *NTRK*, *ALK*, *ROS1* and *RET* biomarkers has become a challenge for healthcare systems in order to select patients who are candidates for agnostic treatment, which has shown greater effectiveness and clinical safety than conventional treatment.

Objectives

The objective of this report is to review the scientific literature in order to identify the best evidence on the use of IHC, FISH, RT-PCR and NGS techniques for the systematic identification of the *NTRK*, *ALK*, *ROS1* and *RET* gene fusion biomarkers in oncology given its predictive value for a beneficial response to agnostic therapies. The effectiveness of agnostic drugs and their comparative effectiveness between this targeted therapy and standard therapy are also reviewed, in terms of health and safety results for the patient, as well as the economic implications associated with the implementation of these tests in clinical practice.

Methods

A review of reviews from the scientific literature has been carried out in order to synthesize and integrate all the available evidence on the diagnostic validity of the different algorithms, diagnostic proposals and recommendations for the use of the different diagnostic techniques used for the identification of agnostic biomarkers *NTRK*, *ALK*, *ROS1* and *RET*. The studies considered to be included were the following: HTA reports, consensus documents with recommendations from the main scientific societies, expert opinions, clinical practice guidelines, systematic reviews and meta-analyses, proposals for diagnostic algorithms from groups of healthcare professionals and researchers and some narrative reviews; comparative studies between targeted drugs against these biomarkers and studies of economic evaluation related to diagnostic tests and/or agnostic treatments.

The literature search was carried out in Medline, Embase, the Cochrane Library and other sources of information, collecting studies published from 2015, in English or Spanish, and that met certain selection criteria established *a priori*. The main characteristics and results of the selected studies have been presented.

Results

From the initial search, it was possible to find 180 references on the diagnostic tests used to identify fusion biomarkers and 164 on agnostic treatments, in Medline; in EMBASE, 492 and 208, respectively. No Cochrane reviews were located. The second search in Medline found 70 new references on diagnostic tests and 208 on therapies. In total, 742 references on diagnostic tests for biomarkers and 643 on tumor-agnostic treatments were retrieved. 263 duplicates were removed. Nine new references were selected from the manual search from the lists of references of some documents and the search in some web pages.

Diagnostic effectiveness studies

A total of 25 studies on the different diagnostic tests used to identify *NTRK*, *ALK*, *ROS1* and *RET* fusion agnostic biomarkers have been selected.

They have been presented according to the type of study, collecting the main characteristics and results of each of them. Two are HTA reports, to aid decision-making in the Norwegian healthcare system. One of them, on the use of molecular tests for the detection of *NTRK* fusion genes in patients with locally advanced or metastatic solid tumors, based on a systematic review of articles that compared the diagnostic effectiveness of the tests. The other, on the tests used to detect molecular alterations in *ROS1* gene in patients with locally advanced or metastatic NSCLC. In these patients, the lowest cost option to study *ROS1* rearrangements could be to perform IHC screening and then confirm the positive results by FISH or other methods due to the possibility of FP in IHC.

A systematic review of the literature on the prevalence, diagnosis, and treatment of tumors with *NTRK* fusions in the pediatric population. Six studies, based on reviews of the literature or on expert opinion, with proposals for diagnostic algorithms to identify the *NTRK*, *ALK*, *ROS1*, and *RET* fusion genes, together with the main conclusions from these documents. Some of these six studies refer to different tumors with possible *NTRK* fusions, others are focused in the study of *ALK* and

ROS1 rearrangements in lung cancer. Below are three consensus documents prepared by different Spanish scientific societies for the study of *NTRK* fusions in solid tumors, the study of different biomarkers in CRC and in lung cancer.

Afterwards, three documents about the recommendations of the ESMO Translational Research and Precision Medicine working group are presented. One of them, focused on methods for the detection of *NTRK* fusions, other on the detection of *RET* fusions and on the third on the use of NGS in patients with metastatic tumors. Three American guidelines have been selected: the NCCN guide for the diagnosis of *NTRK* fusions in NSCLC, an updated guide of CAP-IASLC-AMP in NSCLC and the ASCO guide on diagnosis of biomarkers in lung cancer.

Finally, seven consensus documents from other scientific societies in other countries (Canada, Japan, Taiwan, Australia, India) referring to the study of predictive biomarkers in different solid tumors and another consensus document from the global sarcoma network are collected.

Therapeutic effectiveness studies

No randomized controlled clinical trials have been found on the effectiveness of the tumor-agnostic drugs larotrectinib and entrectinib compared to the standard treatment of tumors positive to *NTRK* fusions, nor studies that make direct comparisons between both drugs and/or with the standard treatment. Nine effectiveness studies compared with different methodologies between larotrectinib and entrectinib or with standard treatment, 1 systematic review, 3 NICE technology appraisal guidelines and a consensus document have been selected.

One of the studies makes indirect comparisons between data from historical series of patients with advanced or metastatic solid tumors (without information on the presence or absence of *NTRK* fusions) undergoing conventional treatment and aggregated data from clinical trials of larotrectinib, showing a higher ORR of larotrectinib. Another study used a matching-adjusted indirect comparison between larotrectinib and entrectinib in cancer patients with *NTRK* fusions, finding that larotrectinib presented better results. Three intra-patient comparative effectiveness studies, between agnostic drugs and previous treatment, using the GMI, which makes it possible to study the benefit provided by the new drug compared to the previous one. Another study uses a partitioned survival model to project the comparative long-term effectiveness of larotrectinib versus entrectinib as second-line treatments in patients with metastatic NSCLC, finding better outcomes in life years and QALYs for larotrectinib. Another study uses a partitioned survival model, with

three mutually exclusive health states (progression-free, progression, and death) to compare the effectiveness of larotrectinib versus entrectinib in CRC, SPB, and brain metastases with *NTRK* fusions, also finding better results for larotrectinib. Another long-term comparative effectiveness study between larotrectinib and standard therapy in adults with *NTRK* fusion gene-positive DTC, CRC, and SPB metastatic tumors, using the same partitioned survival model methodology, shows better results for larotrectinib. Another study made matching-adjusted indirect comparison, using a propensity score, between entrectinib and crizotinib in patients with NSCLC positive for *ROS1* and *ALK* fusions, and entrectinib shows better results.

The systematic review on the clinical effectiveness and economic evidence of TRK multikinase inhibitors and selective TRK inhibitors (entrectinib and larotrectinib), and on the quality of life of patients with *NTRK* fusion-positive tumors, shows that agnostic drugs had better results of effectiveness and safety.

NICE published three technology appraisal guidances, two on larotrectinib and entrectinib for the treatment of *NTRK* fusion-positive solid tumors and a third on entrectinib for the treatment of patients with *ROS1*-positive advanced NSCLC. There is an ICER of £16,155 per QALY gained with larotrectinib compared to clinical practice. They consider that there are insufficient data to reliably estimate the long-term benefit of larotrectinib, that there is no evidence as to whether the response to larotrectinib is similar in all tumor types, that NGS is necessary to establish that a patient is or not a candidate for larotrectinib, and that due to the existing uncertainty, it is not possible to recommend the routine use of larotrectinib. In the second report they also conclude that the use of entrectinib in routine practice in the NHS cannot be recommended. On the other hand, the use of entrectinib is recommended in patients with NSCLC positive for *ROS1* fusions, and especially if they have brain metastases.

Economic evaluation studies

Seven economic evaluation studies of agnostic tests and/or drugs have been selected. A report produced by the SMC for the NHS Scotland presenting a cost-utility analysis comparing the use of entrectinib with BSC, using a partitioned survival model with three health states (pre-progression, progression and death) and a time horizon of 30 years was adopted. For the base case, an ICER of £37,398/QALY was estimated. One-way sensitivity analysis of entrectinib versus BSC was more sensitive to $\pm 20\%$ variation in PFS utility values, disease diagnostic costs, and OS.

The micro-cost study included in one of the HTA reports estimates that the cost of NGS is around 16,000 NOK per sample, but when this test is performed to study several genes and several samples (*NTRK*, *ROS1*, *RET* and *ALK* in patients with NSCLC) the costs are reduced to about 2,000 NOK per patient.

Of the other 5 studies, two are micro-cost studies carried out in France; another is an English study based on data provided by NICE in which the number needed to screen to identify a patient with *NTRK* fusions is estimated; another is a cost-effectiveness study, which shows the QALYs and the increase in years of life of larotrectinib compared to the comparator standard treatment (multiple types of treatments) carried out in the Netherlands; another cost-effectiveness study to compare entrectinib against standard treatment in cancer patients, also conducted in the Netherlands, and which included the study of *NTRK* fusions in these patients, using a decision tree (to represent the diagnostic phase) and a microsimulation model (to represent the treatment) and which led to the conclusion that entrectinib was not cost-effective compared to standard treatment (it could be if genetic tests were included in routine practice).

Conclusions

The identification of tumor-agnostic biomarkers of *NTRK*, *ALK*, *ROS1* and *RET* fusion genes is essential given the possibility of access to drugs directed against these genes. Diagnostic tests IHC, FISH, RT-PCR and NGS can detect fusions in these genes. For the detection of *NTRK* fusions, RNA-based NGS is considered the gold standard. FISH is a high Se and Sp test for the detection of fusion genes, such as *ALK*, *ROS1* and *RET*. For *NTRK*, a FISH test is required for each gene. IHC is a valid and widely used technique due to its accessibility and ease of performance, unlike FISH, which requires experience to perform. RT-PCR and liquid biopsy are tests that are not very widespread in clinical practice. The progressive incorporation of NGS panels in laboratories, associated with a decrease in costs, could facilitate this technology becoming the test of choice for the diagnosis of *NTRK* fusions and *ALK*, *ROS1* and *RET* rearrangements.

The numerous proposals for diagnostic algorithms and/or recommendations reflect the high interest in this field of precision medicine while demonstrating the lack of a general consensus on its best use.

New studies that include a larger number of cancer patients and methodologically rigorous are needed to compare the diagnostic performance of the different tests depending on the type of tumor and the biomarkers under study.

It is also necessary to study the effectiveness of the drugs chosen based on the results of the diagnostic tests and their safety. It is important to include outcome variables of clinical interest but also of interest to patients, such as overall survival and quality of life. The analysis should include a medium and long-term follow-up.

In addition, economic evaluation studies are necessary, with data from the diagnostic tests until the evolution of the patient after treatment. It is necessary that these results can be contextualized to the different health systems. Studies are also necessary on key organizational aspects for the implementation of the best diagnostic algorithms and the most appropriate treatments in the field of precision medicine.

1. Introducción

1.1. Medicina de precisión

En los últimos años se ha podido comprobar que determinadas alteraciones moleculares del genoma son las responsables del origen y desarrollo de la mayor parte de los procesos oncológicos, pero, además, se ha constatado que algunas de esas alteraciones moleculares sirven de diana terapéutica sobre la que actúan los denominados fármacos dirigidos.

Este nuevo concepto sobre los mecanismos de inicio y evolución tumorales ha conducido a un cambio fundamental en el tratamiento oncológico, de modo que del anterior enfoque centrado en el órgano afectado y en el tipo histológico del tumor, se ha ido pasando a otra forma de abordaje centrada en los marcadores moleculares presentes en el tumor, facilitando el auge de la denominada **medicina de precisión** (1).

De acuerdo a la definición del *National Cancer Institute*, la medicina de precisión es aquella «forma de medicina que utiliza información sobre los genes, las proteínas y el entorno de cada paciente para prevenir, diagnosticar y tratar una enfermedad». La **ESMO** (*European Society of Medical Oncology*) también quiso respaldar el desarrollo y evolución de la medicina de precisión, reconociendo las implicaciones que este cambio de paradigma en el diagnóstico y tratamiento oncológico iba a suponer, tal como manifestó a través de una publicación en 2014 (2).

El fundamento de la medicina de precisión es poder diseñar el tratamiento médico más ajustado a las características de cada paciente de modo que estos se clasifiquen en subpoblaciones que difieren en la susceptibilidad a una enfermedad concreta y su respuesta a un tratamiento específico. En concreto, en pacientes con cáncer, el término medicina de precisión se suele referir a la utilización de fármacos en un grupo de pacientes con alteraciones moleculares específicas, generalmente cambios genómicos o alteraciones en la expresión proteica. En este entorno resulta clave la identificación de los denominados biomarcadores asociados a los tumores. También en la medicina de precisión resulta clave cualquier parámetro medioambiental o de estilo de vida que lleve a diseñar o modificar el tratamiento (3). Por tanto, el proceso de integrar los datos clínicos, anatomopatológicos y moleculares con el fin de seleccionar el tratamiento óptimo o más adaptado al perfil biológico del tumor constituye la medicina de precisión (4-6).

Además, recientemente se ha observado que algunas de estas alteraciones genéticas se pueden detectar en varios tipos tumorales de diferente histología y localización, y se han desarrollado fármacos que van dirigidos a dichas alteraciones por lo que estos distintos tumores podrían tratarse con el mismo fármaco específico. De este modo ha surgido el nuevo concepto de **tratamientos tumor-agnósticos, trans-versales o independientes del tipo tumoral**, que han supuesto un gran avance en la investigación y en el abordaje oncológico pues están desarrollados para actuar en función de una alteración molecular concreta con independencia del órgano de origen del tumor primario.

Por ello, el manejo del paciente oncológico ha pasado de estar basado en un modelo histológico a apoyarse, fundamentalmente, en un modelo mutacional que depende del perfil genético del tumor.

La medicina de precisión o personalizada permite al profesional planificar las estrategias de un modo individualizado. Con ello se pretende aportar al paciente los mejores resultados clínicos posibles, seleccionando de manera adecuada a aquellos pacientes con determinadas alteraciones moleculares tumorales que pueden responder al tratamiento, y evitando la administración de ciertos tratamientos que no van a ser efectivos y que, por el contrario, pueden ocasionar graves efectos adversos o retrasos en la instauración de otra terapia que sí pueda ser efectiva (7,8). Por otro lado, en el aspecto económico, la personalización del tratamiento permitiría una optimización de los costes asociada a unos tiempos menores de hospitalización y al hecho de evitar un gasto innecesario por no administrar tratamientos a determinadas personas no respondedoras, contribuyendo así a la sostenibilidad de los sistemas sanitarios, siempre que se haga un uso correcto de los recursos, pues el estudio molecular se realizaría sobre un elevado número de pacientes, pero sólo un número limitado se beneficiaría del tratamiento.

La llegada de nuevas terapias de gran efectividad pero sólo efectivas en pacientes con determinadas alteraciones genéticas, viene acompañada de la necesidad de encontrar **estrategias diagnósticas** para identificar a aquellos pacientes que se pueden beneficiar de estos tratamientos según sus características específicas fisiológicas y genéticas, y que puedan ser finalmente implementadas en los hospitales para conseguir el tratamiento óptimo de dichos pacientes. La implementación de técnicas diagnósticas requiere un proceso de aprendizaje de los profesionales y un uso adecuado de recursos (9).

En este contexto resulta esencial identificar la presencia de biomarcadores tumorales. Es posible diferenciar hasta cuatro tipos de biomarcadores: de predisposición (los que sugieren la probabilidad de desarrollar un tumor), los diagnósticos (permiten confirmar la enfermedad), los pronósticos (informan sobre cómo

puede ser la evolución del tumor en un paciente concreto) y los predictivos (informan sobre la posibilidad de respuesta o no a un determinado fármaco o los los predictivos de resistencia a un fármaco y los predictivos de efectos adversos) (10). Es fundamental, por ello, que estos biomarcadores puedan ser detectados con gran exactitud por las técnicas diagnósticas (11).

El objetivo de la medicina de precisión es que, a partir del **estudio del perfil molecular** tumoral en un paciente concreto, se pueda establecer el tratamiento dirigido más apropiado, el más específico y que ocasione menos efectos secundarios. El desarrollo de las técnicas de diagnóstico molecular, especialmente de la secuenciación de nueva generación (NGS), ha permitido detectar nuevas alteraciones genéticas asociadas al origen de ciertos tumores lo que ha contribuido al avance de la medicina de precisión.

Algunos biomarcadores se presentan como eventos raros o muy raros en determinados tumores. Se acepta como alteración molecular rara aquella que se da en menos del 5% de los pacientes. Entre estas alteraciones están los reordenamientos *ALK* y *ROSI*, presentes en un 3-5% y 1-2% de tumores pulmonares, respectivamente, e incluso en porcentajes inferiores en otros tumores. También las fusiones de genes *NTRK* y reordenamientos *RET* presentan una incidencia muy baja en los tumores más frecuentes.

La identificación de estos biomarcadores predictivos de buena respuesta a determinados tratamientos dirigidos se ha convertido en un reto para los sistemas de salud. Ante esta situación, se plantean dos posibilidades, en general. Una sería realizar *screening* con pruebas que puedan ser factibles a gran escala, como la inmunohistoquímica (IHQ), y sólo en casos positivos utilizar otras técnicas de confirmación; otra, utilizar la secuenciación masiva paralela para todos los tumores por su gran capacidad diagnóstica (12). La reducción de costes de los estudios de secuenciación masiva y su progresiva implantación en los diferentes centros sanitarios hace que esta técnica se esté convirtiendo en la prueba de elección, como ya lo es en el cáncer avanzado de pulmón.

1.2. Biomarcadores tumor-agnósticos de fusión

Los **biomarcadores agnósticos** con terapias aprobadas o en desarrollo (en fase de ensayo clínico avanzado) constituyen el nuevo paradigma en oncología y son la máxima expresión de la oncología personalizada de precisión, en la que el tratamiento está guiado por las alteraciones moleculares y no por el tipo histológico o localización del tumor.

Como define la ESMO, un biomarcador es «una característica que es medida o evaluada de forma objetiva como un indicador de un proceso biológico normal o de un proceso patológico o de respuesta a una intervención terapéutica».

Algunos biomarcadores se forman por reordenamiento de genes, y algunos de estos reordenamientos generan los llamados genes de fusión. Las fusiones de genes son uno de los tres tipos principales de alteraciones genéticas en procesos tumorales y son responsables de una gran variedad de tumores. Los más estudiados son los genes de fusión *ALK*, *RET*, *ROS1* y *NTRK*.

Los genes de fusión están ocasionados por roturas del gen y creación de nuevas moléculas oncogénicas, y resultan en una expresión genética o una activación constitutiva de la vía. Algunas de estas alteraciones genéticas pueden tener un impacto significativo en el tratamiento de algunos tumores porque han mostrado susceptibilidad a algún fármaco específico. Son las alteraciones moleculares accionables o intervenibles. A medida que se van conociendo nuevas alteraciones intervenibles, se van desarrollando fármacos dirigidos frente a ellas, por lo que se hace necesario disponer de tecnologías capaces de detectar dichas alteraciones de forma rápida y económica con el fin de incorporarlas a la práctica clínica y que formen parte del diagnóstico rutinario. La importancia de identificar la presencia de estos biomarcadores de fusión en el proceso tumoral de un paciente radica en la posibilidad de utilizar determinados fármacos tumor-agnósticos de mayor efectividad y seguridad clínica que el tratamiento convencional.

1.2.1. Fusiones del gen *NTRK*

El gen *NTRK* (receptor de tirosina quinasa neurotrófico, neurotrophic tyrosine receptor kinase) incluye tres genes, *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3*, localizados en los cromosomas 1, 9 y 15, respectivamente. Estos genes codifican las proteínas del receptor quinasa de la tropomiosina (*tropomyosin receptor kinase*, Trk), que incluyen tres proteínas de membrana (TrkA, TrkB y TrkC). Estas proteínas son receptores involucrados en la regulación del crecimiento, diferenciación y apoptosis de las neuronas del sistema nervioso central y periférico por lo que se expresan en gran cantidad en el sistema nervioso, pero también en algunos tejidos no neuronales, como los sistemas cardiovascular, endocrino, reproductor e inmunológico.

Cada receptor está formado por un dominio extracelular (a través del cual se unen a un ligando), una región transmembrana y un dominio quinasa (*ATP-binding*) intracelular, con actividad de tirosina quinasa. Cuando el ligando neurotrofina (NTF) se une al dominio extracelular del receptor, se activan la oligomerización de los

receptores y la fosforilación de residuos de tirosina específicos en el dominio quinasa intracitoplasmático, y como consecuencia de ello se genera una cascada intracelular de señales que conducen a la activación de la PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B*) y MAPK (vía de la proteína quinasa activada por mitógenos, *mitogen-activated protein kinase*) que, a su vez, inducen la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células neuronales normales y neoplásicas (13,14).

Las NTF son específicas para cada receptor. Así, el factor de crecimiento neuronal (NGF, *nerve growth factor*) activa la proteína TrkA; el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) y la NTF 4/5 activan la TrkB; y la NTF-3 activa la TrkC (15). La unión de NGF a TrkA y de BDNF a TrkB llevan a la activación de las vías MAPK/RAS/ERK, PLC- γ (fosfolipasa C-gamma) y PI3K con la consiguiente proliferación y crecimiento celular, diferenciación y supervivencia neuronal; y la unión de NTF-3 a TrkC activa la vía PI3K/AKT lo que impide la apoptosis e incrementa la supervivencia celular.

Las fusiones de genes *NTRK* consisten en la rotura de una sección de un cromosoma que contiene el gen *NTRK* y su posterior unión a otro gen en otro cromosoma. Todos los genes de fusión *NTRK* identificados implican la unión de la región 3' de uno de los genes *NTRK* (que contiene el dominio quinasa) con la región 5' (N-terminal) de otro gen diferente (el par de fusión), mediante reordenamiento intra o intercromosómico. El oncogén de fusión quimérico codifica una proteína que contiene el N-terminal del par de fusión unido al C-terminal de la proteína Trk (donde se encuentra el dominio tirosina quinasa). El transcrito de fusión codifica las proteínas Trk de fusión, en las que el dominio tirosina quinasa está siempre presente, mientras que el dominio transmembrana sólo está presente en determinados tipos de fusiones. Estas proteínas de fusión resultantes son proteínas quiméricas oncogénicas u oncoproteínas, constitutivamente activas, con capacidad para iniciar y perpetuar la activación continuada ligando-independiente de las vías de señalización en cascada «downstream» PI3K/AKT y MAPK.

La mayoría de las fusiones se dan en los genes *NTRK1* y *NTRK3*, salvo en los tumores cerebrales primarios en los que la fusión más frecuente es en *NTRK2*. Cada gen *NTRK* se puede fusionar con diferentes genes. La fusión más frecuente (>75%) es la *ETV6-NTRK3*, que consiste en una translocación t(12;15)(p13;q25) (16). Otras fusiones frecuentes son la *LMNA-NTRK1* y *EML4-NTRK3*, pero se han descrito numerosos pares de fusión (17).

Las fusiones que afectan al gen *NTRK* se encuentran entre las primeras translocaciones de genes descritas en cáncer. Su presencia indicaría que esta alteración genética está en el origen del proceso tumoral, ya que es mutuamente excluyente de otros iniciadores oncogénicos, tal como se ha confirmado en los estudios Voyager-1 y

Voyager-2 de bases de datos de evidencia del mundo-real (RWE) (18,19), así como en otros trabajos con tumores de mama y carcinoma colorrectal CCR (17).

Se considera un biomarcador oncológico de referencia pues está presente en una gran variedad de tumores sólidos y hematológicos, tanto en pacientes adultos como pediátricos, aunque con una frecuencia considerablemente variable entre unos y otros. La revisión sistemática y meta-análisis realizados por Forsythe y cols (20) analizó la literatura publicada entre enero de 1987 y enero de 2020, incluyendo 101 tipos histológicos y 222 estudios. Este estudio permitió constatar la presencia de fusiones de *NTRK* recurrentes o casi constantes en ciertos tumores poco frecuentes, mientras que en tumores de gran prevalencia, su presencia es muy escasa. Los resultados de incidencia global y prevalencia global a 5 años de fusiones *NTRK* en tumores sólidos fueron 0,52 y 1,52 por 100.000 habitantes en 2018, respectivamente, que están por debajo del umbral establecido para definir una enfermedad ultra-rara. En la [Tabla 1](#) se muestran los resultados de prevalencia para algunos tumores de este estudio.

Tabla 1. Frecuencia de fusiones *NTRK* en algunos tumores

Tumor	Frecuencia de fusiones <i>NTRK</i>	IC 95% de la frecuencia de fusiones <i>NTRK</i>
Carcinoma secretor de mama	92,9%	72,6-100
Carcinoma secretor análogo de mama de glándula salival (MASC)	79,7%	62,8-96,5
Fibrosarcoma infantil	90,6%	67,4-100
Nefroma mesoblástico congénito	21,5%	13,1-32,2
Glioma de alto grado	21,2%	8,98-38,91
CCR	0,26%	0,15-0,36
Cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC)	0,17%	0,09-0,25
Carcinoma de mama invasivo	0,10%	0,03-0,18

En tumores poco frecuentes como el fibrosarcoma infantil, el carcinoma secretor de mama y el MASC, la incidencia de las fusiones *NTRK* es muy elevada. El fibrosarcoma infantil es el sarcoma de partes blandas (SPB) más frecuente en niños y niñas menores de 1 año, y presenta fusiones *ETV6-NTRK3* en más del 85% de casos mientras que en el porcentaje restante son muy frecuentes otras fusiones *NTRK3* y *NTRK1*. Lo mismo ocurre en el nefroma mesoblástico congénito celular, donde las fusiones *ETV6-NTRK* se presentan en la mayoría de pacientes, aunque también se han descrito otras fusiones *NTRK3*. En más del 90% de los carcinomas secretores

de mama y MASC también presentan fusiones *ETV6-NTRK* (21). La prevalencia del cáncer de tiroides infantil está en torno al 4%, siendo más de un 90% carcinomas papilares de tiroides (CPT) y un 26% de estos CPT presentan fusiones *NTRK* (*NTRK1* y *NTRK3*), especialmente en aquellos tumores inducidos por radiaciones y, en general, muestran un peor pronóstico.

En sarcomas y gliomas infantiles, la frecuencia de fusiones *NTRK* es <5%, mientras que se ha estimado una prevalencia intermedia de 5-25% en el CPT, melanomas spitzoides y tumores del estroma gastrointestinal (GIST) en personas adultas (14,22,23). En cambio, en tumores muy prevalentes como los de pulmón, CCR, cáncer de páncreas, colangiocarcinoma, melanoma, gliomas y sarcomas de adultos, su frecuencia estaría por debajo del 1%.

Westphalen y cols (17) analizaron una gran base de datos de FoundationCORE con más de 295.000 pacientes con cáncer e informaron de un 0,3% de casos positivos a fusiones *NTRK* en 45 tipos diferentes de tumores y en un total de 134 subtipos histológicos distintos. La prevalencia en pacientes de edad adulta fue de 0,28% y en pacientes pediátricos de 1,34%, en general, y de 2,28% en pacientes menores de 5 años. La fusión más frecuente fue *ETV6-NTRK3*, tanto en personas adultas como pediátricas (26,4% y 32,7%, respectivamente). En los NSCLC, no se encontró relación entre la carga tumoral mutacional (TMB) y la presencia o no de fusiones *NTRK*, mientras que en los pacientes con CCR, aquellos con fusiones *NTRK* sí presentaban una mayor TMB y una alta inestabilidad de microsatélites (MSI). Otro resultado interesante que ofreció este estudio fue que la edad de pacientes con NSCLC y fusiones *NTRK* era significativamente menor que la de pacientes con reordenamientos *ALK* o *ROSI* (39 años, frente a 54 y 56, respectivamente).

La importancia de la presencia de fusiones *NTRK* en procesos tumorales radica en que codifican proteínas susceptibles al tratamiento con inhibidores de quinasas, con los que se han demostrado tasas de respuesta de la enfermedad mayores y más duraderas, independientemente de la edad del paciente, el tipo tumoral y la pareja de fusión de los genes *NTRK* (14). Sumado a su papel como predictivo de respuesta a estos fármacos, se reconoce también el valor pronóstico de las fusiones *NTRK*, pues la sobreexpresión de TrkA y TrkC indicaría una evolución favorable en neuroblastomas, mientras que la sobreexpresión de TrkB, que se presenta principalmente en neuroblastomas con amplificación de *MYCN*, suele indicar un peor pronóstico (9). Por este motivo, y a pesar de que estos genes de fusión *NTRK* son poco frecuentes, su detección en la práctica clínica resulta de gran importancia al permitir la selección de aquellos pacientes que se beneficiarían de este tratamiento dirigido y por ello constituyen uno de los principales objetivos sobre los que trabajar en la terapia personalizada (24).

1.2.2. Reordenamientos *ALK*

El gen *ALK* (*anaplastic lymphoma quinasa*, quinasa del linfoma anaplásico) está situado en 2p23.1 en el brazo corto del cromosoma 2. *ALK* codifica una proteína transmembrana que es un receptor tirosina quinasa miembro de la superfamilia de los receptores insulín-like, que normalmente se expresan en intestino delgado, testículo y cerebro.

Entre los reordenamientos *ALK*, un 95% de los casos se produce por la rotura de los genes *ALK* y *EML4* (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) y su posterior fusión en dirección opuesta: inversión intracromosómica en el brazo corto del cromosoma 2 [Inv (2)(p21p23)], de modo que la terminación 5' del *EML4* queda junto a la terminación 3' del *ALK*. El resultado final es el oncogén de fusión *EML4-ALK* que inhibe la apoptosis y favorece la proliferación celular tumoral. La translocación *ALK* determina la expresión de la proteína de fusión resultante, que activa al dominio intracelular independiente de ligando (tras la unión del ligando, *ALK* se dimeriza, se fosforila y se activa la proteína tirosina quinasa) y así activa múltiples vías de señalización aberrante de *ALK*, como las vías PI3K/AKT, RAS/RAF/MAPK y JAK/STAT3, responsables de la transformación, proliferación y supervivencia de las células tumorales.

Las fusiones *ALK* se pueden detectar en distintos tipos de tumores como el cáncer de mama, CCR y de pulmón. En torno al 4-8% de los NSCLC presenta reordenamientos *ALK* (25,26) y se estima una prevalencia global de las variantes 1-3 del gen de fusión *EML4-ALK* cercana al 82% (IC 95%: 76,68-86,99%) (27). Otros reordenamientos *ALK* se producen con otros pares de fusión, como *NPM1*, *TPM4*, *KIF5B*, *TFG* o *KLC1*, entre otros. Generalmente, la presencia de reordenamientos *ALK* suele ser excluyente de mutaciones *EGFR* o *KRAS*.

Pacientes con tumores NSCLC *ALK* positivos presentan con mayor frecuencia ciertas características: suelen ser pacientes más jóvenes (mediana de 52 años) que la media de pacientes con cáncer de pulmón, no fumadores o de bajo consumo tabáquico y con predominio del tipo histológico de adenocarcinoma (28,29). Muchos progresan desarrollando metástasis cerebrales. De hecho, se estima que en el momento del diagnóstico, un 30% de pacientes con tumores asociados a reordenamientos *ALK* presenta metástasis en el sistema nervioso central (SNC).

Aunque el número de pacientes portadores con NSCLC de estas alteraciones es bajo, su correcta identificación resulta muy importante ya que el tratamiento con inhibidores tirosina quinasa (TKIs) se ha asociado a unos buenos resultados terapéuticos (30,31). La mayoría de las guías recomienda que pacientes con adenocarcinoma

de pulmón sean estudiados para determinar si presentan reordenamientos *ALK* y se aconseja realizar este estudio antes de iniciar el tratamiento de primera línea (32).

1.2.3. Fusiones del *gen ROS1*

El gen *ROS1* (*ROS proto-oncogene 1*) se localiza en el brazo largo del cromosoma 6 (6q22.1). Este gen codifica una proteína que es miembro de la familia de los receptores de insulina que controlan el ciclo celular y la proliferación celular a través de las vías STAT3 y PI3K/AKT/mTOR.

Cuando se presentan fusiones *ROS1*, se produce la activación constitutiva de la tirosina quinasa que tiene un efecto oncogénico. Durante el reordenamiento, el fragmento 3' del gen se puede unir a diferentes pares (*CD74*, *EZR*, *CCDC6*, *TPM3*, *SDC4*, *SLC34A2*, etc) siendo la alteración *CD74-ROS1* la más frecuentemente detectada. La presencia de estas alteraciones en *ROS1* suele ser excluyente de mutaciones *EGFR*, *ALK* o *KRAS* (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), por ello, se recomienda el estudio de todas estas alteraciones en el momento del diagnóstico (33).

Las fusiones *ROS1* se han identificado en un 0,2-2,4% de los CCR y en un 1-2% de los NSCLC. De igual manera que los reordenamientos *ALK*, la aparición de los genes de fusión *ROS1* en NSCLC se da con mayor frecuencia en pacientes más jóvenes, mujeres y no fumadores o en fumadores leves y en adenocarcinomas (29,34). Alrededor de un 20-30% de pacientes con NSCLC positivos a *ROS1* presenta metástasis cerebrales en el momento del diagnóstico (35). Además, en un 40% de estas personas enfermas se han descrito eventos tromboembólicos (36).

Para que las personas sean candidatas a terapia dirigida es necesario confirmar que son positivas a este reordenamiento *ROS1*. Se recomienda que en pacientes con NSCLC no-escamoso avanzado se realicen estudios para identificar reordenamientos *ROS1*, independientemente de sus características clínicas de cara de tomar la decisión terapéutica (13,29). De igual modo, resulta importante conocer si la persona a tratar no presenta estas alteraciones moleculares para evitar someterles a un tratamiento ineficiente y costoso.

1.2.4. Reordenamientos *RET*

El gen *RET* (*rearranged during transfection*) juega un papel importante en el desarrollo de los riñones y del sistema nervioso. *RET* está localizado en el brazo largo del cromosoma 10 (10q11.21) y codifica un receptor tirosina quinasa con un dominio extracelular, otro dominio transmembrana y el dominio tirosina quinasa intracelular. La fosforilación de los residuos de tirosina intracelular conduce a la activación del receptor *RET*, lo que activa varias vías descendentes como la RAS-MAPK, PI3K-AKT, JAK-STAT implicadas en la proliferación y supervivencia celular.

Algunas alteraciones genéticas, como los **reordenamientos *RET***, se han identificado en el crecimiento y proliferación de varios tumores, especialmente el CPT y el NSCLC (37). Los reordenamientos *RET* implican la secuencia 3' de *RET*, que codifica el dominio quinasa, y la secuencia 5' del otro gen, del par de fusión. Un 10-20% de los CPT presenta fusiones *RET*, especialmente los carcinomas inducidos por radiación, siendo los reordenamientos más frecuentes los *CCDC6-RET* y *NCOA4-RET*. El 1-3% de los NSCLC están asociados a reordenamientos *RET* (38,39), lo que supone más de 37.000 pacientes al año, según estimaciones de la OMS (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>), siendo más frecuente en adenocarcinomas y en pacientes con determinadas características clínicas como ser no fumadores o con una historia de mínima exposición al tabaco y ser relativamente jóvenes (≤ 60 años) (29,37). Desde que en 2012 se descubriera la presencia de reordenamientos *RET* en NSCLC, se han identificado numerosos tipos diferentes de fusiones aunque la más frecuente se produce entre el intrón 11 del gen *RET* y el intrón 15 del gen *KIF5B* (40). La presencia de fusiones *RET* suele ser excluyente de alteraciones en otros genes como *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ERBB2* o *BRAF* (41).

También se han descrito reordenamientos *RET* en otros tumores como tumores spitzoides, colangiocarcinomas, CCR, cáncer de ovario, páncreas y glándulas salivares, en una frecuencia muy baja ($<1\%$), mientras que las **mutaciones *RET*** se han descrito en el carcinoma medular de tiroides (CMT) y en el síndrome de neoplasia endocrina múltiple tipo 2 (MEN 2) (38,42-44).

1.3. Técnicas diagnósticas

Ante la evidencia del beneficio clínico de varios TKIs, tanto selectivos como multiquinasa, con una alta efectividad terapéutica y un buen perfil de tolerabilidad y

seguridad, ha surgido la necesidad de establecer posibles aproximaciones diagnósticas para identificar pacientes oncológicos con fusiones *NTRK*, *ALK*, *RET* y ROS-1.

Las principales técnicas diagnósticas de laboratorio propuestas para identificar estos biomarcadores agnósticos son la IHQ, la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR) y la NGS de DNA o RNA.

1.3.1. IHQ

Engloba varias técnicas que mediante el uso de anticuerpos específicos marcados con una etiqueta colorimétrica, contribuye a identificar la expresión de determinados antígenos (proteínas), a diferencia de la FISH y RT-PCR que detectan fusiones a nivel de DNA y RNA.

En el caso de tumores con **fusiones *NTRK***, el estudio IHQ permite detectar la sobreexpresión de Trk, que puede considerarse un marcador subrogado de presencia de genes *NTRK* de fusión. La IHQ utiliza anticuerpos frente las proteínas específicas TrkA o TrkC o frente a cualquiera de las tres proteínas con un único anticuerpo pan-Trk (el más utilizado es EPR17341, anticuerpo monoclonal pan-Trk aprobado para uso diagnóstico *in vitro*, de Ventana Medical Systems) (45). Dado que en la mayoría de los tejidos adultos normales la presencia de las proteínas TrkA/B/C es muy escasa, esta técnica IHC resulta muy sensible para detectar fusiones *NTRK* (46-48).

Es imprescindible contar con controles internos para evitar los FP que, generalmente, se asocian a fusiones *NTRK3* (49,50). Los tejidos adultos normales testicular, de ganglios submucosos de colon y el tejido nervioso, sí expresan de forma normal proteínas Trk, por lo que se deben utilizar como controles tisulares positivos, siendo el apéndice el control positivo más utilizado (16). La positividad de las estructuras neurales de la pared del apéndice asegura un buen funcionamiento de la fase analítica de la IHQ.

Resulta necesario que la muestra esté adecuadamente fijada para evitar heterogeneidad en la tinción. Los casos IHQ positivos muestran una positividad difusa en los tejidos neoplásicos, aunque el grado de tinción pueda ser variable. Algunos estudios proponen que los tumores con al menos un 1% de células neoplásicas positivas (tinción positiva respecto al fondo) deben considerarse positivos en el estudio IHQ (51), aunque lo más frecuente es que más del 50% de las células tumorales presente tinción con una intensidad $\geq 2+$, en una escala de 0 a 3+ (negativa,

débil, moderada y fuerte). Existen diferentes patrones de tinción subcelular: citoplasmática, membranosa, nuclear y perinuclear. La positividad nuclear se ha descrito en más del 50% de pacientes con fusión *ETV6-NTRK3* (46), pues la proteína codificada por *ETV6* se localiza en el núcleo celular. Por el contrario, los tumores que presentan fusiones *LMNA-NTRK1* suelen mostrar una tinción citoplasmática difusa y más fuerte que la observada en fusiones *NTRK3*.

La IHC es un método coste-efectivo, seguro, con un tiempo de respuesta (TAT) rápido de 1-2 días, requiere de una cantidad pequeña de material, y puede ser efectiva, incluso, en muestras de calidad no óptima (a diferencia de RT-PCR y NGS donde una calidad adecuada es imprescindible). Además, la IHQ se encuentra disponible en la mayor parte de los laboratorios por ser fácil de implementar y validar, y presenta un coste relativamente bajo en comparación a los tests moleculares. Puede realizarse sobre muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE). Por todas estas ventajas, se acepta como técnica de *screening* inicial para la detección de fusiones *NTRK* (52). Dado que mide la expresión de las proteínas Trk, cuando el resultado de la IHQ es negativo, se puede descartar la presencia de fusiones *NTRK*, mientras que en casos de resultado positivo, se debería realizar una prueba confirmatoria (generalmente, una técnica molecular). Como la IHQ se considera un método de *screening*, es muy importante que presente una alta sensibilidad puesto que ante un paciente con un resultado de IHQ negativo es improbable que se vuelva a testar para fusiones *NTRK* (16).

Se ha informado de una sensibilidad (Se) de 87,9% y especificidad (Sp) de 81,1% (16), aunque en otros estudios la IHQ alcanzaba valores superiores, Se de 95-97% y Sp de 98-100%, valor predictivo positivo (VPP) de 97% y valor predictivo negativo (VPN) de 98% (23). En el estudio de Solomon y cols (53), con casi 34.000 pacientes, la Se de la pan-Trk IHQ fue del 96,9% y la Sp del 81,1%.

Con IHQ es posible detectar las tres fusiones del gen *NTRK*, pero no es posible identificar el par de fusión. Otra desventaja de esta técnica es que la interpretación de los resultados puede ser subjetiva y complicada en tejidos que expresan de forma fisiológica las proteínas Trk (presentarían una tinción de fondo), por ello, en estos casos su especificidad se reduce (aumentan los falsos positivos, FP), por ejemplo, en tumores del sistema nervioso, tumores neuroendocrinos, sarcomas o GIST (45,53). Para estos tumores, sería más aconsejable utilizar técnicas moleculares en lugar de la IHQ.

Otros posibles errores son los falsos negativos (FN) se refieren a la identificación de fusiones *NTRK3* donde se muestra una tinción mucho más débil que si son fusiones *NTRK1/2* (46). Así, se ha informado de una Se para detectar fusiones *NTRK1* y *NTRK2* del 96% y 100%, respectivamente, mientras que para *NTRK3* los

valores oscilaban entre 54,5% a 79% según algunos estudios (51-53). También en sarcomas la Se resultó menor (en torno al 80%), probablemente relacionado con una sobre-representación de fusiones *ETV6-NTRK3* cuyo patrón de tinción nuclear puede ser muy heterogéneo.

También tiene como desventaja que la IHC detecta la expresión tanto de la proteína nativa (*wildtype*) como de la proteína de fusión, pero no permite diferenciarlas, por lo que la expresión de los receptores no es diagnóstica de genes de fusión *NTRK1/2/3*, sino que su detección sólo sugiere que es probable que exista dicha fusión (49). Otro inconveniente es que el número de antígenos por análisis es limitado.

Para identificar **reordenamientos *ALK***, el único test IHQ aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) como *companion diagnostic* (CDx) para los inhibidores *ALK* crizotinib, ceritinib, alectinib y lorlatinib es el test Ventana *ALK* (D5F3) CDx Assay (Ventana Medical Systems, Inc.) (54,55). Ver [Tabla 6](#) de Anexo II. Otro anticuerpo de similar Se y Sp es 5A4 (56). La IHQ permite detectar los niveles de proteína *ALK*, que se considera un marcador subrogado muy efectivo de reordenamientos *ALK*.

En general, la cantidad de proteína producida por los NSCLC positivos a reordenamientos *ALK* es muy inferior a la de otros tumores, por eso, para su detección mediante IHQ se deben utilizar anticuerpos de alta afinidad y en ocasiones se ha propuesto utilizar amplificadores de señal aunque esto se suele desaconsejar porque interfiere en la intensidad de señal, que es un criterio para realizar el diagnóstico, e incluso puede invalidar la clasificación de la intensidad. Se recomienda un mínimo de 10 muestras positivas para validación técnica (57).

La IHQ podría emplearse como test de *screening* por sus ventajas (rápido, relativamente sencillo, de bajo coste) para identificar posibles casos positivos pero después se requiere confirmación por otra prueba, generalmente, por FISH. Algunos tumores positivos con IHQ han dado resultado negativo con FISH y esto puede deberse a diferentes motivos como la dificultad de interpretación de casos FISH cercanos al nivel de positividad, la presencia de reordenamientos complejos que dificultan la interpretación de FISH llevando a FN de FISH, la amplificación del gen *ALK* que suele presentar una baja intensidad de tinción, posibles FP de la IHQ por errores en su interpretación o bien por alteraciones genéticas que lleven a una sobreexpresión de la proteína pero que no esté asociada a reordenamiento *ALK* (25).

La IHQ como técnica de *screening* para identificar **reordenamientos *ROS1***, presenta unos resultados de Se similares a FISH o RT-PCR, pero su Sp es menor dependiendo de los criterios de positividad utilizados (58,59). Hasta el momento,

no existen tests IHQ aprobados por la FDA, pero sí hay dos anticuerpos disponibles en el mercado (D4D6 y SP384). Se han propuesto diferentes criterios de interpretación de la IHQ: de 0 a 3 según la intensidad de tinción o por diferentes puntos de corte, considerando que un resultado es positivo si presenta intensidad moderada/fuerte si 2+/3+ o si el H-score es >100 o >150. Cada laboratorio debe validar su propio rango de valores interpretativos pues todavía no hay unos valores estandarizados. Para *ROSI* no existe un tejido normal que se pueda utilizar como adecuado control positivo, sino que se recomienda utilizar tejido tumoral positivo a *ROSI*. La tinción en estos casos *ROSI* positivos suele ser citoplasmática aunque se han descrito diferentes patrones de tinción (25). Por su variable especificidad, se aconseja que ante un resultado positivo o dudoso, se aplique una prueba confirmatoria, bien pruebas citogenéticas como FISH o moleculares como RT-PCR o NGS.

A diferencia de los reordenamientos en los genes *ALK* y *ROSI*, las **fusiones *RET*** no se pueden identificar de forma correcta mediante IHC (60).

1.3.2. FISH

Se trata de una técnica de citogenética molecular que detecta alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales en locus específicos de protooncogenes o genes supresores de tumores.

La FISH se basa en el uso de sondas de DNA o RNA marcadas de forma fluorescente que se unen a secuencias complementarias en muestras tumorales FFPE. En general, pueden distinguirse varios tipos de sondas: las **sondas centroméricas**, las **teloméricas**, las **sondas de cromosomas enteros** y las **sondas locus específico (o de secuencia única)**. Las sondas centroméricas se utilizan para la detección de alteraciones numéricas y como control de referencia de sondas locus específico, mientras que estas últimas se usan para la detección de translocaciones, deleciones o amplificaciones. Las locus específico pueden ser sondas de fusión, que estudian la unión de dos regiones génicas, después de una translocación previa o por una deleción, que hace que dos genes que en principio se encuentran distantes en el genoma entren en proximidad, y sondas *break-apart* o *de separación*, que estudian el intercambio o desplazamiento de material genómico entre dos cromosomas (61).

La FISH ha mostrado buenos valores de Se y Sp para detectar diferentes anomalías cromosómicas. Presenta una alta fiabilidad y su rendimiento es alto incluso con muestras de baja pureza tumoral (45,62). Otras ventajas de FISH son la posibilidad de utilizarla en muestras de tejido fresco o FFPE tumoral, utilizando sólo uno o dos cortes de la muestra, que su TAT suele ser inferior a 7 días laborables,

generalmente entre 1-3 días, y que no es un requisito tener conocimiento previo del par de fusión (a diferencia de RT-PCR que sólo puede detectar pares de fusión conocidos). FISH ha sido considerada como el *gold standard* para la detección clínica de fusiones de genes (63).

Se trata de una técnica más precisa que la IHQ, pero más compleja y laboriosa de ejecutar, con un coste más alto, además de que su interpretación resulta más difícil, siendo necesario contar con un patólogo con experiencia. FISH no puede diferenciar entre distintos pares de fusión. Otras desventajas de FISH son la necesidad de disponer de un microscopio de fluorescencia, que el número de alteraciones evaluadas por análisis es limitado y que resulta algo más difícil de implementar de forma rutinaria en los laboratorios. Además, FISH no puede confirmar si el gen de fusión se ha transcrito (21).

Resulta muy importante la fase pre-analítica de esta prueba donde un patólogo debe señalar la sección para análisis FISH en una muestra tisular teñida con hematoxilina-eosina (H&E) que sea representativa del tejido tumoral. El grosor de la muestra FFPE puede influir en los resultados FISH, de modo que se recomienda que sea de 4 ± 1 μm . El porcentaje de células tumorales presentes en la muestra es un elemento clave ya que un bajo porcentaje llevaría a unos resultados no informativos. Por eso, la muestra más adecuada para estudio con FISH sería la obtenida durante la cirugía, mientras que muestras citológicas son más susceptibles de presentar resultados no-interpretables. Es importante recoger información sobre el almacenamiento y procesamiento de las muestras, el diagnóstico patológico y la posible presencia de necrosis. Las muestras citológicas deben ser fijadas en formalina y almacenadas como bloques celulares. Las muestras quirúrgicas deben fijarse y almacenarse como bloques FFPE.

Se considera el método más sensible para detectar reordenamientos *ALK* y *ROS1*. Para estudiar el **reordenamiento de *ALK*** se utilizan sondas FISH *break apart*; un fluorocromo se unirá a la región centromérica 3' y la otra sonda, a la telomérica 5'. Son sondas de color dual: la sonda 3' *ALK* se vería naranja mientras que la 5' *ALK* aparecería de color verde. Este test requiere un mínimo de 50 células. Se consideran células positivas a reordenamientos *ALK* cuando las señales naranja y verde adyacentes están separadas una distancia superior a dos veces el diámetro de esas señales, o cuando coexisten dos señales de fusión con una señal naranja. También se considera positivo si aparecen naranjas aisladas nucleares. Las células se consideran negativas a reordenamientos *ALK* cuando se observan dos señales de fusión con una distancia entre los bordes de las señales inferior a 2 veces el diámetro de las señales, o una señal de fusión con una señal verde sin su correspondiente señal naranja, o cuando se observan núcleos con solapamiento de las señales de fusión que aparecen en color amarillo o naranja.

Una muestra se considera positiva cuando más de 25 células de 50 (>50%) son *ALK*-positivas; se considera negativa si menos de 5 células de las 50 (<10%) son *ALK*-positivas; y se considera que el resultado es incierto o equívoco si entre 5-25 células (10-50%) son positivas. Para estos casos dudosos un segundo profesional debería realizar el conteo de células positivas en la muestra: si el porcentaje de células positivas es <15% (<15 células de 100), la muestra se considerará negativa, mientras que si es ≥15% (≥15 células de 100) se considerará positiva (64).

Para detección de reordenamientos *ALK*, el único test FISH aprobado como *CDx* por la FDA en pacientes con NSCLC antes de tomar la decisión de tratamiento con crizotinib o brigatinib es Vysis *ALK* Break Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Illinois, USA). Ver [Tabla 6](#) de Anexo II. Este kit también es válido para estudiar reordenamientos *ROS1* en muestras FFPE.

Para el estudio de reordenamientos *ROS1*, se considera que el *gold standard* es FISH con sondas de color dual *break-apart* (65). Se recomienda que la interpretación sea realizada por dos personas, en un mínimo de 50 células tumorales y se acepta un nivel de corte de un 15% de células anormales para considerar el test positivo (28), aunque dentro del mismo tumor pueden existir diferentes patrones de señales anormales.

El test se informa como positivo cuando las sondas están separadas por una distancia igual o mayor al diámetro de la señal y/o se muestran 3´ señales separadas (37,66). Generalmente, el color de las señales es el contrario a los reordenamientos *ALK*: 3´ *ROS1* se marca en verde y 5´ *ROS1* en naranja. Si el resultado es incierto (sólo positivas entre el 10-15%) es necesario confirmar con otra técnica. En casos donde no hay reordenamiento *ROS1*, el solapamiento de ambas sondas produce una señal amarilla, mientras que las señales naranja y verde aparecen separadas.

La imagen positiva a *ROS1* puede presentar dos patrones: el clásico con una señal de fusión (*ROS1* nativo) y dos señales separadas 3´ y 5´, y el patrón atípico con una señal nativa *ROS1* de fusión y una señal aislada 3´ verde sin la correspondiente señal 5´ naranja. No obstante, se han descrito algunos FP porque una señal aislada 3´ puede representar una delección de *ROS1* que no sea funcional. También se han descrito FN por la presencia de patrones FISH atípicos como doble señal naranja, debidos a reordenamientos complejos.

Algunos test FISH permiten analizar de forma simultánea reordenamientos *ALK* y *ROS1*, con la ventaja de aprovechar de forma más eficiente el tejido disponible. Sin embargo, FISH es una técnica demasiado laboriosa y de elevado coste para realizar el *screening*, por lo que en general, se acepta que este se debe realizar

con IHQ y posterior confirmación de los casos IHQ positivos con FISH o por métodos citogenéticos, y que además de *ROSI* se busquen alteraciones *ALK* y *EGFR*.

Para **reordenamientos *RET***, aunque no existe un protocolo diagnóstico aceptado de forma universal, ya se ha comentado que la IHQ no se considera un método adecuado, mientras que FISH y RT-PCR serían pruebas sensibles y efectivas, además de la NGS-RNA.

Para **fusiones *NTRK***, se puede utilizar FISH con sondas *break-apart*. Un resultado FISH positivo indica la presencia de variantes estructurales en el gen estudiado, pero no si dichas alteraciones tienen o no significación funcional. Una de las sondas comerciales más utilizadas es la sonda *break-apart* ETV6 que ha demostrado ser muy efectiva para identificar la presencia de fusiones *ETV6-NTRK3* (50); de hecho, en los tumores con alta prevalencia conocida de este tipo de fusión, FISH sería el método de elección para identificarla (62). Se han descrito valores de Se del 80% y de 100% de Sp (23).

Una desventaja de la FISH para el estudio de **fusiones *NTRK*** es la necesidad de realizar tres ensayos FISH en paralelo, uno para cada gen *NTRK*, lo que supone una mayor laboriosidad, aumento del tiempo de respuesta e incremento de costes (14). Además, se han descrito algunos FN de FISH para fusiones *NTRK1* cuando la separación entre las señales es insuficiente, como se ha descrito en fusiones *LMNA-NTRK1* que son causadas por una delección intracromosómica (21,67). También se ha informado de un 30% de FN en la detección de genes *NTRK* de fusión en niños con sarcomas (68). Por el contrario, algunas translocaciones cromosómicas complejas pueden ocasionar FP en FISH (49). Un gen *NTRK* intacto se observaría con FISH como un solapamiento de las sondas y una fluorescencia amarilla, mientras que la translocación *NTRK* se presentaría como señales roja y verde separadas. Se acepta un punto de corte de 10% o 15%, es decir, que se daría como positivo si se detecta que más del 10% o 15% de los núcleos celulares presentan señales verdes y rojas separadas una distancia mayor que dos veces el diámetro de la sonda (13).

Otras técnicas de hibridación in situ son la cromogénica (CISH) y con plata (SISH). CISH evalúa el efecto cromogénico en una reacción enzimática. Se trata de una técnica de fácil realización, con la ventaja de utilizar un microscopio de campo brillante de modo que la morfología se preserva mejor y ser de bajo coste, en comparación a FISH (69,70). CISH ha demostrado alta Se y Sp para la detección de algunas alteraciones como los reordenamientos *ALK* y *ROSI*, con resultados comparables a FISH, pero todavía la experiencia con esta técnica es limitada (62,71).

1.3.3. RT-PCR

Consiste en extraer el RNA tumoral y convertirlo en secuencias de DNA complementario (cDNA) utilizando la transcripción inversa. Después, el cDNA se amplifica resultando en un producto de amplificación PCR sólo cuando está presente una fusión concreta.

Se trata de una técnica de gran especificidad, relativamente rápida y de bajo coste. Resulta altamente fiable para las variantes conocidas pero muy poco frente a las desconocidas, por lo que se hace necesario conocer previamente los genes acompañantes de la fusión (64,72), por ello esta prueba puede considerarse en caso de tumores con alta probabilidad de presentar pares de fusiones conocidos, como *ETV6-NTRK3* en el fibrosarcoma infantil o en el carcinoma secretor de mama.

Otra limitación de la RT-PCR se refiere a la conservación del RNA en el tejido FFPE, pues para que el resultado sea correcto es necesario que el RNA tenga adecuada calidad, pero el RNA extraído de esas muestras FFPE se puede encontrar muy dañado, siendo el resultado poco fiable. Sin embargo, la RT-PCR puede emplearse en muestras citológicas y muestras de tejido fresco congelado (64). Su TAT es de 1 semana.

La utilización de la RT-PCR para detectar **fusiones *NTRK*** a partir del RNA de algunos tumores resulta muy limitada en la práctica clínica debido a la gran cantidad de distintos reordenamientos *NTRK* con múltiples genes, y que habría que diseñar *primers* específicos para todos ellos, lo que supone una labor compleja (16). Se han encontrado resultados de Se de la RT-PCR de tan solo un 25% en muestras FFPE (23).

Algunos autores consideran que el uso de FISH y RT-PCR se debería limitar a las siguientes tres situaciones: 1) para confirmar fusiones *NTRK* en tumores raros donde esta alteración es patognomónica o muy frecuente, 2) para confirmar fusiones *NTRK3* después de un resultado positivo (tinción nuclear) con IHQ, y 3) tras un resultado equívoco o dudoso de NGS cuando no queda muestra tisular disponible (16).

RT-PCR es una técnica muy específica, que podría utilizarse para estudiar **reordenamientos *ALK*** en casos de resultados discordantes entre IHQ y FISH. RT-PCR detectaría la sobreexpresión de transcritos de fusión *ALK*. El meta-análisis realizado por Zhang y cols (73) sobre el uso de RT-PCR para identificar reordenamientos *ALK* en pacientes con NSCLC ha demostrado un alto rendimiento diagnóstico con valores agregados de Se del 92,4% (IC 95%: 82,2%-97,0%) y de Sp del 97,8%

(IC 95%: 95,1%-99,0%) y un AUROC de 0,99 (IC 95%: 0,98-1,00) en muestras FFPE. Por el contrario, esta prueba no resulta útil para identificar reordenamientos *ROSI* en pacientes con NSCLC pues este gen también se expresa en tejido pulmonar normal e hiperplásico (25).

1.3.4. NGS

Las plataformas de secuenciación de nueva generación (NGS) son capaces de procesar en paralelo múltiples secuencias de DNA o RNA en un único proceso de secuenciación. El desarrollo de nuevas generaciones de secuenciadores que aplican otras tecnologías de **secuenciación en paralelo**, hace que hoy día sea más apropiado hablar de secuenciación masiva o *High-Throughput* (HTS) o secuenciación de alto rendimiento en lugar de NGS (74). Entre estas otras tecnologías de secuenciación en paralelo se encuentran la secuenciación por ligación, la secuenciación por síntesis y semiconducción (IonTorrent, de Life Technologies) y la secuenciación por síntesis en clusters (como HiSeq, NextSeq o Novaseq, de Illumina). También se han desarrollado los **secuenciadores de tercera generación**, que utilizan la secuenciación de molécula única (*single molecule real-time*, SMRT) con la que resulta posible secuenciar moléculas más largas.

La HTS permite la lectura de millones de secuencias de DNA de forma masiva y paralela, por lo que es posible estudiar alteraciones moleculares en múltiples genes en una única prueba, en un periodo de tiempo menor y con menor coste por base. Además, permite detectar fusiones nuevas. En el ámbito de la oncología, esta tecnología ha demostrado gran utilidad por la posibilidad de investigar múltiples oncogenes de forma simultánea y en una misma muestra tumoral, y es la única prueba que permite realizar, de forma simultánea, la determinación de todos los biomarcadores agnósticos (49). Entre las limitaciones de estas pruebas de secuenciación masiva cabe señalar que requieren una alta especialización y gran experiencia bioinformática, implican tiempos de análisis y respuesta más largos (aunque nuevas tecnologías consiguen reducir estos tiempos a menos de una semana) que otros análisis moleculares y que todavía resultan muy costosas.

La secuenciación masiva incluye varios pasos. Una primera fase pre-analítica, de recogida, preparación de la muestra y extracción del DNA. Luego, se procede a la fragmentación del DNA generando pequeños fragmentos de diferentes tamaños.

La etapa de enriquecimiento de secuencias dianas consiste en seleccionar exclusivamente las áreas de interés antes de la secuenciación. En oncología molecular existen dos diseños básicos: métodos de captura por hibridación en fase sólida

y método de amplificación mediante PCR. Esto se produce en las plataformas de segunda generación, mientras que en las de tercera generación no se requiere la amplificación de los fragmentos de DNA por lo que el tiempo de trabajo y costes son menores. Los métodos basados en captura utilizan la hibridación para generar la librería. Son más complejos, tardan más tiempo en tener el resultado, pero son más efectivos para analizar grupos más grandes de genes o regiones genómicas más grandes. Los métodos basados en amplicones utilizan múltiples reacciones PCR para generar la librería. Pueden utilizar la *multiplex* estándar PCR o el método *anchored multiplex PCR* (método AMP) para amplificar las secuencias de interés. En el caso de la *multiplex* estándar PCR es necesario conocer los dos pares de fusión, mientras que con la *anchored multiplex PCR* no lo es y se pueden estudiar nuevos pares de fusión. Suele ser un método más sencillo y rápido que el de captura por hibridación, y que ha demostrado presentar altos niveles de Se y Sp incluso en muestras FFPE (13).

Una vez generada la librería de DNA, se procederá a la secuenciación o lectura del material genético, al mismo tiempo en todas las moléculas de DNA. Es la secuenciación masiva y paralela. Después, se realizará la reconstrucción de la secuencia completa por medio de secuencias de referencia y exportación a ficheros de almacenamiento de datos. Todo esto requiere potentes programas bioinformáticos que analizan las variantes encontradas e identifican las que son patológicas o potencialmente patológicas. El siguiente paso es la validación técnica, aplicando tests que confirmen las variantes encontradas por NGS. El último paso es la validación biológica, que incluye el análisis e interpretación de los resultados de la secuenciación con lo que se emitirá un informe final (75).

La NGS permite **tres tipos de secuenciación diferentes**: la secuenciación de panel de genes específicos o secuenciación dirigida, la secuenciación completa del exoma (WES, *whole exome sequencing*) y la secuenciación completa del genoma (WGS, *whole genome sequencing*). La secuenciación dirigida o con paneles de genes: consiste en el aislamiento, enriquecimiento y secuenciación de regiones concretas del genoma (regiones codificantes de interés y zonas intrónicas adyacentes). Se utilizan paneles de genes con cebadores o sondas para unos genes conocidos, es decir, que secuencia un número determinado y específico de genes relacionados con una enfermedad. Permiten secuenciar mutaciones conocidas (*hot spots*), genes completos, detectar variaciones en el número de copias y translocaciones. Es la prueba de menor coste de las tres, se realiza más rápidamente, permite la secuenciación de los genes de interés con una gran cobertura y profundidad de lectura, de modo que es posible detectar variantes de muy baja frecuencia. Su interpretación es más sencilla porque hay bases de datos de referencia que asocian las variantes encontradas con la enfermedad relacionada.

Hoy día se dispone de **diferentes test NGS** para el estudio de fusiones de genes, unos basados en DNA y otros en RNA. La **NGS basada en DNA (NGS-DNA)** permite examinar el DNA tumoral y ha demostrado su alto rendimiento para detectar mutaciones, amplificaciones, deleciones, fusiones, el estado de la inestabilidad de microsatélites y la carga mutacional tumoral. También es de gran importancia por su capacidad de detección de variantes somáticas en subpoblaciones de células tumorales (mutaciones subclonales), que están presentes en una proporción pequeña en la muestra tumoral, que no eran detectables por el método de Sanger y que son las responsables de algunas recaídas o de la resistencia al tratamiento de algunos tumores (76). Este procedimiento requiere una adecuada pureza tumoral así como de disponer de muestras tisulares de cortes no teñidos o de FFPE de adecuada calidad. El resultado suele estar en un plazo de 2 semanas. Como desventaja cabría señalar que está limitada por el tamaño de los intrones y que en estos intrones es frecuente la presencia de regiones altamente repetitivas que imposibilitan el análisis en casos de captura por hibridación, por esto, la NGS-DNA es menos exacta para detectar genes de fusión que impliquen a grandes regiones intrónicas (21).

La **NGS basada en RNA (NGS-RNA)** presenta algunas ventajas respecto a la basada en DNA como la posibilidad de secuenciar RNA maduro que no se ve afectado por el tamaño de los intrones o por la presencia de fusiones que afecten a múltiples genes y exones simultáneamente. En la NGS-RNA, los intrones se han eliminado en el RNA tras el proceso de *splicing*, de forma que se eliminan las limitaciones técnicas de la cobertura intrónica. Este tipo de secuenciación permite estudiar fusiones de genes y validar mutaciones somáticas detectadas por la secuenciación de DNA. Otra ventaja es que la detección de fusiones a nivel de RNA aporta evidencia directa de que son transcritas funcionalmente. La detección de los transcritos de fusión en muestras tumorales de baja pureza ofrece una alta confianza. En general, la NGS-RNA es una prueba precisa, específica y de muy alta Se que permite estudiar múltiples alteraciones genéticas en un solo estudio. El principal inconveniente del manejo del RNA es su naturaleza lábil, especialmente cuando se trata con muestras FFPE. Si se dañan las muestras, el RNA se podrá romper en fragmentos demasiado pequeños a partir de los cuales no es posible obtener información o con los que no se podrán preparar las librerías ni realizar la posterior secuenciación. Por ello, resulta fundamental realizar controles de calidad del RNA para evitar posibles FN y permitir la reproducibilidad del test. Si la calidad del RNA no es adecuada, habrá que repetir la prueba en otro bloque de parafina, bien de la misma biopsia o pieza quirúrgica o de otras, o utilizar otra segunda prueba de confirmación.

Se están desarrollando **nuevas plataformas híbridas, que emplean ambas librerías, de RNA y DNA**, que podrían convertirse en una herramienta fundamental en el análisis de múltiples biomarcadores en un futuro próximo (14). Ejemplos

de estos paneles híbridos DNA/RNA son TruSight Tumor 170 (de Illumina) y OncoPrint Comprehensive Assay (de Thermo Fischer).

La NGS puede realizarse sobre muestras FFPE, frescas y en tejido congelado, pero también es posible analizar el **DNA tumoral circulante (ctDNA)**, lo que se denomina biopsia líquida. Este procedimiento representa una alternativa efectiva en pacientes oncológicos con enfermedad avanzada en los que no es posible realizar biopsia tumoral, o cuando hay limitaciones en el acceso a los tumores (como en los NSCLC) donde resulta compleja la obtención de muestras tumorales; además, ha demostrado ser un método no invasivo, efectivo no sólo para diagnóstico inicial sino también para monitorizar la recurrencia o la progresión tumoral y para valorar la evolución al tratamiento y el potencial desarrollo de resistencias al mismo (37,77). Por otro lado, este método permite estudiar tanto células del tumor primario como de metástasis, que en muchas ocasiones tienen un comportamiento diferente, más agresivo que las células del tumor primario; por ello, se recomienda el estudio de alteraciones genéticas en estas células metastásicas pues es muy posible la aparición de heterogeneidad en el patrón molecular.

El desarrollo de las técnicas NGS ha permitido identificar los **genes de fusión *NTRK*** en un gran número de tumores. Cuando se utilizan paneles de secuenciación, es importante comprobar que se incluyen los tres genes *NTRK* y ver el número de parejas de fusión que consideran (la anchura del panel). Además, hay que tener en cuenta que las tres fusiones *NTRK* son mutuamente excluyentes entre sí y que no suelen aparecer junto a otras alteraciones tratables.

Se ha informado de una Se global de la NGS-DNA para fusiones *NTRK* del 81% y una Sp superior al 99%. En concreto, para fusiones *NTRK1* la Se resulta muy elevada (96,8%) pero, sin embargo, es claramente inferior para *NTRK2* y *NTRK3* (77%) por la presencia de regiones intrónicas (no codificantes) grandes y en ocasiones altamente repetitivas lo que resulta en secuencias que no pueden ser identificadas de forma adecuada (14,49). La NGS-DNA también resulta de utilidad en la monitorización de mutaciones *NTRK* en pacientes que desarrollan resistencias al tratamiento con TKIs.

La NGS-RNA podría considerarse el método *gold standard* para las fusiones *NTRK* pues se centra en las secuencias codificadoras y no depende del tamaño de los intrones. Los paneles de NGS-RNA presentan mayor Se que los de NGS-DNA; por este motivo, si tras un análisis con estos paneles de DNA el resultado es negativo, es necesario utilizar una prueba de confirmación, especialmente si un estudio previo con IHQ había obtenido un resultado positivo.

Los dos **tests NGS-DNA** que estudian un mayor número de genes son FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc) y MSK-IMPACT (*Memorial Sloan Kettering Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets*), ambos aprobados por la FDA en 2017. MSK-IMPACT se basa en la captura por hibridación, presenta una gran cobertura e incluye regiones codificantes de más de 400 genes relacionados con el cáncer y algunos intrones seleccionados. Este test fue aprobado como prueba de diagnóstico *in vitro* para identificar alteraciones genéticas somáticas. Puede detectar mutaciones, indels, alteraciones en el número de copias y algunos genes de fusión, entre ellos el *NTRK1/2/3*. FoundationOne CDx permite analizar hasta 324 genes. Se aprobó como CDx para estudio de fusiones en los tres genes *NTRK* en tumores sólidos antes de iniciar el tratamiento con larotrectinib o entrectinib; para valorar la presencia de fusiones ROS 1 en NSCLC previo a administrar entrectinib y para estudio de reordenamientos *ALK* en NSCLC antes del tratamiento con crizotinib, alectinib o ceritinib. Ver [Tabla 6](#), Anexo II.

Otras plataformas de secuenciación dirigidas de DNA para detectar fusiones de *NTRK* son UW Oncoplex, UCSF500 Cancer Gene Panel, y FoundationOne Heme ([78](#)).

Otros tests NGS han sido aprobados como CDx por la FDA para un gen específico como OncoPrint Dx Target Test (Life Technologies Corporation) para estudiar fusiones *RET* en pacientes con cáncer de pulmón y cáncer de tiroides, previo al tratamiento con selpercatinib o praseltinib, y para estudiar fusiones *ROS1* en NSCLC previo a tratamiento con crizotinib. Ver [Tabla 6](#), Anexo II.

Entre las **plataformas NGS-RNA** que ofrecen la posibilidad de estudiar fusiones *NTRK*, se incluye el panel de genes de fusión para tumores sólidos GenTrials (*Knight Diagnostic Laboratories*), diseñado para detectar fusiones que impliquen a 20 dianas en genes incluyendo los *NTRK1/2/3*; el *Universal Fusion/Expression Profile (Neogenomics)* capaz de detectar alteraciones en un alto número de genes, incluyendo los tres genes *NTRK*; OncoDEEP (*OncoDNA*) realiza el análisis automático de *NTRK* en su prueba de biopsia sólida para NSCLC, glioblastomas de alto grado en población infantil y cáncer de tiroides, y dado que se trata de una secuenciación de RNA, minimiza la posibilidad de FN, que son frecuentes en el análisis basado en DNA. Para cada plataforma se necesita una cantidad diferente de RNA, así que la elección de la tecnología puede depender de cuánta cantidad de tejido haya disponible ([13](#)).

Las **plataformas para secuenciación de ctDNA** parecen poco efectivas para monitorizar pacientes con fusiones *NTRK* ([13,79](#)). Así, Guardant360 puede identificar mutaciones en *NTRK1* y *NTRK3* pero sólo fusiones de *NTRK1*; AVENIO Extended ctDNA sólo puede detectar fusiones *NTRK1*; OncoPrint Pan-Cancer Cell-Free, sólo

fusiones *NTRK1* y *NTRK3*; y FoundationOne Liquid no puede estudiar ninguno de los genes *NTRK* ni *ETV6*. Además, estas plataformas también tienen una Se muy baja para detectar fusiones *ALK* en pacientes con cáncer de pulmón.

En resumen, en la [Tabla 2](#) se recogen las principales ventajas y desventajas de cada una de estas técnicas diagnósticas.

Tabla 2. Principales ventajas y desventajas de cada técnica diagnóstica

	Ventajas	Desventajas
IHQ	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad. Disponibilidad alta. Rapidez. TAT (1-2 días). Necesita poca cantidad de muestra. Se puede realizar en tejido FFPE. Coste bajo. 	<ul style="list-style-type: none"> Interpretación no estandarizada. Menor utilidad en tumores que expresan Trk de forma fisiológica (como los cerebrales y neuroblastomas).
FISH	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad y especificidad. Disponibilidad alta. Rapidez. Puede utilizarse tejido fresco o FFPE. Coste moderado-bajo. 	<ul style="list-style-type: none"> Para fusiones <i>NTRK</i> son necesarios 3 tests FISH. Interpretación no estandarizada. Sólo puede identificar pares de fusión <i>NTRK</i> conocidos, no los nuevos.
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> Alta Se y Sp. Disponibilidad alta. Rapidez. Coste bajo. 	<ul style="list-style-type: none"> Sólo puede identificar pares de fusión <i>NTRK</i> conocidos, no los nuevos. El alto número de posibles pares de fusión limita su aplicabilidad fuera de los tumores con fusiones patognómicas. Baja Se (del 25%) para fusiones <i>ETV6-NTRK</i>.
NGS	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidad y especificidad. Estudio simultáneo de múltiples genes y alteraciones genómicas. Puede utilizarse tejido fresco, FFPE, congelado y ctDNA. Identifica pares nuevos de fusión (NGS-RNA). Preferible la NGS-RNA frente a NGS-DNA porque la primera se centra en secuencias codificantes, no en los intrones. 	<ul style="list-style-type: none"> Sensibilidad variable de paneles DNA entre estudios. Coste elevado. Acceso limitado. TAT más prolongado. NGS-RNA está limitada por la posibilidad de degradación del RNA en muestras FFPE. NGS-DNA está limitada por el tamaño de los intrones (dificulta la identificación de fusiones <i>NTRK2</i> y <i>NTRK3</i>, especialmente).

ctDNA: DNA tumoral circulante; FISH: hibridación in situ por fluorescencia; FFPE: fijado en formol e incluido en parafina; IHQ: inmunohistoquímica; NGS: secuenciación de segunda generación; RT-PCR: Transcriptasa inversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa; Se: sensibilidad; TAT: tiempo de respuesta.

1.4. Terapias tumor-agnósticas

Los **tratamientos tumor-agnósticos o independientes del tipo tumoral** tienen como diana terapéutica determinadas alteraciones genéticas o características moleculares específicas, independientes del sitio de origen del tumor. Es decir, que la terapia no se basa en el tipo histológico de tumor ni órgano afectado sino en el perfil genético del tumor (80,81). Los tratamientos agnósticos van dirigidos a determinados marcadores tumorales que no son específicos de un tumor concreto sino que son compartidos por diferentes tipos de tumores, basándose en características biológicas y en las alteraciones genéticas de los mismos (82). La presencia de dichas dianas predice una buena respuesta al tratamiento, por eso se las considera como biomarcadores predictivos.

En mayo de 2017, el **pembrolizumab** (Keytruda®, Merck & Co.) se convirtió en el primer fármaco con indicación tumor-agnóstica, al recibir la aprobación de la FDA en pacientes adultos y pediátricos para tratamiento de tumores sólidos localmente avanzados o metastásicos con deficiencia en la reparación de los errores de emparejamiento (dMMR, *deficient mismatch-repair*) o con alta MSI, que hubieran progresado tras tratamiento previo o que no presenten alternativas terapéuticas (83,84). Los tumores con estas alteraciones moleculares tienen dificultades para reparar el daño en el DNA y debido a ello se ocasionan numerosas mutaciones que llevan a la aparición de proteínas anormales. El pembrolizumab es un inhibidor de punto de control inmune (*immune checkpoint*), un anticuerpo monoclonal humanizado frente a la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1).

Con la aprobación de este fármaco se inició un cambio de paradigma en la terapia oncológica centrada en fármacos dirigidos contra determinados marcadores agnósticos (85).

En Japón se aprobó el uso de pembrolizumab para tumores sólidos dMMR avanzados o recurrentes en diciembre de 2018, convirtiéndose en el primer fármaco agnóstico aprobado en este país. En junio de 2020, la FDA aprobó otro uso de pembrolizumab para el tratamiento de pacientes infantiles y adultos con tumores sólidos no extirpables o metastásicos con alta TMB. En Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó este fármaco para pacientes con CCR con inestabilidad de microsátélites alta (MSI-H) o con deficiencia del sistema de reparación de apareamientos erróneos (dMMR).

Posteriormente, la eficacia observada de dos **inhibidores del receptor quinasa de la tropomiosina (TKIs)** larotrectinib y entrectinib, llevó a su aprobación también como fármacos tumor-agnósticos. Ambos tienen nivel 1C en la escala ESCAT

(ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets) (86). Ver Anexo I. Por tanto, se consideran el tratamiento estándar basado en los datos obtenidos a partir de ensayos clínicos en cesta.

1.4.1. Larotrectinib (Vitrakvi®)

Larotrectinib es un inhibidor oral altamente selectivo y potente del receptor de Trk, de las tres proteínas TrkA, TrkB y TrkC.

Larotrectinib fue aprobado por la FDA el 26 de noviembre de 2018 (87), convirtiéndose, así, en el segundo fármaco agnóstico aprobado por la FDA. Por su parte, la EMA aprobó condicionalmente larotrectinib el 19 de septiembre de 2019 (88), convirtiéndose en el primer tratamiento con indicación tumor agnóstica en la Unión Europea. Dado que los resultados de eficacia y seguridad son preliminares, la aprobación condicional está supeditada a la presentación de los datos de los estudios actualmente en curso solicitados por la EMA, que permitirán completar la información sobre farmacología, farmacocinética, eficacia y toxicidad. Está indicado en monoterapia para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos (a partir de un mes de edad) con tumores sólidos que presentan fusión del gen *NTRK*, con enfermedad localmente avanzada, metastásica o cuya resección quirúrgica implicara con alta probabilidad una elevada morbilidad, y en ausencia de otras opciones terapéuticas satisfactorias (87).

Su efectividad y seguridad fueron confirmadas en varios ensayos clínicos de un solo brazo y de fase I o II, incluyendo ensayos en cesta, en pacientes pediátricos y adultos con tumores con genes de fusión *NTRK*, independientemente de la edad y tipo de tumor (NCT02122913, NCT02637687 «SCOUT» y NCT02576431 «NAVIGATE», de ClinicalTrials.gov) (89-91). El análisis conjunto de estos ensayos, con 159 pacientes, informó de una tasa de respuesta tumoral global (ORR) (tanto parcial como completa) de acuerdo a RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumours*) del 75% (IC 95%: 72-85%), con una respuesta completa (CR) del 16%, respuesta parcial (PR) del 33%, enfermedad estable (SD) en el 12% y progresión (PD) en el 6%. La respuesta global en personas adultas fue del 73% y del 92% en población infantil. La respuesta fue independiente de la histología y tipo de fusión *NTRK*. El tiempo mediano de seguimiento fue de 12,9 meses, la mediana de duración de la respuesta (DoR) fue de 35,2 meses (IC 95%: 22,1-no estimable [NE]), la mediana de supervivencia libre de progresión (PFS) fue de 28,3 meses (IC 95%: 22,1-NE), la mediana de supervivencia global (OS) fue de 44,4 meses (36,5-NE) con un porcentaje de pacientes vivos a los 12 meses del 88% (IC 95%: 83-94). Por otro lado, se informó de un buen perfil de seguridad, tanto en personas adultas como en edad infantil. Los eventos

adversos (EA) más frecuentes fueron astenia, tos, incremento de enzimas hepáticas y en el 93% de los casos fueron de grados 1-2. En el 8% de las personas tratadas fue necesario reducir la dosis del fármaco debido a los EA y sólo en un 2% se tuvo que suspender el tratamiento por los EA.

En un análisis posterior (92) con 218 pacientes con 21 tipos diferentes de tumores, portadores de fusiones *NTRK*, la ORR fue del 75% (IC 95%: 68-81%), con CR en 22% de pacientes, PR en 53%, SD en el 16% y progresión en 6%. El tiempo medio de seguimiento fue de 22,3 meses, una mediana de DoR de 49,3 meses (IC 95%: 27,3-NE). La mediana de PFS fue de 35,4 meses (IC 95%: 23,4-55,7) con una mediana de seguimiento de 20,3 meses, y una mediana de OS a los 36 meses del 77% (IC 95%: 69-84). Entre pacientes con metástasis cerebrales, la ORR fue de 73% (IC 95%: 45-92), en 11 pacientes se observó PR, 2 presentaron SD y 2 PD. En cuanto a los EA, el 18% fueron de grados 3-4 y sólo un 2% de las personas tratadas necesitó interrumpir el tratamiento por los EA.

1.4.2. Entrectinib (Rozlytrek®)

El entrectinib es un potente inhibidor oral de la tirosina quinasa de TrkA, TrkB, TrkC, pero también de *ROS1* y *ALK*. La inhibición de Trk, *ALK* y *ROS1* lleva a la inhibición de las vías de señalización descendente, incluyendo la PLC- γ , MAPK y PI3K/proteína quinasa B, lo que a su vez conduce a una inhibición de la proliferación celular.

Japón fue el primer país en aprobar el uso de entrectinib, en junio de 2019. Después fue aprobado por la FDA, el 15 de agosto de 2019 (93) y por la EMA, casi un año más tarde y de forma condicional, el 28 de mayo de 2020 (94), para el tratamiento de pacientes adultos y pediátricos de 12 años de edad o mayores, con tumores sólidos que expresen fusión del gen *NTRK*, con enfermedad localmente avanzada, metastásica o en la que es probable que la resección quirúrgica provoque una morbilidad severa (es decir, no candidatos a cirugía), que no hayan recibido previamente terapia con un inhibidor de *NTRK*, y sin opciones de tratamiento aceptables. Dado que los resultados de eficacia y seguridad son preliminares, la aprobación condicional de la EMA de entrectinib, al igual que la de larotrectinib, está supeditada a la presentación de los datos de los estudios actualmente en curso, que permitirán completar la información sobre farmacología, farmacocinética, eficacia y toxicidad. Además de su aprobación como tumor-agnóstico, entrectinib también recibió la aprobación como tumor-específico por la FDA para personas adultas con NSCLC avanzado que presentaran fusiones del gen *ROS1*, siempre que la persona no hubiera sido previamente tratada con inhibidores *ROS1*.

Su aprobación para pacientes adultos con tumores sólidos con fusiones *NTRK* se basó en los resultados de tres ensayos clínicos multicéntricos fase I/II, de un solo brazo: ALKA-372-001, STARTRK-1 y STARTRK-2 (95-97). Para pacientes pediátricos, su aprobación se basó en los resultados del ensayo STARTRK-NG. Estos ensayos incluían tumores sólidos con diferentes *drivers* oncogénicos, es decir, que no se limitan a fusiones *NTRK*. Tras un seguimiento de 15,5 meses, los resultados de estos estudios confirmaron respuestas de larga duración en varios tumores sólidos con fusión del gen *NTRK* como sarcomas, NSCLC, tumores de las glándulas salivales, carcinoma secretor y no secretor de mama, CCR, tumores neuroendocrinos, cáncer de tiroides, de páncreas, de ovario, carcinoma endometrial, colangiocarcinoma, tumores gastrointestinales y neuroblastoma, así como en NSCLC *ROSI* positivo. Un primer análisis de eficacia con un total de 54 pacientes, ofreció los siguientes datos agregados: una ORR del 57,4% (IC 95%: 43,2-70,8%), con una CR del 7,4% y PR del 50%; una mediana de DoR de 10,4 meses (IC 95%: 7,1-NE), tasa de beneficio clínico (porcentaje de pacientes con CR, PR o SD \geq 6 meses confirmada) del 65% (IC 95%: 51-77), mediana de PFS de 11,2 meses (IC 95%: 8,0-14,9), OS de 20,9 meses (IC 95%: 14,9-NE) y tiempo hasta la progresión (TTP) en SNC de 17,0 meses (IC 95%: 14,3-NE) (95). El entrectinib atraviesa la barrera hematoencefálica y se ha demostrado su efectividad para tratar tumores primarios y metástasis del SNC, con una PFS de 7,7 meses (IC 95%: 4,7-NE). Respecto a su seguridad, igual que para el larotrectinib, los EA más frecuentes (83%) fueron de grados 1-2 (anemia, astenia, aumento de peso, disnea).

Los de grados 3 o 4 fueron la insuficiencia cardíaca congestiva, efectos sobre el SNC (como deterioro cognitivo y mareo) y fracturas óseas. La población pediátrica que recibió el entrectinib tenían más probabilidad que la población adulta de presentar ciertos EA, como neutropenia, fracturas óseas y aumento de peso. En 3,9% de pacientes fue necesario suspender la medicación por los EA ocasionados.

Un análisis posterior con 74 pacientes (98), tras una mediana de seguimiento de 14,2 meses, la ORR fue del 63,5% (IC 95%: 51,5-74,4), con una CR del 6,8% y PR del 57%, la mediana de DoR de 12,9 meses (IC 95%: 9,3-NE), tasa de beneficio clínico del 68% (IC 95%: 56-78), mediana de PFS de 11,2 meses (IC 95%: 8,0-15,7), la OS mediana fue de 23,9 meses (IC 95%: 16,0-NE) y TTP en SNC de 16,8 meses (IC 95%: 14,3-NE).

En 2022 se han publicado los resultados actualizados con 121 pacientes (con 14 tumores sólidos diferentes y más de 30 tipos histológicos) tratados con entrectinib seguidos durante al menos 12 meses (99). El seguimiento mediano fue de 25,8 meses, el 61,2% de los pacientes presentó una CR (n=19) o PR (n=55). La DoR mediana fue de 20,0 meses (IC 95%: 13,0-38,2), la PFS mediana fue de 13,8 meses (IC 95%: 10,1-19,9). La ORR de pacientes con metástasis cerebrales

fue de 63,6% (IC 95%: 30,8-89,1) y la DoR mediana para estos mismos pacientes fue de 22,1 meses (IC 95%: 7,4-NE). En cuanto a seguridad, los EA sucedidos fueron en su mayoría de grados 1 o 2, y la finalización del tratamiento por EA asociados al tratamiento se produjo en el 8,3% de las personas tratadas.

De acuerdo con sus respectivas fichas técnicas (100,101), los efectos favorables de larotrectinib y entrectinib se han demostrado en base a la tasa de respuesta y la duración de la respuesta en un número limitado de tipos de tumores. El efecto podría ser cuantitativamente diferente dependiendo del tipo de tumor, así como de las alteraciones genéticas concomitantes. Por estos motivos, estos medicamentos solo debieran ser utilizados en ausencia de opciones de tratamiento satisfactorias.

A pesar de que se han descrito respuestas al tratamiento de larga duración, en algunos casos se ha desarrollado resistencia a estos fármacos agnósticos de primera generación, relacionados con la presencia de mutaciones en el dominio de actividad de la tirosina quinasa de esta fusión génica (102) entre otras posibles causas. No existen estudios en los que se haya podido analizar la efectividad de cambiar de larotrectinib a entrectinib, o al revés. Se piensa que cuando se generan resistencias a uno de ellos, es muy probable que también las haya al otro, por eso es importante la decisión inicial de cuál de los dos fármacos es más adecuado en cada paciente en concreto (103).

La aparición de resistencia a ambos TKIs selectivos, llevó al desarrollo de una segunda generación de inhibidores *NTKR*, **repotrectinib** (*Turning Point Therapeutics*), **taletrectinib** y **selitrectinib** (LOXO-195, Bayer), capaces de actuar sobre estas mutaciones de resistencia (22,104-107). El repotrectinib es un inhibidor tirosina quinasa *ROS1/TRK/ALK*, aprobado por la FDA en 2020, que se ha estudiado en el ensayo TRIDENT-1 multi-cohorte en fase I/II con cohortes de pacientes con tumores sólidos avanzados positivos a fusiones *NTRK*.

1.4.3. Otros fármacos

Frente al larotrectinib, que es un inhibidor selectivo de Trk, los **inhibidores multiquinasa** (MKIs) presentan actividad frente a un rango amplio de dianas, no sólo la Trk.

El **crizotinib** (Xalkori®) es un inhibidor selectivo del receptor de *ALK* de primera generación, que fue aprobado para tratamiento de pacientes con NSCLC con reordenamientos *ALK*. También fue aprobado por la FDA en 2016 (108) y posteriormente por la EMA (109) para el tratamiento de NSCLC avanzado con

reordenamientos *ROS1*. En pacientes *ROS1* positivos, independientemente de que tengan o no un PD-L1 elevado, la ESMO recomienda el uso de crizotinib como primera línea de tratamiento o como terapia de rescate en NSCLC estadio IV con reordenamientos *ROS1* (110). Presenta el perfil de toxicidad más ventajoso frente a otros MKIs (111,112). Sin embargo, la mayoría de pacientes que inicialmente responden al crizotinib, con el tiempo presentan progresión de la enfermedad por resistencia adquirida frente a este fármaco (113,114). Tanto para estos casos como en primera línea de tratamiento del NSCLC con reordenamientos *ALK*, están indicados los inhibidores de segunda generación que, además, atraviesan la barrera hematoencefálica de manera más eficiente, como el ceritinib (también inhibe *ROS1*), alectinib (también inhibe *RET* pero no *c-MET* ni *ROS1*), brigatinib (con actividad anti *ALK*, *ROS1*, *IGF1* y *EGFR*) y ensartinib, o los de tercera generación como lorlatinib (también activo frente a *ROS1*), repotrectinib y taletrectinib que han demostrado gran efectividad para metástasis cerebrales (28,33). Estos fármacos se administran por vía oral; y sus principales efectos secundarios son cansancio, hipertensión, rash cutáneo, diarrea, ganancia de peso, alteraciones en la analítica como aumento del colesterol o inflamación del hígado.

Para tumores con alteraciones *RET*, también se han empleado algunos TKIs, siendo cabozantinib y vandetanib los que han demostrado mejores resultados en cuanto a tasa de respuesta, PFS y OS pero, en cualquier caso, la actividad de estos fármacos es limitada por la falta de dianas específicas que es también motivo de mayor toxicidad (41). **Nuevos inhibidores *RET* selectivos**, como selpercatinib (LOXO-292) o pralsetinib (BLU-667) han demostrado una mayor efectividad terapéutica y menor toxicidad que las alcanzadas con los MKIs como cabozantinib y vandetanib (44,115).

Selpercatinib (Retevmo®) es un inhibidor *RET* altamente selectivo que fue aprobado por la FDA el 8 de mayo del 2020 para las siguientes tres indicaciones (116): 1) tratamiento de pacientes adultos con NSCLC metastásico positivo a fusiones *RET*; 2) para pacientes de edad adulta y pediátrica de ≥ 12 años con CMT avanzado o metastásico positivo a mutaciones *RET*; 3) para pacientes de edad adulta y pediátrica de ≥ 12 años con cáncer de tiroides positivo a fusiones *RET* que requieren tratamiento sistémico y que son refractarios a terapia con yodo radiactivo. En el ensayo pivotal multicéntrico de fase I/II LIBRETTO-001 (identificador ClinicalTrials.gov: NCT03157128) selpercatinib presentó una ORR del 68% y del 62% en los NSCLC y cáncer de tiroides positivos a fusiones *RET*, respectivamente, y del 56% en los carcinomas medulares de tiroides con mutaciones *RET*. El tiempo mediano de DoR y la PFS fueron de 20,3 meses y 18,4 meses, respectivamente, en pacientes con NSCLC con fusiones *RET*. También se demostró una alta tolerancia al fármaco, requiriendo su interrupción por los EA sólo un 2% de pacientes (39,44,115,117). Recientemente se han publicado los resultados del ensayo randomizado fase 3 en

pacientes con NSCLC positivos a *ROS1* tratados con selpercatinib en comparación a los tratados con QT basada en platino con o sin pembrolizumab, destacando una PFS significativamente superior [24,8 meses (IC 95%: 16,9-NE) vs 11,2 meses (IC 95%: 8,8-16,8)] y una respuesta objetiva también mayor de 84% (IC 95%: 76-90) frente a 65% (IC95%: 54-75) ([118](#)).

Praseltinib (Gavreto[®]) fue aprobado por la FDA en 2020 para el tratamiento de NSCLC metastásicos con alteraciones *RET*, por presentar mejores resultados clínicos y un perfil de toxicidad favorable en comparación a los MKIs ([119](#),[120](#)). La EMA aprobó su uso el 27 de septiembre de 2021 para personas adultas con NSCLC positivos a fusiones *RET* y unos meses después, se aprobó para personas adultas y pediátricas de ≥ 12 años cáncer de tiroides con alteraciones *RET*. El ensayo clínico sobre praseltinib, ARROW (NCT03037385), mostró una ORR de 56% para carcinoma medular de tiroides con mutaciones *RET* y del 58% en los NSCLC positivos a reordenamientos *RET*; su tolerancia fue muy alta y sólo en un 4% de pacientes fue necesario interrumpir el tratamiento por EA asociados al fármaco.

En torno a un 50% de pacientes con NSCLC positivos a reordenamientos *RET* desarrollan metástasis cerebrales para las que no resultan efectivos los tratamientos con MKIs, mientras que los dos inhibidores selectivos de alteraciones *RET* han demostrado atravesar la barrera hematoencefálica y tener efecto antitumoral sobre las metástasis intracraneales.

En algunos pacientes con NSCLC positivos a alteraciones *RET*, se ha observado falta de respuesta a los inhibidores selectivos *RET*, que se ha asociado a la presencia de otros oncogenes *drivers* como mutaciones RAS y *EGFR* y amplificaciones MET. También se ha descrito resistencia al tratamiento en pacientes que han desarrollado mutaciones *RET* secundarias adquiridas ([121](#)).

2. Objetivos

El objetivo de este informe es revisar la literatura científica con el fin de identificar las mejores evidencias sobre estrategias adecuadas para la identificación sistemática de los biomarcadores de fusión de genes *NTRK*, *ALK*, *RET* y *ROS1* en patología oncológica dada su capacidad predictiva de respuesta favorable a terapias agnósticas.

Se han revisado las diferentes propuestas y recomendaciones respecto a la utilización de las técnicas IHC, FISH, RT-PCR y NGS en la búsqueda de dichos biomarcadores de fusión, en función de su efectividad diagnóstica y de la capacidad predictiva de respuesta favorable a terapias agnósticas en patología oncológica. Estos biomarcadores presentan dos características especiales: por un lado, se les califica como tumor-agnósticos porque no dependen del tipo de tumor ni del tejido tumoral de origen y, por otro, para pacientes con tumores irreseccables o metastásicos se dispone de terapias aprobadas o en fase de ensayo clínico avanzado dirigidas de forma selectiva frente a los mismos.

Las técnicas diagnósticas deberían permitir el cribado de fusiones de los genes *NTRK*, *RET*, *ALK* y *ROS1* de forma rápida y eficiente en cualquier tumor donde estén presentes y en los pacientes que requieran tratamiento oncológico.

Con este informe se quiere recopilar la evidencia científica publicada respecto a la validez analítica, validez clínica y utilidad clínica de las técnicas y principales estrategias diagnósticas que identifiquen la presencia de estos biomarcadores en pacientes con tumores sólidos metastásicos o con enfermedad avanzada. Además, se revisa la información disponible sobre si estos test permiten predecir una buena respuesta al tratamiento o si son predictores de algunos resultados en salud del paciente, y si el uso de estos tests puede tener consecuencias potencialmente adversas en la toma de decisiones terapéuticas.

También, en este informe se recoge la información disponible sobre la repercusión económica asociada a la incorporación de estos tests en la práctica clínica.

Por último, se revisa la efectividad de las terapias agnósticas administradas a pacientes en los que se hayan identificado dichos biomarcadores, y se recogen las evidencias sobre su efectividad comparada entre esta terapia dirigida y la terapia estándar, en términos de resultados en salud y seguridad para las personas en tratamiento.

El objetivo final del informe es recoger toda la información publicada disponible que ayude a la toma de decisiones informadas sobre el uso más beneficioso de estas técnicas en la identificación de los biomarcadores agnósticos predictivos de buena respuesta a la terapia dirigida.

3. Metodología

Se ha realizado una revisión de revisiones de la literatura científica con el fin de sintetizar e integrar toda la evidencia disponible. Se han considerado distintos tipos de publicaciones secundarias que analizaran la validez diagnóstica de los diferentes algoritmos, propuestas diagnósticas y recomendaciones de uso de las diferentes técnicas diagnósticas empleadas para la identificación de los biomarcadores agnósticos de genes de fusión *NTRK*, *ALK*, *RET* y *ROS1*. Estos documentos secundarios han incluido informes de evaluación de tecnologías sanitarias (ETS), documentos de consenso con recomendaciones de las principales sociedades científicas relacionadas con las materias de interés, opiniones de expertos, guías de práctica clínica, revisiones sistemáticas y meta-análisis, propuestas de algoritmos diagnósticos de grupos de profesionales asistenciales y de investigación y revisiones narrativas de calidad.

También se ha realizado una revisión de la literatura científica sobre efectividad y seguridad de la terapia dirigida frente a dichos biomarcadores de fusión, considerando estudios que realizaran comparaciones entre esta terapia dirigida y el tratamiento convencional con inhibidores multiquinasa, inmunoterapia y/o quimioterapia. Para ello también se han seleccionado informes de ETS, revisiones sistemáticas y meta-análisis, guías de práctica clínica, documentos de consenso de sociedades científicas y estudios originales de efectividad comparada.

Además, se han revisado estudios sobre los costes de estas pruebas diagnósticas y/o los tratamientos agnósticos. Para ello, se han considerado revisiones sistemáticas, informes de ETS y estudios originales.

3.1. Criterios de selección de estudios

Para la selección de las revisiones y demás documentos secundarios incluidos en el presente informe se aplicaron los criterios de inclusión que se muestran en la [Tabla 3](#).

Tabla 3. Criterios de inclusión

<p>Objetivos de los estudios incluidos</p>	<p>Analizar la validez analítica, validez diagnóstica y validez clínica de IHQ, FISH, RT-PCR y/o NGS en el estudio de genes de fusión <i>NTRK</i>, <i>ALK</i>, <i>RET</i> y <i>ROS1</i> en pacientes con tumores en estadios avanzados que puedan ser candidatos a terapia tumor-agnóstica.</p> <p>Establecer o proponer algoritmos diagnósticos para la práctica clínica que identificaran los biomarcadores de genes de fusión <i>NTRK</i>, <i>ALK</i>, <i>RET</i> y/o <i>ROS1</i>, con el fin de tomar las mejores decisiones terapéuticas en pacientes oncológicos candidatos.</p> <p>Elaborar recomendaciones de uso de las técnicas IHQ, FISH, RT-PCR y/o NGS para un diagnóstico más efectivo de los biomarcadores agnósticos de fusión.</p> <p>Estudiar la efectividad terapéutica de los fármacos tumor-agnósticos y/o su comparación con los tratamientos convencionales.</p>
<p>Diseño de estudios</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Para revisar la efectividad diagnóstica de las pruebas que identifiquen a los biomarcadores de fusión de genes <i>NTRK</i>, <i>ALK</i>, <i>RET</i> y/o <i>ROS1</i>, se seleccionaron revisiones sistemáticas y meta-análisis, documentos de consenso, opiniones de personas expertas, documentos de recomendaciones, propuestas de algoritmos diagnósticos o informes de ETS. • Para la revisión de la efectividad terapéutica de los tratamientos agnósticos y su comparación con la terapia convencional se seleccionaron revisiones sistemáticas, meta-análisis, informes de ETS, guías de práctica clínica, documentos de consenso y de recomendaciones de sociedades científicas sobre la efectividad y seguridad de los fármacos tumor-agnósticos, y estudios originales de efectividad comparada entre los fármacos agnósticos o entre estos y el tratamiento estándar. • Para la revisión de la condición clínica y de la tecnología se consideraron revisiones narrativas, protocolos clínicos, documentos de consenso y guías de práctica clínica. • Para la revisión de datos económicos de estas pruebas diagnósticas se seleccionaron estudios de análisis de costes, de coste-efectividad, coste-utilidad o coste-beneficio, y revisiones de evaluación económica.
<p>Idiomas de publicación</p>	<p>Inglés, español.</p>
<p>Años de publicación</p>	<p>Se seleccionaron documentos publicados a partir de 2015.</p> <p>Para estudios sobre los tratamientos agnósticos, también se estableció esta misma fecha límite de búsqueda, aunque la autorización comercial de los mismos se produjo en los años 2019 y 2020.</p>

3.2. Criterios de exclusión

- Para estudios de efectividad diagnóstica se descartaron los estudios de un caso, los originales de pruebas diagnósticas, editoriales, resúmenes de congresos, cartas al director y artículos de opinión.
- Estudios en animales.

- Artículos que en el momento de la búsqueda estuvieran todavía en proceso de publicación.

3.3. Fuentes de información

Se consultaron las bases de datos bibliográficas Medline (PubMed) y Embase (Ovid), la Cochrane Library (*Cochrane Database of Systematic Reviews*), las bases de datos DARE, NHSEED y HTA del *Centre for Reviews and Dissemination* (CRD) de la Universidad de York, TripDatabase, *Web of Science* (WOS), Scopus, la Biblioteca Virtual en Salud. Se consultaron los sitios web de asociaciones y sociedades médicas relacionadas como la ESMO, la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) o la EMA.

También se buscó información en los sitios web de las agencias de ETS, a través de la Red Española de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias y Prestaciones del Sistema Nacional de Salud (www.redets.es) e INAHTA (Red Internacional de Agencias de Evaluación de Tecnologías Sanitarias, <https://data-base.inahta.org>), EUnetHTA, además de la AHRQ (*Agency for Healthcare Research and Quality*), NICE (*National Institute for Health and Clinical Excellence*) y la NCCN (National Comprehensive Cancer Network). También se hizo la búsqueda en repositorios de guías clínicas y guías de práctica clínica como la Guidelines International Network (<https://g-i-n.net/>; <https://guidelines.ebmportal.com/>).

Por último, se revisaron los listados de referencias de los documentos seleccionados.

3.4. Estrategias de búsqueda

Para el diseño de las estrategias de búsqueda y la realización de las búsquedas en las diferentes fuentes de información se ha contado con la colaboración de una documentalista experta. Las diferentes búsquedas y resultados se muestran en el [Anexo III](#). Se utilizó tanto el vocabulario controlado de las distintas bases de datos consultadas como términos libres, adaptados a cada fuente de información.

Los términos controlados de búsqueda fueron los siguientes: Biomarkers, Tumor; Immunohistochemistry; High-Throughput Nucleotide Sequencing; In Situ Hybridization, Fluorescence / standards; Neoplasms / diagnosis*; Neoplasms / drug therapy; Neoplasms / genetics; Oncogene Proteins, Fusion; Protein Kinase Inhibitors;

Receptor Protein-Tyrosine Kinases; Receptor, trkA; Receptor, trkB; Receptor, trkC; Proto-Oncogene Proteins c-ret; Anaplastic Lymphoma Kinase.

Como términos libres se utilizaron los siguientes: «agnostic biomarkers», «histology-agnostic therapy», «histology-agnostic therapeutic agents», «tumor-agnostic therapy», «tumor-agnostic treatment», «tumor-agnostic biomarkers», «tissue-agnostic approach», «tumour biomarker testing algorithm», «FISH», «IHC», «RT-PCR», «reverse transcriptase polymerase chain reaction», «reverse transcriptase PCR», «NGS», «fluorescent in situ hybridization», «DNA sequencing», «RNA sequencing», «immunohistochemistry», «immunocytochemistry», «immunohistochemistry», «new generation sequencing», «massively parallel sequencing», «*NTRK* fusion», «*NTRK* gene fusions», «*ALK* fusion», «anaplastic lymphoma kinase fusion», «*RET* fusion», «*ROS1* fusion», «*ALK* rearrangement» «*RET* rearrangement», «*RET*-rearranged», «*RET*-altered cancer», «*ROS* rearrangement», «selective NRTK inhibitors», «selective *ALK* inhibitors» «selective *RET* inhibitors» «selective *ROS1* inhibitors», «entrectinib», «larotrectinib».

Se utilizaron algunos filtros de búsqueda como el diseño de los estudios (Consensus Development Conference, Consensus Development Conference, NIH, Guideline, Meta-Analysis, Practice Guideline, Randomized Controlled Trial, Review, Systematic Review, Technical Report) y el idioma (inglés y español).

Tras una búsqueda inicial de aproximación, se realizaron varias búsquedas de la literatura científica en julio y noviembre de 2011, y posteriormente se actualizaron en julio de 2022.

3.5. Proceso de selección de estudios

El proceso de selección de estudios se inició con la lectura del título y *abstract* de las referencias recuperadas en la búsqueda. Aquellos estudios que parecían cumplir los criterios de inclusión y aquellos que no podían descartarse se recuperaron a texto completo y su lectura permitió decidir sobre la selección final de los estudios incluidos en esta revisión. En cada etapa, se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión, que habían sido establecidos a priori.

3.6. Extracción de datos

Se han expuesto de forma narrativa los distintos documentos de revisión y demás documentos secundarios encontrados en los que se revisaba el papel diagnóstico de las diferentes pruebas. Se han presentado ordenados por tipo de estudio. De cada trabajo incluido se han recogido datos relacionados con el diseño de estudio, país en el que se ha desarrollado el estudio, población incluida (adultos y/o pacientes pediátricos), alteraciones moleculares estudiadas, tipo de tumor y sus características, técnicas diagnósticas analizadas, y se han extraído los principales resultados informados, así como los diferentes algoritmos propuestos por las personas autoras y las recomendaciones basadas en opiniones de personas expertas o establecidas en guías elaboradas por distintas Sociedades Científicas sobre el uso de las distintas pruebas diagnósticas en pacientes con tumores con sospecha de fusiones de genes *NTRK*, *ALK*, *RET* y/o *ROS1*.

Los estudios sobre las terapias agnósticas recogidos en este informe se han ordenado según el tipo de estudio y las metodologías empleada en cada uno, y se ha realizado una revisión narrativa extrayendo los principales datos sobre la población incluida (pacientes de edad adulta y/o pacientes pediátricos), el tipo de tumor, sus principales características, los fármacos estudiados en cada estudio y/o considerados en los estudios comparativos, tipos de biomarcadores analizados o identificados, y resultados como respuesta tumoral (parcial, completa, objetiva), porcentaje de control de la enfermedad, tasa de recurrencia local y/o a distancia tras cada terapia, OS, PFS, mortalidad, y los resultados comparativos entre las terapias agnósticas y convencionales. También se han presentado los datos sobre seguridad de los tratamientos, EA asociados a la terapia agnóstica informados en cada estudio, además de otros posibles datos sobre grado de severidad, porcentaje de casos en que fue necesario reducir la dosis del fármaco, porcentaje de pacientes en los que se tuvo que suspender el tratamiento.

Por último, se han presentado los estudios sobre costes, comenzando con los informes de agencias de evaluación y a continuación, los estudios originales seleccionadas para el presente informe. De cada trabajo se han recogido datos relativos a la metodología de estudio, país de origen, perspectiva del estudio, tipo de análisis y resultados de costes o coste-efectividad y/o coste-utilidad de las técnicas diagnósticas y de la terapia tumor-agnóstica informados en las distintas publicaciones.

4. Resultados

4.1. Resultados de la búsqueda y selección de estudios

La búsqueda de la literatura permitió localizar 180 referencias sobre las pruebas diagnósticas utilizadas para identificar biomarcadores de fusión y 164 sobre tratamientos agnósticos, en Medline (a través de Ovid), y 492 y 208, respectivamente, a través de Embase. En la Librería Cochrane no se localizaron revisiones Cochrane relativas al diagnóstico de estos biomarcadores ni sobre los tratamientos tumor-agnósticos y todos los artículos originales o revisiones recuperados a través de esta fuente de información, ya se habían podido recuperar en las bases de datos de Medline y Embase. La segunda búsqueda de actualización, realizada en Medline (a través de Pubmed), permitió localizar 70 nuevas referencias sobre las pruebas diagnósticas y 208 sobre las terapias. En total, se recuperaron 742 referencias sobre pruebas diagnósticas para biomarcadores y 643 sobre tratamientos tumor-agnósticos. Se eliminaron 263 duplicados. La búsqueda manual a partir de los listados de referencias de algunos documentos y la búsqueda en las páginas web mencionadas en el apartado de fuentes de información, permitió localizar 9 referencias más.

Se han seleccionado un total de 25 **estudios** sobre las diferentes **pruebas diagnósticas** utilizadas para identificar los biomarcadores agnósticos de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROS1* y *RET*. De ellos, sólo dos son informes de ETS ([79,122](#)), uno es una revisión sistemática ([23](#)), seis estudios ([14,21,25,63,123,124](#)) presentan propuestas de algoritmos diagnósticos para estudiar a pacientes con tumores susceptibles de presentar dichos biomarcadores, tres documentos de consenso de sociedades científicas españolas ([9,66,125](#)), tres documentos de recomendaciones de ESMO ([13,41,126](#)), tres guías norteamericanas ([37,127,128](#)) y siete documentos de consenso o de recomendaciones de Sociedades Científicas de otros países ([34,84,129-133](#)).

En relación a los **estudios sobre tratamientos agnósticos** para pacientes con genes de fusión, no se han encontrado ensayos clínicos controlados y randomizados sobre la efectividad de los fármacos tumor-agnósticos larotrectinib y entrectinib en comparación al tratamiento estándar de tumores positivos a fusiones *NTRK*, *ALK* o *ROS1*, ni estudios que realicen comparaciones directas entre ambos fármacos y/o con el tratamiento estándar. Se han seleccionado nueve estudios ([134-142](#)) de efectividad comparada con diferentes metodologías entre larotrectinib y entrectinib o con el tratamiento estándar; una revisión sistemática ([143](#)); tres guías de evaluación de tecnologías de NICE ([144-146](#)) y un documento de consenso ([84](#)).

Para el apartado de **estudios económicos** se han seleccionado siete estudios de evaluación económica relacionados con las pruebas diagnósticas para detección de biomarcadores de fusión y los tratamientos tumor-agnósticos. Estos estudios son los siguientes: un informe de coste-utilidad ([147](#), [148](#)) del *Scottish Medicine Consortium* (SMC), un estudio de micro-costes incluido en el informe de ETS de NIPH ([79](#)) y cinco estudios primarios ([149-153](#)).

4.2. Estudios sobre pruebas diagnósticas para identificar a los biomarcadores agnósticos de fusión

4.2.1. Informes de ETS

4.2.1.1. Informe de ETS del *Norwegian Institute of Public Health* (NIPH) ([79](#))

Con fecha de 2022, se ha publicado este informe cuyo objetivo final era ayudar en la toma de decisiones en el sistema de salud noruego respecto al uso de los tests moleculares para la detección de genes *NTRK* de fusión en pacientes con tumores sólidos localmente avanzados o metastásicos. En este trabajo se recoge la evidencia disponible sobre la validez analítica, validez clínica y utilidad clínica de las pruebas diagnósticas IHQ, FISH, RT-PCR y NGS para detección de genes *NTRK* de fusión, y se revisan las ventajas y limitaciones de cada prueba. Se trata de la primera revisión sistemática publicada de estudios originales con resultados comparativos de efectividad diagnóstica entre dichas técnicas. En esta revisión se seleccionaron 9 artículos originales (con 6 comparaciones), publicados entre 2018 y 2021, además de 5 revisiones narrativas y 2 documentos de opinión de expertos sobre las ventajas y limitaciones de cada prueba diagnóstica. Las personas autoras realizaron un resumen narrativo de resultados y descartaron realizar meta-análisis por la heterogeneidad encontrada entre los estudios. Se demuestra heterogeneidad clínica, pero también entre los tests comparados y tests de referencia utilizados, en las variables de resultado y en la interpretación de las pruebas diagnósticas.

De los estudios originales, cuatro estudios comparaban IHQ y FISH; uno comparaba IHQ con RT-PCR; en 6 estudios, IHQ con NGS-RNA; en 2, IHQ con NGS-DNA y en 1, NGS basada en DNA y en RNA. Además, un estudio comparaba resultados positivos de IHQ/FISH con NGS-DNA o NGS-RNA. En la [Tabla 4](#) se muestran estos estudios.

Tabla 4. Estudios incluidos en el Informe de NIPH

Tests comparados	N.º de estudios	Tumores	Resultados
IHC vs FISH	4	CCR, CPT.	En dos estudios, Se: 38,5-41,7% y Sp: 99,4-100%. En otro estudio, AUROC: 0,926 (0,864-0,987; p=0,001).
IHQ vs RT-PCR	1	Carcinoma secretor de glándulas salivares.	Concordancia casi perfecta entre ambos tests (0,938; IC95%: 0,818-1; SE: 0,061). Se: 90,9% y Sp: 100%.
IHQ vs NGS-RNA	6	Varios tipos de tumores.	Se: 80% en cáncer de mama a 100% en resto de tumores. Sp: 20,8% en gliomas a 100% en los demás tumores. En uno de los artículos, la concordancia entre las pruebas fue del 16,6%.
IHQ vs NGS-DNA	2	Mesenquimales pediátricos.	Un estudio informó de Se del 97% y Sp del 98% para pan-Trk IHQ, y Se del 100% y Sp del 63% para TrkA IHQ.
NGS-DNA o NGS-RNA	1	13 tipos de tumores.	Se de 96,8% para fusiones <i>NTRK1</i> , 0% para fusiones <i>NTRK2</i> y 76,9% para fusiones <i>NTRK3</i> de NGS-DNA en comparación a NGS-RNA. Se global de 81,1% y Sp de 99,86%.
IHQ/FISH + vs NGS-DNA o NGS-RNA	1		17% de muestras positivas con IHQ y/o FISH fueron también positivas en NGS-DNA. 72% de muestras positivas con IHQ y/o FISH fueron también positivas en NGS-RNA.

AUROC: área bajo la curva ROC, CCR: carcinoma colorrectal, CPT: carcinoma papilar de tiroides, FISH: hibridación in situ por fluorescencia, IHQ: inmunohistoquímica, NGS-DNA: secuenciación basada en DNA, NGS-RNA: secuenciación basada en RNA, RT-PCR: transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa, Se: sensibilidad, SE: error estándar, Sp: especificidad.

Las personas autoras evaluaron la calidad de los artículos incluidos aplicando la herramienta EGAPP (*Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention*) (154). Sólo uno de los nueve era de nivel 2 (estudios de casos y controles bien diseñados) mientras que los demás se consideraron de nivel 3 (estudios de casos y controles o transversales de baja calidad). Sobre la validez clínica, la evidencia aportada por 8 estudios fue juzgada como inadecuada y la de 1 artículo como cerca de adecuada. Ninguno de los estudios fue juzgado como de evidencia convincente. Además, las personas autoras utilizaron el checklist STARD y también se informó de un pobre resultado global.

En resumen, los resultados presentan una gran variabilidad, con una Se de pan-Trk IHQ de 40-100% y una Sp de 20-100%. Se encuentra una consistencia muy variable entre estudios, entre los casos positivos de IHQ y NGS-RNA (rango de 0% a 60%) y una consistencia entre los casos positivos de FISH y NGS-RNA mayor que entre FISH y NGS-DNA. Entre las posibles causas de esta variabilidad, las personas autoras mencionan la diferente prevalencia de las fusiones *NTRK* entre los tumores sólidos incluidos, los distintos estadios del tumor en cada paciente, la forma de tratar y analizar las muestras, los diferentes puntos de corte utilizados para la interpretación de las pruebas, la falta de cegamiento en la valoración de resultados y los diferentes periodos de tiempo entre la realización de una prueba y test de referencia.

Las personas autoras señalan la ausencia de revisiones sistemáticas y de meta-análisis, así como la falta de estudios sobre utilidad clínica con resultados de interés para el paciente como la OS o la calidad de vida, y de estudios sobre la capacidad de los tests para predecir una buena respuesta a los tratamientos. Se constata que la Se de la NGS-RNA es superior a la de NGS-DNA, especialmente para fusiones que impliquen regiones intrónicas amplias (*NTRK2* y *NTRK3*).

4.2.1.1. Informe de ETS del Norwegian Institute of Public Health (NIPH) ([122](#))

Un año antes, en 2021, el mismo Instituto noruego había publicado un informe de ETS sobre los tests utilizados para detección de alteraciones en el gen *ROS1* en pacientes con NSCLC localmente avanzado o metastásico. Se acepta que en torno al 1-2% de los pacientes con NSCLC presenta alteraciones en *ROS1* y la importancia de su identificación para seleccionar a las personas que podrían beneficiarse del tratamiento así como identificar aquellos otros pacientes sin dichas alteraciones *ROS1* y así evitarles un tratamiento no efectivo al tiempo que ahorrar en costes.

En este informe se incluyeron una revisión sistemática, 6 revisiones narrativas, una encuesta en hospitales noruegos y 2 revisiones sobre preferencias de pacientes en relación a los tests moleculares. Además, se contactó con personas expertas para recabar información sobre costes.

Este informe presenta los siguientes resultados: la evidencia sobre la Se y Sp de los tests para detectar alteraciones *ROS1* en pacientes con NSCLC es escasa, incompleta y de baja calidad; la opción de menor coste para estudiar reordenamientos *ROS1* sería realizar el *screening* con IHQ y a continuación confirmar los resultados positivos mediante FISH u otros métodos por la posibilidad de FP en IHQ;

no es aconsejable ni factible realizar el estudio de un único gen en pacientes con NSCLC, por ello, la NGS con paneles dirigidos podría ser la prueba recomendada por su capacidad para estudiar múltiples genes de forma simultánea, que, además, ayuda a reducir o evitar la repetición de biopsias. Finalmente, en este informe se dice que el uso de NGS podría suponer una reducción significativa de costes aunque, hasta el momento, los costes de la inversión inicial, de infraestructura y mantenimiento son superiores a los de otros métodos diagnósticos.

4.2.2. Revisiones sistemáticas y meta-análisis

Se ha localizado una revisión sistemática (23) relacionada con el diagnóstico de genes de fusión *NTRK*. Se trata de una revisión exhaustiva de la literatura científica publicada hasta agosto de 2018 cuyo objetivo era estudiar la prevalencia, diagnóstico y tratamiento de tumores malignos con genes *NTRK* de fusión en población pediátrica. Se revisaron a texto completo 102 artículos (71 sobre prevalencia de las *NTRK* fusiones en tumores pediátricos, 14 sobre métodos diagnósticos para fusiones *NTRK* y 17 sobre el tratamiento de tumores positivos a esta alteración genética). Tras el análisis de resultados de estos estudios, se descartó la posibilidad de realizar meta-análisis por la imposibilidad de obtener suficientes datos.

Las personas autoras señalan la gran importancia de identificar posibles fusiones *NTRK* para establecer un manejo terapéutico adecuado. La revisión de la literatura muestra que la **pan-Trk IHQ** ofrecía una alta Se y Sp para identificar estas fusiones *NTRK*, con cifras que oscilaban entre 95-97% y 98-100%, respectivamente, aunque se reconocen las limitaciones de esta tecnología para el estudio de tumores cerebrales o neuroblastomas en los que las proteínas Trk se expresan de forma fisiológica. En tumores con fusiones *ETV6-NTRK3*, el método estándar más utilizado era FISH con las sondas ETV6. En población infantil con fibrosarcomas o nefromas mesoblásticos congénitos, la presencia de señales FISH con sondas *break-apart* de ETV6 se considera confirmatorio de fusiones *NTRK*. Los valores de Se y Sp de FISH para reordenamientos *NTRK* oscilan entre 80% y 100%, respectivamente. Esta revisión permite comprobar que la **RT-PCR** no se utiliza de manera rutinaria en la mayoría de los laboratorios por su baja Se para fusiones *NTRK*, a pesar de las mejoras en la tecnología RNA. En cuanto a la **NGS**, se informa de una alta Sp y una Se variable, y se evidencian las ventajas de esta prueba, como la posibilidad de utilizar paneles de secuenciación de múltiples genes y su capacidad para identificar nuevas fusiones *NTRK*.

A la vista de los resultados encontrados, las personas autoras proponen que en tumores con alta prevalencia (>75%) de fusiones *NTRK* se utilicen IHQ, FISH

o RT-PCR y si el resultado fuera negativo, se debe realizar una NGS. Para tumores de baja prevalencia (10-40%) de fusiones *NTRK*, como melanomas spitzoides y CPT metastásico, la propuesta más interesante podría ser realizar IHQ o NGS, mientras que en los gliomas de alto grado la recomendación es realizar directamente NGS puesto que la IHQ no es válida porque estos tumores pueden expresar Trk de forma fisiológica. Para tumores con muy baja prevalencia (<5%) o de frecuencia desconocida de fusiones *NTRK*, se considera más apropiado realizar NGS pues esta técnica permite identificar un amplio rango de alteraciones genéticas incluso en muestras tisulares pequeñas.

En general, las personas autoras aconsejan utilizar la IHQ para *screening* de fusiones *NTRK* en los laboratorios con experiencia en esta técnica, dado que su Se es superior a la de otras pruebas como FISH y RT-PCR, por su coste ventajoso frente a las técnicas moleculares, su TAT y su uso sencillo. La FISH podría utilizarse en aquellos tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK*, aunque con una Se menor que la IHQ, y dada la variabilidad de pares de fusión descritos para esta alteración, los que presentaran resultados negativos con FISH deberían ser estudiados con NGS. Finalmente, señalan que en población pediátrica con recaídas de tumores sólidos o si estos son refractarios al tratamiento, se debe realizar *screening* de fusiones *NTRK*, bien con IHQ o NGS, como parte de un estudio más amplio de perfil molecular que permita identificar diferentes *drivers* oncogénicos.

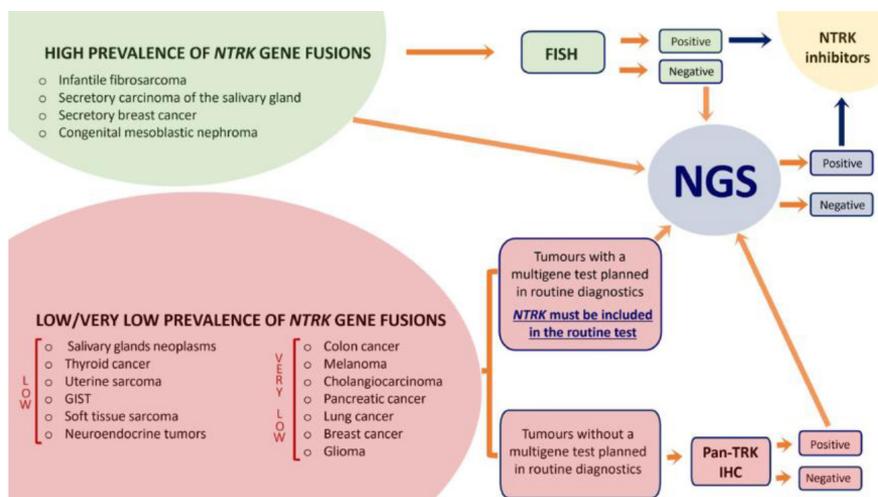
4.2.3. Propuestas de algoritmos diagnósticos para identificar los biomarcadores de fusión

A continuación, ordenados por fecha de publicación desde los más recientes, se presentan los seis artículos en los que, a partir de revisiones de la literatura o de la opinión de expertos, se han propuesto algoritmos diagnósticos para identificar los genes de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROSI* y *RET*. Además de los algoritmos, se recogen las principales reflexiones o conclusiones recogidas en estos documentos.

Marchetti y cols ([123](#)) han publicado, recientemente, una **revisión** sobre las pruebas diagnósticas para identificar fusiones *NTRK* en pacientes con tumores sólidos. Las personas autoras reflexionan sobre la buena respuesta observada al tratamiento con TKIs y por ello consideran crucial definir estrategias óptimas para identificar las fusiones *NTRK* y en función de los resultados que se obtengan, instaurar el tratamiento más adecuado. Señalan la importancia de evaluar la eficiencia y los costes de cada una de las técnicas diagnósticas puesto que la prevalencia de estas alteraciones moleculares es baja. En este sentido, señalan que la pan-Trk

IHQ resulta eficiente, fiable y rápida como prueba de *screening* en la práctica clínica habitual. En los casos en que se detectara expresión de Trk, la recomendación es realizar NGS con paneles de múltiples genes. La tinción IHQ citoplasmática difusa orientaría a sospechar reordenamientos *NTRK1* mientras que una débil tinción citoplasmática junto con tinción focal nuclear sería más sospechosa de reordenamientos *NTRK3*. En cuanto a la NGS, los autores consideran que la basada en RNA se podría considerar el *gold standard*, siempre que se garantice la calidad del RNA en las muestras, e incluso consideran preferible la opción combinada de realizar NGS tanto de DNA como de RNA. Partiendo de estas premisas, las personas autoras proponen un algoritmo (Figura 1) en el que se dividen los tumores en dos grupos en función de la prevalencia de las fusiones *NTRK*, cada uno con un abordaje diferente.

Figura 1. Algoritmo diagnóstico propuesto por Marchetti y cols

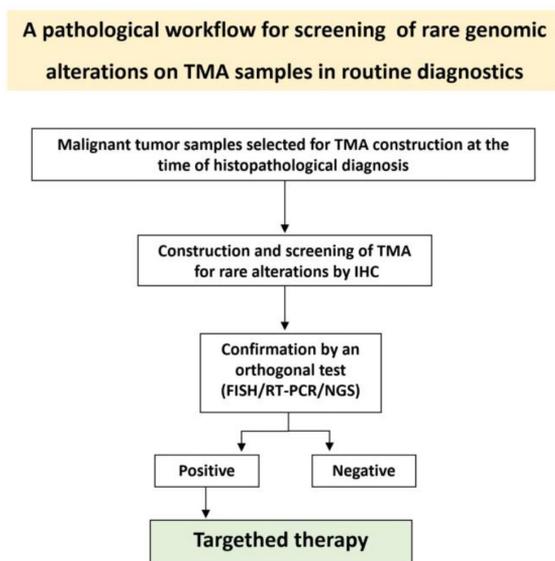


Para tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK* (>50%) como fibrosarcoma infantil, carcinoma secretor de mama y de glándulas salivares y nefroma congénito mesoblástico, según este algoritmo, los pacientes debían ser sometidos de forma rutinaria al *screening* de fusiones *NTRK*, bien realizando FISH con sondas *break-apart* y/o NGS. Si se realiza FISH y el resultado es negativo, se debería continuar el estudio realizando NGS antes de descartar definitivamente que existan dichas fusiones. Si se trata de tumores con una prevalencia baja o muy baja (<5%) de fusiones *NTRK*, como NSCLC, melanoma, CCR o cáncer de tiroides, hay centros hospitalarios en los que estos casos son analizados de manera habitual con el objetivo de identificar alteraciones genéticas específicas susceptibles de terapia

dirigida utilizando NGS con amplios paneles de genes, que incluyan los *NTRK*. Si por el contrario, no se realiza NGS de forma rutinaria con paneles multigenes, por ejemplo, en tumores de páncreas, entonces la prueba recomendada es la pan-Trk IHQ. En ambos casos, si el resultado con FISH o con NGS es positivo, estaría indicado iniciar el tratamiento con inhibidores Trk.

Las personas autoras consideran que los tests para identificar las dianas de los tratamientos tumor-agnósticos, incluyendo los genes de fusión *NTRK*, deberían aplicarse a todos los tumores sólidos en fases tempranas del diagnóstico de modo que sea posible identificar a pacientes que se van a beneficiar del tratamiento dirigido. Sin embargo, reconocen que realizar tests a la totalidad de las personas afectadas supondría un coste inasumible en la práctica clínica hoy día. Por ello, las personas autoras presentan un método de aplicación de la pan-Trk IHQ utilizando microarrays (TMA, *tissue micro arrays*). Esta propuesta diagnóstica (Figura 2) ya había sido implementada por las personas autoras para favorecer la implantación de un *screening* rutinario en la práctica clínica de biomarcadores raros (12).

Figura 2. Algoritmo para *screening* utilizando TMA. Algoritmo propuesto para *screening* de biomarcadores raros y para seleccionar a los pacientes candidatos a tratamientos tumor-agnósticos. TMA: *tissue micro arrays*



Con la aplicación de esta nueva propuesta diagnóstica, fue posible identificar una serie de dianas moleculares raras, incluyendo fusiones *NTRK*, para seleccionar

pacientes para recibir tratamientos agnósticos. Esta técnica de microarrays permite analizar muchas muestras de manera simultánea con una reducción considerable de costes y del tiempo invertido en el *screening*. Los casos que presentaran un resultado positivo tendrían que confirmarse mediante NGS o FISH. Las personas autoras informan de que a partir de los resultados del estudio piloto, la *Italian Society of Pathological Anatomy and Cytodiagnosics* (SIAPeC) está llevando a cabo un proyecto multicéntrico aplicando dicha propuesta de trabajo, en unas 10.000 personas, especialmente centrado en pacientes jóvenes (de menos de 50 años), con el fin de identificar alteraciones moleculares raras y seleccionar a las personas candidatas a tratamientos tumor-agnósticos.

También en este año 2022, se ha publicado un documento ([25](#)) basado en la **opinión de personas expertas**, sobre el diagnóstico molecular de reordenamientos *ALK* y *ROS1* en pacientes con NSCLC. En este artículo se resumen las principales características de cada técnica diagnóstica en la identificación de alteraciones *ALK* y *ROS1*. Se reconoce que la NGS es la alternativa más fiable frente a las técnicas convencionales, pero que son la IHQ y FISH las pruebas más implementadas en los laboratorios. La IHQ se presenta como la técnica indicada para *screening* mientras que se propone FISH para confirmar los resultados positivos o equívocos de IHQ. Aunque FISH es considerada la prueba más sensible para estudiar estas dos alteraciones genéticas, las personas autoras señalan la importancia de seguir las indicaciones de las guías más actuales para una correcta interpretación de sus resultados. En cuanto a otras técnicas, la opinión de las personas expertas era que ni la RT-PCR ni la biopsia líquida estaban todavía lo suficientemente extendidas en la práctica clínica, pero se reconocía el impacto significativo que el uso de la biopsia líquida tiene en pacientes con cáncer de pulmón en estadios avanzados, tanto para identificar *drivers* oncogénicos como para detectar mutaciones relacionadas con la resistencia a la terapia dirigida y para valorar la respuesta al tratamiento. En concreto, para fusiones *ALK* las personas autoras recomiendan tanto IHQ como FISH; para *screening* de *ROS1* recomiendan IHQ y confirmar los casos positivos con otras técnicas citogenéticas o moleculares; y en casos dudosos o equívocos, aconsejan verificar con otra técnica alternativa. Destacan el papel fundamental que patólogos y técnicos de laboratorio tienen en la coordinación y manejo de las muestras tisulares, así como la importancia de seguir controles de calidad en el laboratorio, todo ello clave para un diagnóstico correcto de los biomarcadores. También señalan la necesidad de que profesionales patólogos y biólogos trabajen en estrecha relación para que las muestras a evaluar se puedan seleccionar de la forma más correcta posible. En relación a los biomarcadores que deberían estudiarse en pacientes con NSCLC, la recomendación de las personas autoras es incluir mutaciones *EGFR* y reordenamientos *ALK*, ambas altamente recomendadas, pero además, también reordenamientos *ROS1* y mutaciones *BRAF*. Para otros genes como *RET*, *MET*, *HER2* o *KRAS*, los autores no recomiendan su estudio de forma aislada

pero sí dentro de amplios paneles de genes, bien al principio o si los resultados para *EGFR/ALK/ROS1/BRAF* son negativos. En cuanto al momento de estudiar estos genes, se puede optar por realizarlo en el diagnóstico inicial o bien en pacientes con estadios avanzados (IIIB y IV) o si la enfermedad progresa. Finalmente, y tras la revisión de las guías más actualizadas para la determinación de biomarcadores en pacientes con NSCLC, los autores respaldan las recomendaciones de la guía de *College of American Pathologists (CAP)*, el *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, y la *Association for Molecular Pathology (AMP)*, que se presentan más adelante en este informe.

Lim y cols ([124](#)) han publicado este año 2022, las recomendaciones alcanzadas por un **panel de personas expertas multidisciplinares**, formado por profesionales en oncología y patología de los sectores sanitarios público y privado de Singapur, para proponer unos algoritmos diagnósticos para personas adultas con CCR, NSCLC y sarcomas y para tumores pediátricos, con el fin de desarrollar estrategias de estudiar fusiones *NTRK* y con ello optimizar el uso de las muestras tisulares y los recursos económicos y minimizar el tiempo de respuesta hasta obtener el resultado.

Las personas autoras indican que los siguientes elementos se deben considerar a la hora de realizar tests para determinar si en el tumor se dan fusiones *NTRK*: la prevalencia de dichas fusiones según el tipo de tumor, la disponibilidad de los tests, las limitaciones económicas en el contexto concreto donde se vayan a utilizar y el tiempo de respuesta.

En NSCLC, se recomienda NGS para fusiones *NTRK* junto al estudio de otros *drivers* oncogénicos (*EGFR, ALK, ROS1, MET, BRAF* y PD-L1) pues consideran que así es posible optimizar la muestra de tejido para estudio de todos estos *drivers*. Se podría optar por IHQ como *screening* y NGS como prueba confirmatoria. En caso de que la enfermedad progrese, también se aconseja volver a realizar test para fusiones *NTRK*. Ver [figura 8](#) en Anexo IV.

En pacientes con CCR, se propone realizar NGS con paneles que incluyan fusiones *NTRK*, bien en el momento del diagnóstico o si se produce progresión tras la primera línea terapéutica. También recomiendan NGS cuando el CCR presenta alta MSI porque en estos casos, la probabilidad de fusiones *NTRK* es mayor, y especialmente si no se han detectado otras alteraciones genéticas como mutaciones *KRAS, NRAS* o *BRAF*. Ver [figura 9](#) en Anexo IV.

Para personas adultas con sarcomas, la identificación de pacientes con fusiones *NTRK* resulta de gran interés dados los malos resultados que ofrecen los tratamientos convencionales. Los TKIs podrían ser, incluso, la primera opción terapéutica.

Por esto, las personas autoras proponen un algoritmo (ver [figura 10](#) de Anexo IV) donde para aquellos sarcomas con mayor probabilidad de presentar fusiones *NTRK*, se recomienda *screening* con pan-Trk IHQ, seguida de NGS para confirmar los casos positivos. En caso de IHQ positiva, el tratamiento con TKIs puede iniciarse al tiempo que se realiza la NGS, dependiendo de si clínicamente es urgente comenzar un tratamiento y no hay otras alternativas. Si la IHQ es negativa, también se recomienda NGS para excluir los FN. En sarcomas con baja prevalencia de fusiones *NTRK*, se recomienda *screening* con IHQ. Si ésta da un resultado positivo, es importante tener en cuenta los FP, y si el resultado es negativo, no será necesario realizar ninguna prueba más confirmatoria.

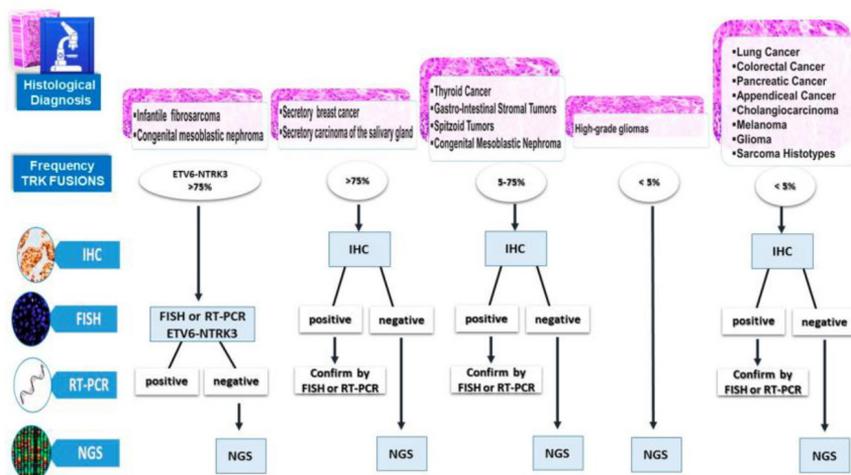
En tumores pediátricos, las personas autoras señalan la utilidad de los TKIs en sarcomas y gliomas, donde los resultados con los tratamientos convencionales son muy pobres. Proponen el uso de NGS cuando no se dispone de suficiente muestra tisular para realizar otros tests. Si la NGS no se realiza de rutina, cualquiera de las otras tres pruebas podría ser utilizada y posteriormente confirmar los resultados positivos con NGS. Las personas autoras proponen un algoritmo (ver [figura 11](#) de Anexo IV) aunque reconocen que dada la heterogeneidad en los tipos de tumores y en el manejo que se sigue con cada uno de ellos, el algoritmo no sería aplicable de la misma manera a todos los tumores ni pacientes.

Zito-Marino y cols (14) realizaron una revisión para valorar el manejo óptimo de los biomateriales y las diferentes pruebas disponibles en la detección de reordenamientos *NTRK*. En relación al tipo de muestras, las personas autoras consideran que la experiencia en los tests para estudiar fusiones *NTRK* es limitada y se basa en tejido FFPE. Para biopsias pequeñas, recomiendan realizar múltiples secciones que permitan realizar tests diagnósticos y predictivos, al tiempo que minimizar los paneles IHQ con el fin de limitar el consumo de bloques de parafina. En relación a muestras citológicas, se recuerda que es posible que sean las únicas muestras disponibles cuando se realiza citología por aspiración con aguja fina para el diagnóstico del tumor. Los autores consideran que podría ser fundamental realizar bloques celulares a partir de material citológico FFPE para estudiar los *NTRK*. La ventaja de utilizar estos bloques celulares frente a los frotis convencionales viene dada por la posibilidad de obtener más secciones. Aconsejan una evaluación cuidadosa del material disponible (secciones de bloques celulares o frotis directos) por parte del patólogo y valorar su adecuación al test diagnóstico que se vaya a realizar. Finalmente, destacan la necesidad de llevar a cabo estudios de grandes series con los que poder generar información definitiva.

Las personas autoras recurrieron a la opinión de expertos multidisciplinarios en lo referido al tratamiento de los tumores asociados a fusiones *NTRK*, destacando el impacto del entrectinib y larotrectinib. Además, señalan la relevancia de

identificar a pacientes con tumores positivos a genes de fusión dado el beneficio clínico observado tras el tratamiento con TKIs. Por ello, proponen un algoritmo de diagnóstico diferencial basado en las características histológicas, la frecuencia relativa las fusiones *NTRK* y las diferentes técnicas disponibles. Las personas autoras sugieren estratificar según el diagnóstico histopatológico y la frecuencia de fusiones *NTRK* de los diferentes tumores y lo representan de forma gráfica, como se muestra en la [Figura 3](#).

Figura 3. Protocolo propuesto por Zito Marino y cols



La NGS sería el método ideal para detectar fusiones *NTRK*, especialmente en pacientes con enfermedad avanzada y escasa cantidad de material para estudio. Recomiendan NGS en gliomas de alto grado, especialmente en población pediátrica, puesto que la IHC no se ha validado para este tipo de tumores porque puede mostrar expresión de Trk de forma fisiológica.

Por otro lado, estas personas autoras señalan que el análisis conjunto de RNA y DNA permitiría evitar errores diagnósticos de fusiones *NTRK*. Sin embargo, reconocen el coste elevado de la NGS como gran desventaja de esta técnica, además de que dicho coste no es predecible pues pueden influir numerosas variables como la preparación de librerías, la estrategia seleccionada (bien sea PCR o captura), los secuenciadores utilizados, el análisis bioinformático y la validación biológica. Por este motivo, proponen la NGS en caso de que las otras técnicas resulten negativas con el fin de identificar posibles FN.

En casos de fibrosarcoma infantil y nefroma mesoblástico congénito, en los que las fusiones *ETV6-NTRK3* se dan con elevada frecuencia, se recomienda utilizar FISH o RT-PCR (por su facilidad de uso y coste bajo) y sólo en los casos negativos, se realizaría NGS de confirmación.

Para los demás tumores donde esta fusión *ETV6-NTRK3* no es frecuente, las personas autoras señalan que la pan-TRK IHC podría ser el método de *screening* de elección puesto que en un solo ensayo es posible detectar todas las fusiones Trk indiscriminadamente; después, aquellos casos IHC-positivos, se podrían confirmar con FISH o RT-PCR mientras que en aquellos IHC-negativos se utilizaría NGS como técnica confirmatoria.

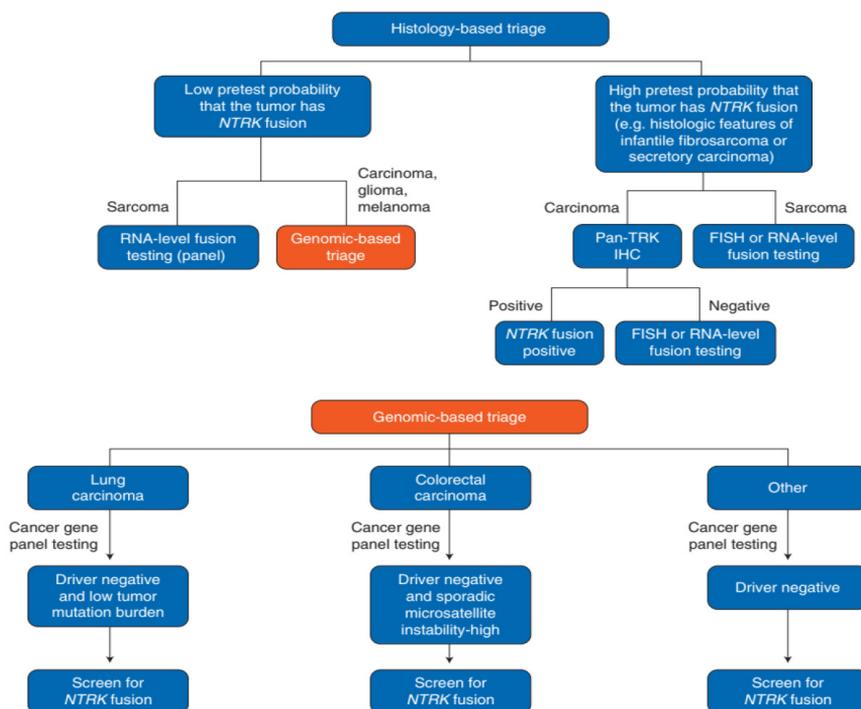
Por último, en este documento se reconoce estar a la espera de los resultados de los estudios que todavía están en marcha, para definir qué pacientes pueden ser candidatos a este diagnóstico, aunque se menciona el caso de la guía NCCN sobre NSCLC en la que ya se ha incluido la recomendación de estudiar genes *NTRK* de fusión en pacientes con metástasis ([127](#),[155](#)).

En la revisión realizada por **Wong** y cols ([63](#)), se recomienda utilizar, al menos, dos tipos de pruebas con el fin de alcanzar un diagnóstico fiable, debido a la gran variabilidad que existe en los pares de fusión en el caso de fusiones *NTRK* y las limitaciones de los tests disponibles para su estudio. Se constata que el método empleado con más frecuencia es la NGS basada en RNA, seguida de FISH con sondas *break-apart* o de IHQ para confirmar los resultados. Algunos ensayos incluidos en esta revisión realizaban *screening* con IHQ con anticuerpos frente a diversas tirosina quinasas para detectar la sobreexpresión de TrkA, TrkB, TrkC, *ROS1* y *ALK*, seguido de NGS basada en RNA. Esta opción de test en dos pasos se presenta como un método rápido y coste-efectivo para el *screening* de los casos negativos a fusiones *NTRK*. Una desventaja descrita por las personas autoras es que una fuerte tinción en el estudio IHQ puede indicar, también, sobreexpresión de proteínas Trk nativas siendo necesario en estos casos realizar la validación mediante NGS. Además consideran que los buenos resultados de los tratamientos agnósticos justificarían el estudio de fusiones *NTRK*, aunque reconocen que para gran parte de los laboratorios, la incorporación del diagnóstico de fusiones *NTRK* de rutina continúa siendo un reto. Para tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK* oncogénicas, señalan que el uso de plataformas NGS ha demostrado ser más coste-efectiva que los métodos tradicionales de IHC, FISH y RT-PCR, y que plataformas como Illumina Trusight y MSK-IMPACT también han demostrado su efectividad para detectar fusiones *ROS1*, *ALK* y *RET*. Por ello, en este documento se respalda el uso de NGS como test diagnóstico preferente de rutina frente a los otros métodos.

Las personas autoras también mencionan las principales desventajas de cada técnica. Así, de la IHQ señalan la eficacia de los anticuerpos, que no siempre conduce a detectar la presencia de fusiones. Sobre FISH, destacan que su interpretación puede ser subjetiva y que es necesario un test para cada gen. De la NGS resaltan la necesidad de experiencia en bioinformática, la variabilidad en el acceso a la prueba y el elevado coste. En resumen, concluyen que la IHQ es una técnica útil para *screening* con la que identificar tumores con fusiones, tras la cual se deben emplear NGS u «otras técnicas robustas» para confirmar el resultado.

Solomon y cols (21) realizaron una exhaustiva revisión sobre cómo identificar pacientes oncológicos con fusiones *NTRK*. Señalan la importancia de tener en cuenta tanto consideraciones económicas como de factibilidad de las pruebas en la elaboración de guías y algoritmos diagnósticos para identificar estas fusiones *NTRK*. Para realizar el *screening* de estos biomarcadores, indican que es fundamental no sólo tener en cuenta el tipo de tumor y la probabilidad pre-test de dichas fusiones, sino también la disponibilidad de metodologías validadas clínicamente y sus valores predictivos positivos y negativos. Proponen el algoritmo para diagnóstico de fusiones *NTRK* que se muestra en la Figura 4.

Figura 4. Algoritmo diagnóstico propuesto por Solomon y cols



Este algoritmo se inicia realizando un primer triaje basado en la histología del tumor, para diferenciar entre tumores raros con alta probabilidad de presentar fusiones *NTRK* y tumores más frecuentes con baja probabilidad de fusiones *NTRK*. Para los tumores con alta probabilidad de fusiones *NTRK*, se propone estudiar los carcinomas mediante pan-Trk IHQ como *screening* inicial seguido de FISH o NGS-RNA si el resultado de la IHQ era negativo. En cambio, para los sarcomas, se descarta realizar IHQ por su baja Sp en estos tumores y la propuesta es realizar FISH o NGS-RNA, incluso se recomienda realizar NGS como primer test usando amplios paneles de genes. En caso de tumores con baja probabilidad (<1%) de fusiones *NTRK*, para los sarcomas consideran que se deben utilizar paneles basados en RNA y para el resto (gliomas, carcinomas y melanomas) proponen un triaje basado en el estudio genómico mediante NGS basada en DNA con amplios paneles de genes que incluyeran *NTRK*. Los autores señalan que la presencia de otras alteraciones permite descartar las fusiones *NTRK* pues suelen ser excluyentes entre sí, de modo que se reduciría el número de casos en los que buscar fusiones *NTRK*. Cuando el resultado del panel de genes de NGS-DNA es negativo, si se trata de pacientes con cáncer de pulmón con baja TMB o de pacientes con CCR con alta MSI, el *screening* de fusiones *NTRK* mediante IHQ o NGS-RNA se considera una prioridad. También se recomienda utilizar IHQ o NGS-RNA para el resto de tumores cuando los paneles de genes NGS-DNA no muestran fusiones *NTRK*.

Otra posibilidad que refieren las personas autoras para aquellos con baja prevalencia sería realizar un *screening* de rutina a pacientes con NGS, que incluya la evaluación de fusiones *NTRK*, o bien con IHQ. Sin embargo, en opinión de las personas autoras, buscar una alteración tan poco frecuente como las fusiones *NTRK* no es eficiente.

El **algoritmo** diagnóstico propuesto por **Penault-Llorca y cols (49)** parte de la categorización de los tumores en dos grupos en función de la incidencia de las fusiones *NTRK*. Ver [Figura 5](#). En aquellos tumores con alta prevalencia, se recomienda realizar FISH. En los casos que FISH ofrezca un resultado positivo a fusiones *NTRK*, se deben valorar las opciones terapéuticas. En entornos sin posibilidad de acceder a FISH, las personas autoras recomiendan la IHQ con anticuerpos antipan-Trk. Si el resultado de la IHQ es positivo, se debe realizar NGS. Los casos negativos con FISH o pan-Trk deben confirmarse con NGS utilizando paneles amplios de genes tanto aquellos que incluyan las alteraciones en *NTRK* como otras alteraciones no-*NTRK*.

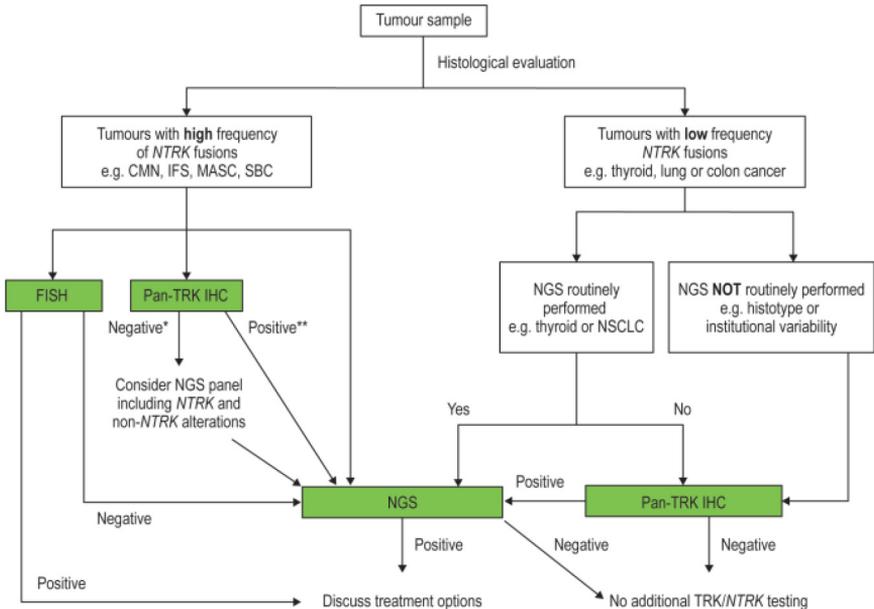
En los tumores sólidos con baja prevalencia de fusiones *NTRK* (entre 5-25%) se recomienda el uso de paneles NGS que incluyan los tres genes *NTRK* y si se trata de tumores con muy baja prevalencia (<5%) de fusiones *NTRK*, la recomendación es utilizar estos paneles de rutina. Si esta tecnología NGS no estuviera disponible

o si no se realiza en la práctica habitual, entonces se aconseja utilizar IHQ pan-Trk para *screening*. Si esta técnica da un resultado negativo, ya no estaría indicado realizar más pruebas, mientras que si el resultado de la IHQ es positivo, se debe confirmar con NGS. Las personas autoras recuerdan que no es suficiente con realizar IHQ puesto que esta prueba detecta tanto las proteínas nativas como las quiméricas de fusión, por lo que se ocasionarían FP y que la IHQ puede detectar una sobreexpresión de proteínas Trk que sean consecuencia de otras alteraciones genéticas en *NTRK* como amplificaciones, que pueden no ser *drivers* oncogénicos.

En ambos escenarios, de tumores con alta o baja prevalencia, si la NGS identifica fusiones *NTRK* se debe considerar administrar los fármacos inhibidores de Trk, mientras que si la NGS es negativa, la propuesta es no realizar más pruebas diagnósticas. En todos los casos en los que esté recomendada la NGS y en concreto si se sospecha la presencia de reordenamientos *NTRK3*, es la NGS-RNA la técnica recomendada frente a la basada en DNA.

En resumen, los elementos que determinan las decisiones en este algoritmo son la etiología tumoral y la disponibilidad de los métodos diagnósticos.

Figura 5. Algoritmo propuesto por Penault y cols



*If histology typical, then confirmation by NGS recommended
**Treatment may be considered concurrently with confirmatory NGS testing

4.2.4. Documentos de consenso de sociedades científicas españolas

En este apartado, presentamos tres documentos de consenso elaborados por diferentes sociedades científicas españolas relacionadas con la tecnología y la patología de interés referentes al diagnóstico de biomarcadores agnósticos de fusión.

4.2.4.1. Documento de consenso sobre identificación de fusiones *NTRK*, de SEOM, SEAP y SEHOP

Las sociedades científicas SEOM, SEAP (Sociedad Española de Anatomía Patológica) y SEHOP (Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica) constituyeron un grupo multidisciplinar de profesionales expertos para elaborar un documento de consenso, en el que se abordaron aspectos diagnósticos, clínicos y terapéuticos de pacientes oncológicos adultos y pediátricos con tumores que albergaban fusiones *NTRK* (9,156). El principal objetivo de este estudio fue optimizar la determinación de alteraciones *NTRK* en algunos tumores malignos **sólidos**. En este documento se recogen los principales desafíos que la detección de estas alteraciones genéticas en la práctica clínica rutinaria puede implicar para en un sistema de salud mayoritariamente público como el español.

Por un lado, Rojo y cols (9,156) resaltan la importancia de asegurar que la muestra sea adecuada, de suficiente cantidad y calidad con la que poder estudiar los biomarcadores, siendo fundamentales el porcentaje de tumor y la cantidad de células tumorales presentes en la muestra. Además, señalan la necesidad de establecer unos «circuitos automatizados» para dar una solución cuando «el resultado de las técnicas sea fallido o incompleto». Con el fin de minimizar el riesgo de resultados nulos o equívocos, se resalta la importancia de mantener los siguientes requisitos preanalíticos y de priorización de las muestras ya propuestos por otros autores (50,66,157): adecuado tiempo de isquemia fría (desde que se extrae la muestra hasta su fijación temprana); correcta conservación en una solución de formol tamponada al 10% durante 6-12 horas para muestras de biopsias pequeñas o de 24-48 horas para las muestras de resecciones quirúrgicas; presencia de al menos 50 células viables para estudios con IHQ o FISH, de un mínimo de 5% de células tumorales para PCR y de 20-30% para NGS; e incluir controles internos positivos y negativos asociados a cada prueba.

Este documento coincide con la guía de ESMO (13) en recomendar el cribado de las fusiones *NTRK* con IHQ y aquellos casos positivos, confirmarlos mediante

una segunda técnica, generalmente NGS. Se señala la importancia de que «los profesionales implicados tengan un conocimiento suficiente de las ventajas y desventajas de cada tecnología» utilizada para la detección de las fusiones *NTRK*. Respecto a esta técnica de IHQ, Rojo y cols (9,154) recuerdan la importancia de intentar asegurar la máxima Se posible pues la prevalencia de las fusiones *NTRK* es muy baja y si un paciente presenta un resultado negativo con IHC, es muy poco probable que se le realicen más pruebas para estudiar si presenta reordenamientos *NTRK* (16). Además, se señalan estos otros requisitos: 1) el anticuerpo de mayor valor es el EPR17341, 2) como tejido de control positivo se debe utilizar el apéndice, 3) el criterio de positividad sería la tinción en más del 50% de las células neoplásicas, con intensidades de al menos 2+ y 4) la IHQ no tiene ningún valor de cribado en tumores con estructuras de diferenciación neural o de músculo liso por la expresión intrínseca *NTRK* no debida a fusiones de este gen.

En relación al uso de **FISH** para detección de fusiones *NTRK*, en este documento se recomienda emplear sondas duales con diseño *break-apart*, y aunque se reconoce la ausencia de estandarización en la interpretación de resultados, se acepta el punto de corte de núcleos positivos del 15-20% en al menos 50 células neoplásicas. Se reconoce el papel de FISH para confirmar o descartar fusiones *NTRK* tras un estudio IHQ positivo, siendo necesario realizar tres procedimientos FISH, uno para cada uno de los genes *NTRK*. Otras dos indicaciones aceptadas de FISH serían confirmar la positividad IHQ nuclear con un FISH para *NTRK3* y detectar la fusión *NTRK* mediante un único test FISH en una neoplasia cuya histología presupone el tipo de fusión, por ejemplo, ante un carcinoma secretor de mama se plantearía realizar FISH para *NTRK3*.

En cuanto a la NGS, los autores consideran fundamental saber si el panel de NGS que se va a emplear incluye los tres genes y qué «anchura» tiene, es decir, el número de parejas de fusión. Si se utiliza un panel basado en DNA y el resultado es negativo, se debe realizar una segunda prueba para confirmarlo, especialmente si la IHQ era claramente positiva. Si se utiliza NGS basada en RNA y el resultado es negativo, se recomienda repetir la prueba en otro bloque de parafina (de la misma muestra de biopsia o de cirugía) o de una muestra distinta, o utilizar una segunda técnica de confirmación. En cuanto a la utilidad de la RT-PCR en la práctica clínica, se considera que es escasa por su menor Se, por la necesidad de conocer de antemano los pares de fusión y por la dificultad de preservar el RNA en el tejido parafinado.

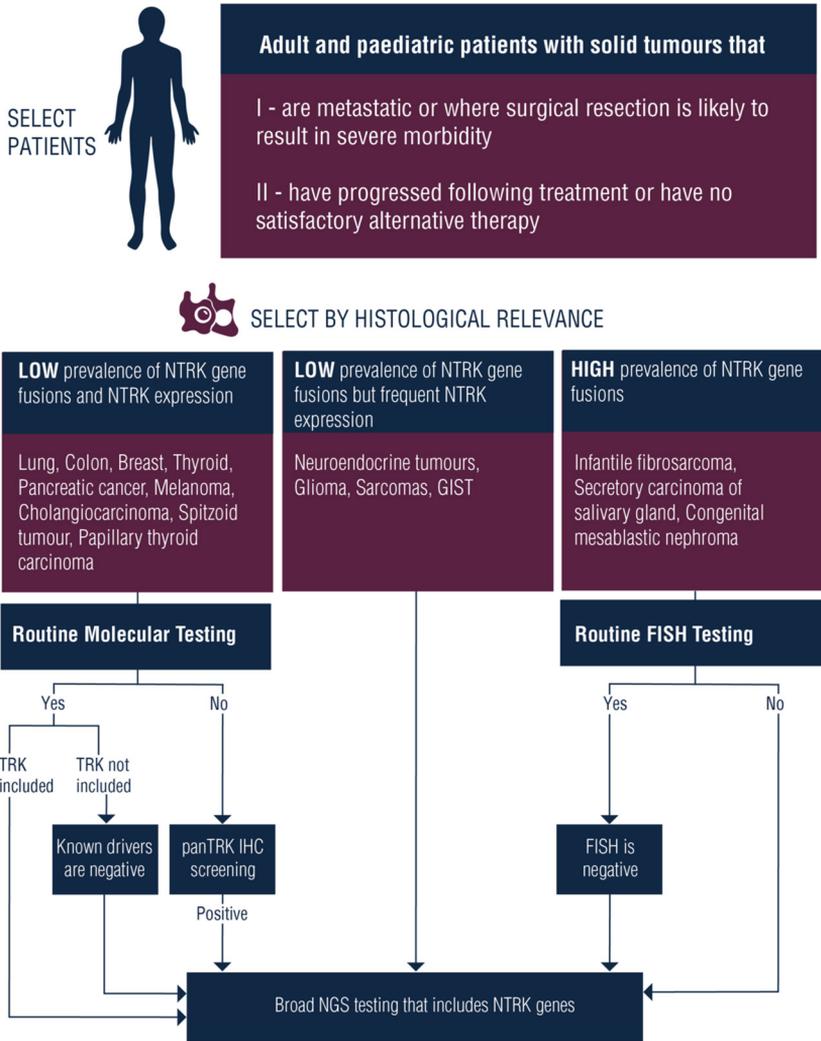
Como pauta general, se recomienda que la determinación de fusiones *NTRK* se decida en función de la probabilidad esperada según la histología del tumor así como de la disponibilidad de las técnicas diagnósticas y de los tratamientos siguiendo las siguientes pautas:

- Para tumores con baja prevalencia de fusiones *NTRK* pero que con frecuencia expresan Trk (como los tumores neuroendocrinos, gliomas, sarcomas o GIST) se aconseja utilizar, de entrada, la NGS con un panel amplio que incluya los genes *NTRK*.
- Para los tumores con baja prevalencia de fusiones *NTRK* y baja expresión de Trk (como en cáncer de pulmón, de mama, colon, páncreas, tiroides), en aquellos laboratorios donde no se realicen determinaciones moleculares de rutina, el cribado se realizará mediante estudio IHQ (pan-Trk) y los que obtengan un resultado positivo, se confirmarán con NGS, utilizando un panel amplio que incluya los genes *NTRK*. Por el contrario, si en el laboratorio se realizan determinaciones moleculares de rutina, se procederá a NGS que incluya *NTRK*.
- Para tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK* (como el fibrosarcoma infantil, el carcinoma secretor de mama o de glándulas salivares y nefroma mesoblástico congénito) se recomienda primero realizar FISH si está disponible en el centro, para confirmar la positividad esperada, y los que tengan resultado FISH negativo, se confirmarían con NGS. Si no es posible realizar FISH, directamente se estudiarían con NGS incluyendo los genes *NTRK*.

En el documento de SEOM, SEAP y SEHOP se recomienda realizar la búsqueda de fusiones *NTRK* en los siguientes casos: 1) en **población adulta** con cáncer avanzado o metastásico o cuando estuvieran indicadas cirugías muy agresivas de alta morbilidad, que hayan progresado tras tratamiento o para los que no existen otras opciones terapéuticas alternativas satisfactorias; 2) en **pacientes pediátricos**, si se trata de tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK*, tanto en el momento del diagnóstico como en las recaídas, y tanto en tumores localizados como metastásicos. También en población infantil se recomienda si la prevalencia de fusiones *NTRK* no es alta pero el tumor es metastásico, de mal pronóstico o si la resección quirúrgica implicara una grave morbilidad, y en los tumores que han progresado o recaído tras tratamiento estándar y no tienen otro tratamiento alternativo; 3) por el contrario, si se tiene conocimiento de que el tumor presenta alteraciones que son mutuamente excluyentes con fusiones *NTRK*, no se recomendaría su búsqueda.

El algoritmo propuesto por las sociedades científicas españolas se representa en la [Figura 6](#).

Figura 6. Algoritmo para identificar fusiones *NTRK*, de SEOM, SEAP y SEHOP



En el caso del cáncer de pulmón, generalmente se realiza cribado molecular y debe incluirse la búsqueda de fusiones *NTRK*. Si no se realiza estudio de estas fusiones pero el análisis de otras alteraciones (*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *EGFR*, *ROS1*, *ALK*, *RET*) resulta negativo, las personas autoras consideran que sería interesante evaluar posibles fusiones *NTRK* pues su presencia es excluyente con esas otras dianas. Concluyen resaltando la necesidad de establecer una estrategia de diagnóstico de las alteraciones de *NTRK*, en la que se deben tener en consideración otros aspectos

como los recursos y técnicas diagnósticas disponibles, el número de casos de cada centro y el tiempo hasta obtener el resultado (recomendado de 7-10 días hábiles). Además, recuerdan la importancia de anticipar el posible desarrollo de resistencias a TKIs de primera generación, como consecuencia de mutaciones secundarias. Por todo ello, proponen la articulación de una red de centros de excelencia con disponibilidad de plataformas de NGS adecuadamente financiadas que garanticen la equidad en el acceso a estas pruebas a pacientes del territorio nacional y que dicha red fuera coordinada desde el Sistema Nacional de Salud (SNS).

4.2.4.2. Recomendaciones para identificar biomarcadores en CCR, de SEOM y SEAP

En 2021 se publicó una actualización de las recomendaciones para la determinación de biomarcadores en CCR elaborada por estas dos Sociedades científicas, SEOM y SEAP ([125](#)). Las personas autoras de este documento de consenso reconocieron el interés clínico existente por la identificación de fusiones *NTRK*, *ALK*, *RET* y *ROSI* en pacientes con CCR dado que su presencia se asocia a una peor supervivencia pero también porque serían pacientes candidatos al tratamiento con TKIs. Por eso se aconseja utilizar técnicas de diagnóstico incluso a pesar de su baja prevalencia. Especialmente consideran recomendado su estudio en el subgrupo de pacientes con presencia de alta MSI o ausencia de mutaciones RAS, siendo la IHQ con pan-TRK la técnica de cribado recomendada y en caso de resultado positivo, la confirmación se debe realizar con FISH, RT-PCR o NGS.

4.2.4.3. Recomendaciones para identificar biomarcadores en cáncer de pulmón, de SEOM y SEAP

En 2023 se ha publicado la guía para el diagnóstico de biomarcadores predictivos en pacientes con NSCLC avanzado, respaldada por SEAP y SEOM ([158](#)), que actualizaba una previa del año 2020 ([66](#)). El NSCLC ha sido objeto de interés desde hace años porque se trata del tumor sólido con el mayor número de dianas terapéuticas potenciales, lo que supone una oportunidad para el manejo de estos tumores de tan alta prevalencia y que suelen tener mal pronóstico con los tratamientos quimioterápicos convencionales.

El primer aspecto que destaca esta nueva guía es lo referente a la muestra tumoral. Se insiste en la importancia de la responsabilidad compartida entre profesionales implicados para disponer de una muestra de suficiente cantidad y calidad, de

modo que el porcentaje de células tumorales disponibles sea el adecuado para realizar estudios moleculares y de IHQ. Las muestras pueden proceder de biopsias o ser muestras citológicas (bien bloques celulares, frotis o biopsia líquida). Señalan, también, que resulta fundamental considerar el tiempo entre su obtención y su fijación, y que se debe fijar en formol al 10% durante 6-12 horas si procede de biopsia o entre 24-48 horas si se trata de resecciones quirúrgicas, además de haber al menos entre 50-100 células viables para estudios IHQ y FISH; y que incluya un mínimo de un 5% de células tumorales para RT-PCR y del 20% para NGS.

En esta guía se considera que los reordenamientos *NTRK*, *ALK*, *RET* y *ROSI* son esenciales para el estudio de pacientes con NSCLC, además de las mutaciones *EGFR*, *KRAS*, *BRAF V600* y *MET*, amplificación *MET* y sobreexpresión PD-L1.

Se recomienda estudiar la presencia de reordenamientos *ALK* en todos los adenocarcinomas, en los carcinomas sin evidencia histológica de ser no-escamosos y en los escamosos siempre que estos últimos se den en pacientes menores de 50 años y/o sin o muy bajo hábito tabáquico. El test indicado inicialmente sería la IHQ, por ser rápido, fiable y coste-efectivo, con los anticuerpos D5F3 (Ventana® *ALK* [D5F3] CDx Assay, Tucson, Arizona, USA) o 5A4 (Novocastra®, Leica Biosystems, Buffalo Grove, Illinois, USA). Para los casos con resultado positivo (fuerte tinción citoplasmática granular) no sería obligatorio realizar una segunda prueba confirmatoria, pero sí se aconseja si el resultado no es concluyente. Como prueba de confirmación se recomienda la NGS-RNA, por su alta Sp y por haber demostrado su utilidad para detectar fusiones cuando otras pruebas han tenido un resultado negativo.

Además, esta guía recomienda el estudio de *ROSI* en pacientes con adenocarcinomas en estadio avanzado (IIIB-IV), independientemente de sus características clínicas, o con carcinomas de células escamosas sólo si se trata de pacientes sin o con baja exposición al tabaco. Se respalda el uso de IHQ como test de cribado por su alta Se, tal como lo recomiendan otras guías (37), exigiendo un mínimo de 20 células tumorales en la muestra a analizar, y el uso de FISH o NGS para confirmar un resultado positivo.

También se recomienda el estudio de reordenamientos *NTRK*, con dos posibles estrategias: una primera estrategia mediante un panel de NGS que permita analizar los tres genes *NTRK* y siempre basado en RNA para evitar FN, y una segunda utilizando la IHQ como técnica de *screening* y posterior confirmación de los resultados positivos con FISH o NGS siguiendo las recomendaciones de la ESMO (13).

Para fusiones *RET*, se recomienda NGS como el método óptimo de diagnóstico, especialmente secuenciación basada en RNA que resulta más sensible que la

basada en DNA, aunque también pueden utilizarse IHQ y FISH, reconociendo la dificultad de interpretación de FISH.

Se reconoce el papel de la NGS por su papel en el estudio de múltiples genes en pacientes con cáncer de pulmón avanzado, minimizando el uso de tejido y permitiendo un diagnóstico en un corto periodo de tiempo. Se recomienda utilizar NGS de forma generalizada y desde el momento inicial del diagnóstico. Se señala la necesidad de seguir un correcto control de calidad en todo el proceso, además de la importancia de una adecuada colaboración multidisciplinar entre profesionales con el objetivo final de establecer la mejor estrategia terapéutica.

4.2.5. Recomendaciones de ESMO

A nivel europeo, el grupo de trabajo de Investigación Traslacional y Medicina de Precisión de ESMO (*ESMO Translational Research and Precision Medicine Working Group*) ha publicado varios documentos de recomendaciones relacionadas con la medicina de precisión. En 2019, sobre métodos para la detección de fusiones *NTRK* (13); en 2021, sobre la detección de fusiones *RET* (41) y en 2020, sobre el uso de la NGS en pacientes con tumores metastásicos (126).

4.2.5.1. Recomendaciones sobre detección de fusiones *NTRK*, de ESMO.

En 2019, ESMO publicó una revisión de los métodos que podían utilizarse para la detección de fusiones *NTRK* (13).

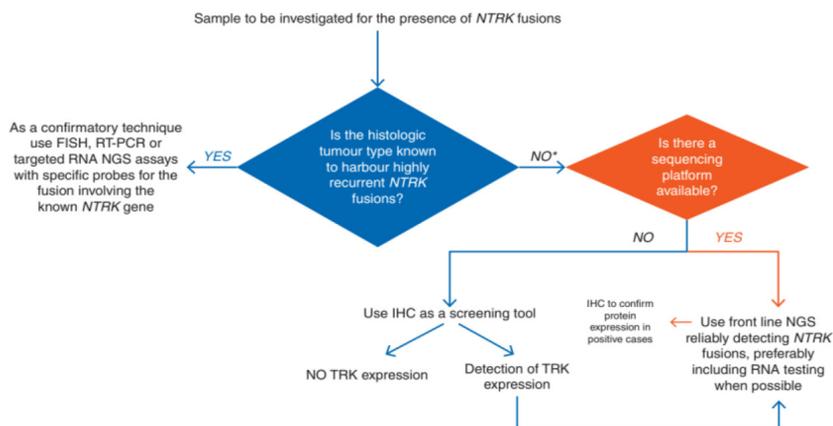
En este documento se señala la necesidad de definir la población que debe ser estudiada y se reconocía la ausencia de un análisis sistemático de fusiones *NTRK* en diferentes tipos de tumores en grandes cohortes de pacientes con cáncer metastásico.

En relación a los tests diagnósticos utilizados para detectar estos genes de fusión, las personas autoras señalan lo siguiente: la IHQ pan-Trk permite un *screening* fiable y eficiente en cuanto a tiempo de respuesta, y la opción de dos pasos se debe tener en consideración en los ensayos clínicos y en la práctica clínica: si con IHQ se detecta la presencia de expresión Trk, se recomienda su confirmación mediante NGS con paneles multigenes, especialmente la basada en RNA. También se indica que en caso de disponer de una muestra de tejido limitada, la recomendación sería realizar directamente NGS y usar la IHQ como técnica de confirmación.

Para aquellos tumores con baja prevalencia de fusiones *NTRK*, proponen una aproximación más conservadora con el fin de no descartar pacientes que sí pudieran presentar estas alteraciones intervenibles. Por ello, consideran que la población que debía ser estudiada era aquella con cualquier tumor maligno en estado avanzado, en particular si se habían descartado otras alteraciones genéticas y, en especial si se trataba de pacientes jóvenes. Se propone el estudio IHQ para *screening* y los casos positivos se debían confirmar con NGS-RNA. Para la interpretación de la IHQ, ESMO respaldó los criterios propuestos por Rudzinski y cols (48): una tinción citoplasmática moderada o fuerte y difusa con pan-Trk se consideraría como marcador subrogado de presencia de fusiones *NTRK1/2* (siempre que en la lesión no haya diferenciación neuronal o muscular) y si la tinción es nuclear, sería indicativa de fusiones *NTRK3*. En el caso de tumores con una expresión de pan-TRK citoplasmática leve, la presencia de fusión *NTRK* debería confirmarse con otros métodos moleculares o citogenéticos en aquellos pacientes potencialmente candidatos a terapia dirigida. El propósito del *screening* con IHQ es diferenciar, de forma rápida, entre las muestras que son negativas a pan-Trk y las que presentan una tinción de leve a moderada, que podrían albergar estas fusiones. Sin embargo, ante el cuestionamiento del coste-efectividad de esta alternativa, por su alto coste y la baja prevalencia de tumores con fusiones *NTRK* (159), el *screening* propuesto es utilizar paneles dirigidos de NGS para identificar alteraciones *drivers* intervenibles, incluyendo posibles fusiones *NTRK*, excepto para aquellos tumores raros con alta prevalencia de fusiones *ETV6-NTRK3*.

La propuesta de ESMO, basada en la literatura, para la detección de fusiones en los genes *NTRK1/2/3*, se recoge en la siguiente [Figura 7](#), tal como fue publicada por las personas autoras.

Figura 7. Propuesta de ESMO para detección de fusiones *NTRK*



Una primera opción basada en el tipo histológico tumoral que denominan *histology-based/confirmation approach*. Se refiere al caso de tener que estudiar fusiones *NTRK* en un tipo histológico concreto donde la presencia de fusiones *NTRK* es muy probable. Para esta situación, se podría utilizar cualquier método diagnóstico, siempre que se validara en un laboratorio CLIA. El estudio mediante FISH con sondas específicas para fusiones del gen *NTRK* o mediante RT-PCR representan la opción más coste-efectiva; también sería factible utilizar la NGS-RNA.

La segunda opción se refiere a tener que detectar fusiones *NTRK* en una población no seleccionada. Es lo que denominan la *histology-agnostic screening approach*. En este caso, consideran dos escenarios posibles:

- a. si no se dispone de paneles de secuenciación de múltiples genes, se recomienda realizar el cribado en dos fases, primero mediante estudio IHQ con pan-TRK (siempre que no exista tejido muscular liso o neuronal) y si el resultado es positivo, entonces se debe enviar la muestra a un laboratorio externo para realizar NGS y confirmar la presencia de fusiones *NTRK*.
- b. si se dispone de plataformas de secuenciación masiva, dependiendo de la carga de trabajo y de los datos de coste-efectividad de cada centro, se puede realizar NGS desde el principio o bien un *screening* en dos pasos comenzando con IHQ seguido de NGS si el resultado de la IHQ es positivo. Si es posible realizar secuenciación como primera prueba, el método *gold standard* sería la secuenciación basada en RNA, siempre que se confirmara una óptima calidad de la muestra de RNA. Los casos positivos de NGS se estudiarían con IHQ para confirmar la expresión de proteínas Trk.

No obstante, las personas autoras señalan que la opción más completa sería la siguiente: i) utilizar secuenciación dirigida basada en DNA (paneles multigenes) en todos los pacientes; ii) en los pacientes con resultado negativo, se procedería a realizar secuenciación basada en RNA (paneles multigenes); iii) se utilizaría IHQ para confirmar que existe sobreexpresión proteica de fusiones *NTRK* puesto que el tratamiento dirigido tiene como diana esas proteínas quinasas.

En el documento de ESMO se presenta una tabla resumen que recoge las fortalezas y debilidades de cada prueba para la detección de fusiones *NTRK*. IHQ, FISH y NGS basadas en DNA o en RNA presentan una alta especificidad; la sensibilidad informada es también alta, salvo para la secuenciación basada en DNA, para la que se considera moderada. Se acepta que las tres técnicas permiten identificar los tres genes de fusión *NTRK* aunque con FISH es necesario utilizar una prueba para cada uno de ellos; IHQ y FISH identifican al par de fusión mientras que esto no es posible con NGS; IHQ y la secuenciación RNA permiten detectar la

expresión proteica resultante de la presencia de estos genes de fusión; y, por último, a excepción de FISH, estarían indicadas para *screening* de genes de fusión *NTRK*.

4.2.5.2. Recomendaciones sobre detección de fusiones *RET*, de ESMO

En 2021, ESMO publicó un documento sobre recomendaciones para identificar fusiones *RET* (41). Tanto en pacientes con CPT como NSCLC, se descartó el uso de IHQ para el estudio de reordenamientos *RET* pues pueden existir niveles altos de expresión de este gen sin que ello indique que se trata de reordenamientos *RET*.

Además mencionan que la prueba habitualmente utilizada para detectar esta alteración genética es FISH, con buenos valores de Se y Sp. Se recomienda el uso de sondas *break-apart* en lugar de sondas de fusión puesto que estas últimas sólo reconocen fusiones con pares conocidos. Sin embargo, se reconocen algunas limitaciones para la interpretación de resultados con esta prueba, además de la importancia de mantener las muestras en un estado óptimo para evitar la degradación del RNA.

Las personas autoras formulan las siguientes recomendaciones para estudiar alteraciones *RET* con el fin de establecer un tratamiento dirigido anti-*RET*:

- escenario A: pacientes con NSCLC, cáncer de tiroides no-medular u otros tumores sólidos y se dispone de muestras tumorales FFPE. Debe realizarse el estudio con NGS, y si esta prueba identifica la presencia de fusiones o mutaciones *RET*, se podrá establecer tratamiento con inhibidores *RET*. Si la NGS no está disponible, se realizará FISH o RT-PCR para estudiar fusiones y Q-PCR (quantitative-PCR) para mutaciones *RET* en los otros tumores sólidos, y ante un resultado negativo, se recomienda el estudio con paneles dirigidos de NGS. No obstante, los autores señalan que las recomendaciones más recientes de ESMO sugieren realizar estudio NGS multigenes en pacientes con NSCLC, incluyendo paneles para detectar fusiones *RET* (126). Además de fusiones *RET*, se recomienda valorar la presencia de mutaciones *RET*, preferiblemente con NGS. En ningún caso se recomienda IHQ.
- escenario B: pacientes con NSCLC, cáncer de tiroides no-medular u otros tumores sólidos pero no se dispone de muestras FFPE. Para estos casos, se recomienda realizar biopsia líquida para estudiar alteraciones *RET*. Pacientes con resultado positivo, serán candidatos a tratamiento con inhibidores *RET*,

pero si no se detectan alteraciones *RET*, entonces sería necesario obtener una muestra tisular para descartarlas definitivamente.

- escenario C: pacientes con CMT para estudiar la presencia de mutaciones *RET*. La recomendación es realizar Q-PCR o NGS en sangre o en esputo. Si la prueba es positiva a mutación *RET*, sería necesario consejo genético para descartar la presencia de MEN2. En caso, de que el resultado sea negativo para mutaciones *RET*, se tomarán muestras de metástasis y se analizarán con NGS si esta prueba está disponible (si no lo está, se utilizaría la Q-PCR) y sólo si el resultado es positivo, se considerará candidato a terapia dirigida con inhibidores *RET*. Se desaconseja el uso de IHQ en este tercer escenario.

4.2.5.3. Recomendaciones de uso de la NGS en pacientes con enfermedad metastásica, de ESMO

Ante la falta de recomendaciones en ese momento sobre el uso de la NGS por parte de sociedades científicas, el grupo de trabajo de medicina de precisión de ESMO publicó un documento en el que se valoraba la utilidad clínica de esta tecnología en diversos procesos tumorales metastásicos (126). Este trabajo fue realizado por un grupo de personas expertas con el objetivo de responder a las siguientes preguntas: ¿debería utilizarse la NGS en la práctica clínica? Si la respuesta era sí, la siguiente pregunta era ¿deberían utilizarse grandes paneles de genes? Para ello, se utilizó la ESCAT que había sido desarrollada por ESMO en 2018 para armonizar y estandarizar cómo informar sobre datos genómicos clínicamente relevantes y que permite establecer el grado de concordancia entre un fármaco y una alteración genómica, de acuerdo a su posibilidad de ser intervenible (86). ESCAT es un marco que clasifica los *targets* de la medicina de precisión basados en la evidencia clínica para ayudar a profesionales sanitarios en la priorización de los potenciales *targets* de uso clínico basado en los resultados de paneles de secuenciación. Ver [Tabla 5](#) de niveles ESCAT en Anexo I. Además, las personas autoras utilizaron los datos del estudio KN158, que evaluaba la eficacia del pembrolizumab en diez tumores diferentes de acuerdo a la TMB.

Consideran que desde la perspectiva de la salud pública: los resultados de los paneles NGS podrían llevar a recomendar el uso de fármacos de elevado coste fuera de las indicaciones aprobadas para el mismo y consideran necesario regular el volumen de procedimientos NGS a nivel nacional.

En relación a las alteraciones genéticas estudiadas en el presente informe, ESMO recomienda estudiar el perfil molecular con NGS para detectar alteraciones de nivel I de la ESCAT en pacientes con NSCLC avanzado. Además, dada la alta frecuencia de fusiones, recomiendan NGS basada en DNA o RNA como opciones más adecuadas. En casos de CCR, no recomiendan realizar NGS de forma habitual, aunque podría ser una alternativa a la PCR si no genera un coste extra en comparación a las técnicas ya implementadas de rutina. Si se utilizan amplios paneles de genes, debe incluirse el estudio de fusiones *NTRK*. Para pacientes con cáncer gástrico metastásico, la detección de fusiones *NTRK* se debería realizar con los métodos estándar más económicos y no se recomienda realizar NGS; esta misma recomendación se dio para adenocarcinoma ductal avanzado de páncreas y para el carcinoma hepatocelular avanzado.

En relación al estudio de fusiones *NTRK*, dado que su frecuencia es muy baja, se recomienda priorizar otras pruebas diagnósticas alternativas, más baratas, para el *screening* de pacientes con fusiones *NTRK* y realizar NGS sólo en tumores donde la prueba estuviera indicada por otros motivos.

La NGS se utiliza en la práctica asistencial con el objetivo de secuenciar genes complejos o grandes y/o múltiples genes en muestras tumorales con el fin de identificar dianas intervenibles y contribuir a la toma de decisiones terapéuticas. Las personas autoras señalan que una de las ventajas de la NGS es que requiere sólo pequeñas cantidades de tejido por lo que el estudio de múltiples genes es posible realizarlo sin necesidad de realizar múltiples biopsias. También remarcan el hecho de que algunos tumores pueden modificarse a lo largo del tiempo, hecho que debe tenerse en cuenta si el estudio genético se ha realizado al principio del diagnóstico.

Finalmente, este documento recomienda que en aquellos centros hospitalarios en los que se realice investigación clínica, se deben incluir pacientes con NSCLC, cáncer de mama y CCR metastásico en programas de *screening* molecular y se les debe proponer el acceso a los nuevos fármacos en el contexto de ensayos clínicos.

4.2.6. Guías norteamericanas

4.2.6.1. Guía de la NCCN para diagnóstico de fusiones *NTRK* en NSCLC

La última guía elaborada por la NCCN sobre NSCLC ([127](#)) señala el impacto que la presencia de las alteraciones genéticas tiene en la selección del tratamiento y la importancia de identificar dichas alteraciones para poder establecer una terapia

dirigida eficaz y evitar los tratamientos que probablemente no vayan a aportar ningún beneficio clínico. Por ello, esta guía recomienda realizar tests para determinados biomarcadores moleculares e inmunológicos para evaluar si pacientes con NSCLC en estadio IV (enfermedad avanzada o metastásica) son candidatos a las terapias dirigidas o a inmunoterapias. Los biomarcadores moleculares predictivos de respuesta favorable a la terapia incluyen genes de fusión *NTRK1/2/3* y reordenamientos *ALK*, *RET* y *ROS1*, entre otros. Se recomienda realizar un estudio molecular que incluya un perfil molecular amplio, con el fin de identificar las alteraciones de cada paciente y elegir el tratamiento más adecuado.

La NCCN ya recomendaba realizar tests para detectar fusiones *NTRK* en pacientes con nesc metastásico en su guía de 2019 ([155](#)).

El estudio molecular se utiliza para identificar *drivers* oncogénicos para los que existen terapias dirigidas disponibles. En pacientes con NSCLC no-escamoso metastásico, esta guía recomienda estudiar la presencia de reordenamientos *ALK* pues sería predictiva de buena respuesta a terapia dirigida con alectinib, brigatinib o lorlatinib (para primera línea); ceritinib sería «otro recomendado» y crizotinib «sólo útil en ciertas circunstancias». Se podría realizar FISH o IHQ (ambos aprobados por la FDA) o NGS.

Esta guía reconoce las limitaciones de la NGS-DNA para identificar algunas fusiones *NTRK1* y *NTRK3*, que podrían solventarse utilizando NGS-RNA. Las personas autoras recomiendan el test para fusiones *NTRK* en pacientes con NSCLC no-escamoso metastásico, dada la eficacia demostrada del larotrectinib y entrectinib en pacientes con fusiones *NTRK* positivos, pero también señalan que los datos clínicos en este tumor son limitados para respaldar esta recomendación. Además, en esta guía se dice que para pacientes con NSCLC escamoso metastásico se debería considerar realizar el test para evaluar la presencia de fusiones *NTRK1/2/3*. Este panel recomienda entrectinib o larotrectinib como primera línea de tratamiento en pacientes con NSCLC metastásico positivo a fusiones *NTRK*. También, si no se habían administrado larotrectinib ni entrectinib como primera opción.

El panel NCCN para NSCLC recomienda testar la presencia de reordenamientos *RET* en pacientes con metástasis, dada la eficacia de diferentes fármacos, en concreto, de selpercatinib y pralsetinib, aprobados por la FDA.

La detección de reordenamientos *ROS1* es un requisito previo a pautar un tratamiento con inhibidores TKI, como el crizotinib. En esta guía se recomienda estudiar la presencia de estos reordenamientos en pacientes con NSCLC no-escamoso metastásico y se debería considerar en aquellos con NSCLC escamoso metastásico. En cuanto al tratamiento de estos pacientes, se recomienda el uso de ceritinib,

crizotinib, entrectinib y lorlatinib. El entrectinib está recomendado como primera línea de tratamiento; también en pacientes tratados con crizotinib o ceritinib tras sufrir progresión de la enfermedad con metástasis cerebrales. En general, se recomiendan entrectinib o crizotinib en monoterapia como primera línea por su efectividad y mejor tolerancia; el ceritinib es considerado como «otra opción recomendada» y lorlatinib se indicaría cuando progresa la enfermedad en pacientes que han sido tratados con cualquiera de los otros tres fármacos.

4.2.6.2. Guía sobre biomarcadores en cáncer de pulmón, de CAP-IASLC-AMP

En 2018, el CAP-IASLC-AMP publicaron la actualización (37) de una guía previa (160), con el objetivo de responder a las siguientes cinco preguntas: 1) qué genes deberían estudiarse de forma rutinaria en pacientes NSCLC no-escamoso en cualquier estadio clínico, 2) qué métodos son apropiados, 3) si hay que testar a pacientes con tumores de células escamosas, de células pequeñas u otros no-adenocarcinomas, 4) qué test debería realizarse en pacientes con alteraciones dianas que hayan progresado tras haber presentado respuesta inicial con el adecuado tratamiento dirigido, y 5) cuál es el papel de analizar el DNA celular libre circulante en el manejo de pacientes con cáncer de pulmón.

En esta guía se clasifican los biomarcadores en tres grupos: un primer grupo de obligado estudio en pacientes con adenocarcinoma de pulmón avanzado que pueden ser candidatos a tratamiento dirigido, y que son los genes *EGFR*, *ALK* y *ROS1*; un segundo grupo de biomarcadores que deberían testarse, que se utilizan para seleccionar a pacientes que pueden beneficiarse de participar en ensayos clínicos (que incluye *RET*, entre otros); el último grupo lo compondrían aquellos biomarcadores que sólo se estudian en el ámbito de la investigación, pero que no son candidatos para uso clínico.

La metodología empleada fue la de las revisiones sistemáticas de la literatura, con límites de fecha de búsqueda entre 2013 y junio de 2015, y las opiniones de un panel de personas expertas (técnica de grupo nominal). Se evaluó la capacidad diagnóstica de los diferentes tests y plataformas de estudio de varias alteraciones genéticas en *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *ROS1*, *RET*, *MET*, *BRAF* y *ERBB2*, así como la respuesta al tratamiento, único o combinado.

La anterior guía del 2013 recomendaba estudiar a pacientes con adenocarcinoma avanzado la presencia de reordenamientos *ALK* mediante FISH, y se aceptaba cualquier algoritmo diagnóstico con adecuada Se y un tiempo de respuesta de

10 días, que se realizara bajo unos estándares de calidad de laboratorio validados. En relación a pacientes en estadio precoz de cáncer de pulmón, en esta guía se consideraba que cada institución debe tomar la decisión que considere más adecuada.

Las recomendaciones de la nueva guía actualizada son las siguientes:

- Se aconseja realizar test para **ROS1** en todos los adenocarcinomas, independientemente de las características clínicas del paciente (nivel fuerte de recomendación). La IHC se puede utilizar como test de *screening* y los casos positivos se tienen que confirmar mediante pruebas moleculares (RT-PCR o NGS) o citogenéticas (FISH) (recomendación basada en la opinión consensuada de expertos), mientras que pacientes con IHQ negativo a **ROS1** pueden darse como verdaderos negativos, dada la alta Se del test. Los reordenamientos **ROS1** generan un oncogen de fusión responsable del desarrollo de un cáncer de pulmón que resulta sensible a tratamiento dirigido, por ejemplo, a crizotinib. Las características clínicas de las personas enfermas (como ser no-fumador, mujer, joven) no deben tenerse en cuenta a la hora de estudiar la presencia o no de **ROS1** pues no aparecen de forma constante en todos los estudios. Se propone comenzar el estudio de otras alteraciones en **EGFR** y **ALK**, y en pacientes con resultado negativo, estudiar la presencia de **ROS1** pues suelen ser mutuamente excluyentes.
- En cambio, recomiendan que **RET** sólo debe estudiarse en el entorno de ensayos clínicos y no de forma rutinaria. Se considera adecuado incluir **RET** en paneles amplios de genes, bien inicialmente o si el test rutinario de **EGFR**, **ALK** y **ROS1** ha ofrecido resultados negativos, y no estudiarlo asiladamente.
- El estudio de **ALK** (y también de **EGFR**) se recomienda (fuerte nivel de recomendación) en pacientes con adenocarcinoma de pulmón independientemente de las características clínicas, y en otros tipos histológicos cuando los datos clínicos sugieran una alta probabilidad de alteraciones moleculares. Para testar **ALK**, se considera que el estudio IHQ es una alternativa equivalente a FISH y, por tanto, aceptable, y se acepta que las decisiones terapéuticas se deben realizar cuando los resultados del estudio IHC sean claramente negativos o positivos, mientras que ante resultados dudosos, se recomienda realizar FISH, RT-PCR o NGS.
- La guía señala que hasta el momento de su elaboración, la FDA no había aprobado el uso de RT-PCR ni NGS como tests de primera opción para seleccionar pacientes que pudieran ser candidatos a inhibidores **ALK**, a pesar de que presentan un rendimiento similar al análisis IHC, con una Sp muy alta para detectar la mayoría de las fusiones **ALK**. Así, se reconoce

que pacientes con resultado positivo, se deberían tratar con inhibidores *ALK*, pero en el caso de resultado negativo deben ser estudiados mediante un método más sensible para excluir otras posibles fusiones.

- La NGS permite estudiar de forma simultánea los tres genes de obligado estudio, es decir, *EGFR*, *ALK* y *ROS1*. Los paneles de secuenciación de múltiples genes son preferibles (opinión consensuada de los expertos) a los tests de un solo gen para identificar otras opciones terapéuticas más allá de *EGFR*, *ALK* y *ROS1*. Además de mutaciones, con esta tecnología es posible detectar fusiones/reordenamientos y alteraciones en el número de copias en los genes diana. Por otro lado, se reconoce que la NGS basada en captura híbrida es preferible para el estudio inicial de pacientes con NSCLC para detectar reordenamientos *ALK* y *ROS1* y otros posibles marcadores genéticos, mientras que para la monitorización y estudio de resistencias secundarias la secuenciación por amplicones sería la técnica preferible.
- En tumores sin componente histológico de adenocarcinoma, se podría realizar el test de biomarcadores moleculares cuando las características clínicas del paciente hagan sospechar con alta probabilidad la existencia de un *driver* oncogénico (opinión de expertos), por ejemplo, el estudio en menores de 50 años sería una «estrategia razonable».
- En cuanto a las muestras tisulares, se recomienda utilizar las muestras FFPE, o muestras frescas congeladas o fijadas en alcohol.
- Por otro lado, se considera que existe una evidencia insuficiente para respaldar el uso de biopsia líquida basada en DNA libre circulante en plasma para el diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón primario, por lo que no se recomienda su estudio. Sólo se recomienda en casos de progresión o resistencia a inhibidores tirosina quinasa *EGFR* (opinión consensuada de los expertos).
- En relación al momento de realizar el estudio de biomarcadores, se acepta que puede ser en el momento del diagnóstico, o en pacientes en estadios avanzados (IIIB y IV) o si se produce progresión de la enfermedad.
- Se recomienda que el tiempo hasta obtener los resultados sea de 2 semanas (10 días laborables).

4.2.6.3. Guía sobre diagnóstico de biomarcadores en cáncer de pulmón, de ASCO

En 2018, ASCO respaldó (128) la guía anteriormente comentada de la CAP-IASLC-AMP de ese mismo año 2018 tras ser revisada por un panel de personas expertas y sólo añadieron pequeñas modificaciones y recomendaciones. En esta guía ASCO se considera que cualquier muestra con adecuada celularidad y bien preservada puede servir para el estudio de alteraciones genéticas, no sólo los bloques celulares. Los métodos diagnósticos para estudiar biomarcadores permiten el análisis en muestras que contengan incluso sólo un 20% de células tumorales. Como recomendaciones nuevas en comparación a la guía del 2013 (160), se dice que en pacientes con adenocarcinoma de pulmón avanzado se debe estudiar el gen *ROS1*, independientemente de las características clínicas del paciente. La IHQ para *ROS1* se puede utilizar para *screening*, pero todos los casos positivos deberán ser confirmados mediante métodos moleculares o citogenéticos. También, como diferencia a la anterior guía, se recomienda estudiar alteraciones *BRAF* en todos los adenocarcinomas en estadios avanzados, independientemente de sus características clínicas. *RET*, *ERBB2*, *KRAS* y *MET* aisladamente sólo se deben estudiar en el contexto de ensayos clínicos o si se incluyen dentro de amplios paneles, bien en el estudio inicial o si el estudio de rutina de los genes *EGFR*, *ALK*, *BRAF* y *ROS1* ha sido negativo.

También el panel de personas expertas de ASCO llega a la conclusión de que el estudio de biomarcadores moleculares se debía realizar en todos los tumores que fueran adenocarcinomas, o si su histología fuera no-escamosos no de células pequeñas y en todos los carcinomas de células no pequeñas en pacientes con características clínicas que indicaran alta probabilidad de *drivers* oncogénicos.

Por otro lado, las personas expertas reconocen la falta de evidencia científica para respaldar el estudio de mutaciones *ALK* en pacientes que hayan sufrido progresión de la enfermedad tras tratamiento con TKI dirigidos a *ALK*.

También reconocen una evidencia insuficiente para utilizar métodos de estudio de DNA libre (cfDNA) en adenocarcinomas primarios de pulmón y que sólo puede indicarse esta prueba cuando la cantidad de tejido disponible es muy limitada para estudiar mutaciones *EGFR*.

4.2.7. Documentos de consenso, guías y/o recomendaciones de otras Sociedades Científicas

4.2.7.1. Consenso canadiense sobre estudio de marcadores y tratamiento de adultos y niños con tumores positivos a fusiones *NTRK*

En 2021 se publicaron sendos documentos de consenso, para adultos (129) y pacientes en edad pediátrica (130). El referido a personas adultas (129) se centró en pacientes con los siguientes cinco tipos de tumores malignos: cáncer de tiroides, CCR, NSCLC, SPB y carcinoma de glándulas salivares. Y el de población pediátrica (130), estudiaba el fibrosarcoma infantil, carcinoma diferenciado de tiroides y gliomas. En Canadá se habían aprobado el larotrectinib, en julio de 2019 para población adulta y pediátrica, y el entrectinib, sólo para población adulta, en febrero de 2020.

En tumores de **tiroides**, se recomienda realizar test de rutina para estudio de fusiones *NTRK1-3* en el momento del diagnóstico si el tumor no es resecable o en estadio avanzado/metastásico para todos independientemente del tipo histológico. Si el tumor es resecable, se estudiaría en casos de recurrencia y en todos los refractarios a la terapia con yodo radiactivo. Como test, se recomienda IHQ pan-Trk seguido de NGS para confirmar los casos positivos o equívocos de IHQ. Además, se recomienda utilizar TKIs como primera opción de tratamiento sistémico para pacientes con fusiones *NTRK*, dados los resultados de tolerabilidad y de tasas de respuesta en comparación al tratamiento estándar.

En pacientes con **CCR** recomienda realizar test para identificar fusiones *NTRK* en todos los tumores *RAS/BRAF* no mutado (*wild-type*) y con alta MSI o dMMR. Se estima que menos de un 5% de pacientes con CCR metastásico requerirá el estudio de genes de fusión *NTRK*. En cuanto al tratamiento, por consenso se determinó que los TKIs se indicarían en pacientes para los que no existan otras opciones alternativas satisfactorias, incluso que sería razonable su utilización como primera línea terapéutica.

En cuanto al **NSCLC**, este documento de consenso considera que sería aceptable realizar el *screening* con IHQ para valorar la expresión de *ALK*, *ROS1*, pan-Trk y PD-L1. Para confirmar los casos positivos pan-Trk y *ROS1* se recomienda realizar NGS. Otra opción sería estudiar los genes *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *NRG1* y *RET*, pues la presencia de mutaciones en esos genes es excluyente de genes de fusión *NTRK*.

Las personas autoras recomiendan la implementación como test de rutina en la práctica asistencial para estudiar la presencia de genes de fusión *NTRK1-3* en

todos los tumores en estadio III/IV con enfermedad localmente avanzada o metastásica. En los tumores no-escamosos se recomienda realizar IHQ para PD-L1 y tests moleculares para estudiar mutaciones en *EGFR*, genes de fusión *ALK*, *ROS1*, *NRG1*, *NTRK* y *RET*, así como para otros genes con conocidos *drivers* oncogénicos. El estudio molecular exhaustivo se recomienda para seleccionar pacientes con carcinomas escamosos con histología mixta o en caso de pacientes fumadores o fumadores leve. Para los NSCLC positivos a fusiones *NTRK* se recomienda el tratamiento con TKIs.

Este documento también recomienda realizar *screening* con NGS y no pan-Trk IHQ en pacientes con **GIST** sin mutaciones *KIT/PDGFR* porque el estudio IHQ se asocia a una leve tinción difícil de interpretar, y dado que el número de pacientes estimado es pequeño, se considera factible utilizar NGS para estos casos. Para los demás subtipos de **SPB** localmente avanzados o metastásicos se recomienda pan-Trk IHQ con posterior NGS para confirmar los casos positivos o no concluyentes.

Para los **carcinomas secretores de glándulas salivales** se recomienda NGS para estudiar fusiones *NTRK1-3* y *RET*, aunque respaldan la posibilidad observada en algunos centros de comenzar estudiando si el tumor es HER2 negativo o receptor androgénico negativo, pues serían excluyentes de fusiones *NTRK*, lo que reduciría en más de un 90% de pacientes que tendrían que ser estudiados para *NTRK*. Cuando no está claro cuál es el tipo histológico, se recomienda realizar NGS incluyendo el estudio de genes de fusión *NTRK1-3* y no se recomienda el uso de pan-Trk IHQ para *screening*. Para pacientes con tumores positivos a genes *NTRK* de fusión se recomienda terapia de primera línea con TKIs.

En población pediátrica con **cáncer diferenciado de tiroides** no resecaable o en progresión y que no responde a la terapia estándar de cirugía y radioiodo, se recomienda utilizar amplios paneles de genes para NGS, incluyendo genes de fusión *NTRK1-3*, *RET* y *ALK*, mutaciones *BRAF*, y mutaciones o sobreexpresión *MET*. Si el tumor es un **glioma**, el estudio dependería de la localización e histología tumorales y la edad del paciente. La pan-Trk IHQ no está indicada pues es normal la expresión de Trk en el tejido del SNC, y se debe realizar NGS-RNA o NanoString. Y para los fibrosarcomas infantiles, la recomendación es realizar a todos NGS-RNA dado que el número de pacientes al año es muy escaso y el estudio resulta factible económicamente.

Tanto para pacientes adultos como para pacientes en edad pediátrica, en el caso de tumores con alta prevalencia de genes de fusión *NTRK*, especialmente de *ETV6-NTRK3*, se puede utilizar una técnica específica para esta alteración genética, bien FISH o RT-PCR, y ante un resultado positivo para fusiones *ETV6-NTRK* y los que tengan resultados negativos, se estudiarán con NGS-RNA de confirmación.

Para los tumores con prevalencias intermedias o bajas de fusiones *NTRK* se recomienda realizar directamente NGS-RNA para todos los *drivers* oncogénicos conocidos, incluyendo los genes *NTRK1-3*. No obstante, los autores reconocían que esta opción no está extendida en Canadá y para aquellos centros donde no es factible, recomiendan *screening* con pan-Trk IHQ y posterior NGS de confirmación si la IHQ da un resultado positivo o equívoco. Respecto al tratamiento, se recomienda el uso de los TKIs como primera opción de terapia sistémica para pacientes sin otras alternativas efectivas o posibles.

Las personas autoras finalizan el documento reconociendo que en el futuro la tecnología diagnóstica a utilizar sería la secuenciación masiva paralela mediante grandes paneles NGS, pero que esta opción no es todavía posible en Canadá. Por ello, señalaron la necesidad de establecer un protocolo para realizar el *screening* de tumores con fusiones *NTRK* de una manera metodológica que pudiera resultar económicamente factible para un sistema sanitario público. No obstante, reconocen la variabilidad encontrada en los diferentes centros de Canadá, tanto en el tipo de tests como en su disponibilidad y sus procedimientos. Por esto, este documento de consenso fue presentado con la intención de ofrecer unos principios generales que debían ser adaptados a las circunstancias concretas de cada laboratorio.

4.2.7.2. Guía sobre el diagnóstico de *NTRK* en tumores sólidos, de JSCO y JSMO

En el año 2020 se publicó la guía elaborada por las Sociedades japonesas de oncología clínica (JSCO) y oncología médica (JSMO) y hematología/oncología pediátrica en relación al diagnóstico de tumores sólidos en estadio avanzado positivos a genes *NTRK* de fusión y al tratamiento recomendado ([131](#)). Para ello, se formularon varias preguntas clínicas y se recogió la evidencia científica existente para cada una de ellas a partir de una búsqueda de literatura en PubMed y la base de datos Cochrane, desde enero de 1980 a agosto de 2019. Tras la revisión sistemática realizada para cada pregunta clínica, profesionales del comité de la guía establecieron unos niveles de recomendación para cada una de las preguntas de investigación. En el momento de desarrollar esta guía, en Japón sólo estaba aprobado el uso de entrectinib.

Respecto a estudiar la presencia de fusiones *NTRK*, en esta guía no se recomienda realizarlo en pacientes con tumores sólidos en los que se hayan identificado otras alteraciones genéticas mutuamente excluyentes de fusiones *NTRK*; en cambio, se considera altamente recomendable su estudio en tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK*; y también se recomienda en pacientes con tumores sólidos

metastásicos o recurrentes, no incluidos en los dos supuestos anteriores, con el fin de valorar la administración de tratamiento con TKIs. Igualmente, se recomienda en tumores con alta frecuencia de presencia de fusiones *NTRK*, incluso cuando sean personas candidatas a tratamiento radical y para pacientes con tumores sólidos en estadio precoz, no incluidos entre los anteriores, para determinar la aplicabilidad de los TKIs.

Es altamente recomendado que los test para estudiar fusiones *NTRK* se realicen antes de iniciar el tratamiento estándar o durante el mismo.

En cuanto al tipo de tests a realizar, la NGS es altamente recomendable para estudiar si pueden administrarse TKIs; no se recomienda utilizar FISH para *screening* de fusiones *NTRK*; y para algunas fusiones (como *ETV6-NTRK3*) puede realizarse FISH o PCR sólo en tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK*. La IHQ se recomienda como test de *screening* pero no para determinar la aplicabilidad de los TKIs.

Respecto al tratamiento, se considera altamente recomendable utilizar los TKIs en tumores sólidos con fusiones *NTRK* cuando no son reseccables o son metastásicos o recurrentes. Y se recomienda su utilización desde el inicio del tratamiento, aunque las personas autoras reconocen la ausencia de estudios comparativos entre estos fármacos y la terapia estándar por lo que aconsejan tomar decisiones de forma individualizada.

En resumen, en esta guía se considera altamente recomendable estudiar la presencia de fusiones *NTRK* al comenzar del tratamiento. También, estudiar mutaciones *NTRK* en pacientes inicialmente sensibles al tratamiento con TRKIs pero que con el tiempo desarrollaron resistencias al mismo, para quienes, además, se considera razonable administrar TKIs de segunda generación, aunque se reconoce la necesidad de más investigación sobre este aspecto.

4.2.7.3. Documento de consenso sobre diagnóstico de fusiones *NTRK* en tumores sólidos, de JSCO, JSMO, ESMO, ASCO y TOS

En 2020, se publicaron las recomendaciones (84) establecidas por consenso de un grupo de 19 personas expertas internacionales reunidos por JSCO en octubre de 2019. Además de profesionales de esta sociedad científica, también participaron otros de JSMO, ESMO, ASCO y de la sociedad de oncología de Taiwan (TOS). El objetivo era estudiar la efectividad de la inmunoterapia anti PD-1/PD-L1 y la

presencia de fusiones *NTRK* como predictora de eficacia frente a los fármacos tumor-agnósticos larotrectinib y entrectinib en pacientes con tumores sólidos. Para este segundo objetivo, el grado de acuerdo entre personas expertas alcanzó el 100% para las siguientes preguntas clínicas: 1) pacientes con tumores sólidos avanzados (no reseables o metastásicos) sin mutaciones/fusiones/amplificaciones *drivers* deberían ser estudiados para determinar si presentan fusiones *NTRK*; 2) pacientes con tumores sólidos avanzados (no reseables o metastásicos) con alta probabilidad de presentar fusiones *NTRK* deberían ser estudiados para determinar si las hay, especialmente, las *ETV6-NTRK3*; 3) pacientes con tumores sólidos avanzados (no reseables o metastásicos) fuera de los dos casos previos deberían ser considerados para hacerles tests de fusiones *NTRK*; 4) pacientes con tumores localmente avanzados y alta incidencia de fusiones *NTRK* se deberían someter a estudio de estas fusiones si se planteara terapia neoadyuvante antes de la resección. Las tres primeras preguntas recibieron un grado de recomendación A y la cuarta, B.

En cuanto al momento oportuno para realizar el test para fusiones *NTRK*, se acepta que se debe estudiar antes o durante el tratamiento estándar de tumores sólidos avanzados y siempre en el contexto de paneles amplios de NGS que incluyan las fusiones *NTRK*. Para esta recomendación hubo un acuerdo del 100% y un grado de recomendación B.

Respecto a los tests recomendados para estudiar las fusiones *NTRK*, se alcanzó un grado de acuerdo del 100% en las siguientes recomendaciones: 1) no se recomienda IHQ para confirmar fusiones *NTRK*, sino que esta técnica sólo se aconseja para *screening*; 2) no se recomienda FISH de rutina pero sí para fusiones *ETV6-NTRK3* en pacientes con alta probabilidad de albergar fusiones *NTRK*; 3) se recomienda la RT-PCR para fusiones *ETV6-NTRK3* si el tumor tiene alta probabilidad de presentar fusiones *NTRK*; 4) se recomienda NGS con paneles que detecten fusiones *NTRK*. El grado de recomendación para las 3 primeras técnicas fue B y para la NGS fue C.

Las personas expertas consideran que tanto las muestras frescas como FFPE pueden ser apropiadas para los tests, siempre que hayan sido adecuadamente fijadas y preservadas. Se señala el especial cuidado que debe tener el RNA por su labilidad. Además, están de acuerdo en que la NGS se convertiría en el futuro en la herramienta fundamental para informar las decisiones clínicas dado que se preve un incremento progresivo en el número de biomarcadores predictivos de buena respuesta al tratamiento.

4.2.7.4. Recomendaciones de la red mundial de sarcomas sobre diagnóstico y manejo de sarcomas con fusiones *NTRK*

Demetri y cols (132) publicaron en 2021 un documento para recoger las recomendaciones de un panel de personas expertas en oncología y patología, con el que guiar el manejo de pacientes con sarcomas positivos a genes *NTRK* de fusión. Proponen un algoritmo diagnóstico teniendo en cuenta el estadio de la enfermedad y los subtipos histológico y molecular del tumor.

Dados los buenos resultados de eficacia y el buen perfil de seguridad de los TKIs en pacientes con sarcomas positivos a genes *NTRK* de fusión, señalan que el estudio de esta alteración genética debe incorporarse en el manejo clínico de pacientes con sarcomas. Se señalan algunos retos como el bajo número de sarcomas con fusiones *NTRK*, los problemas con el tamaño de las muestras, el coste económico de las pruebas diagnósticas, los recursos limitados y la complejidad de integrar las nuevas técnicas moleculares en los algoritmos habituales de diagnóstico. Pero a pesar de todo ello, se reconoce el beneficio de realizar este estudio. La NGS y RT-PCR son las técnicas más recomendadas, pero en este documento se indica que la IHC puede utilizarse como test rápido y más económico para realizar el *screening*.

El estudio de las fusiones *NTRK* podría no ser necesario en pacientes con sarcomas primarios o resecables, pero en casos de alto riesgo de recurrencia sí se aconsejan puesto que aportan una información muy relevante para el manejo terapéutico posterior. También se recomienda en casos localmente avanzados, o si son tumores no resecables o metastásicos que no responden al tratamiento convencional.

En este documento se propone una estrategia diagnóstica en función de la frecuencia de fusiones *NTRK* en los sarcomas. Si ésta es alta, se recomienda FISH, IHQ o NGS. Un resultado negativo de FISH o de IHQ se deberían confirmar mediante NGS mientras que un resultado positivo de FISH o de IHQ se debería confirmar con NGS al tiempo que se administra el tratamiento. Para aquellos tumores de baja frecuencia de fusiones *NTRK*, sólo debería realizarse el *screening* si se sabe que el tumor es negativo para otras alteraciones genéticas que sean mutuamente excluyentes con fusiones *NTRK*.

Se reconoce la necesidad de poner en marcha un estudio prospectivo de pacientes con sarcoma dada la falta de información que todavía se tiene sobre las alteraciones genéticas asociadas a estos tumores que engloban un conjunto de procesos malignos altamente heterogéneo.

Respecto a la terapia con larotrectinib o entrectinib, constataron la falta de estudios comparativos con el tratamiento estándar y que tampoco existen estudios de seguridad a largo plazo. La IHQ y la secuenciación dirigida con paneles que incluyan a los genes *NTRK* de fusión, serían las herramientas de mayor valor diagnóstico en sarcomas.

4.2.7.5. Documento de consenso australiano sobre detección de *ROS1* en NSCLC

Las personas autoras desarrollaron este trabajo con el objetivo de describir la mejor aproximación para identificar reordenamientos *ROS1* en la práctica clínica en pacientes con cáncer de pulmón, de modo que se les pudiera suministrar el tratamiento más específico y a tiempo (34). Se analizaron seis artículos que presentaban la información generada de varios ensayos clínicos realizados entre 2017 y 2019 en los que se administraron TKIs a pacientes con NSCLC avanzados positivos a *ROS1*.

IHQ sería la técnica de *screening* de elección para detectar incrementos en los niveles proteicos de *ROS1*. La revisión realizada confirmaba que la IHQ es efectiva para identificar reordenamientos *ROS1* en pacientes con NSCLC, con valores de Se del 100% y de Sp que oscilaron entre 92-100%. En los casos positivos, estaría indicado realizar FISH, por tanto, FISH se considera la prueba estándar para confirmar estos reordenamientos, mientras que un resultado positivo de IHQ no se considera predictivo de buena respuesta a inhibidores *ROS1*. Además, recuerdan que en Australia, el sistema de salud sólo reembolsa el test FISH en casos de NSCLC no-escamosos en los que la IHQ haya dado un resultado 2+ o 3+ de positividad.

Para FISH, la recomendación es utilizar sondas *break-apart* para estudiar reordenamientos *ROS1* en muestras FFPE de cáncer de pulmón. De hecho, para poder acceder a tratamiento con crizotinib, es un requisito imprescindible tener la confirmación de reordenamiento *ROS1* por FISH. Se considera positivo si al menos un 15% de las células tumorales, con un mínimo de 50 células tumorales, muestra un patrón de separación entre la señal roja y verde de al menos una vez su diámetro o un patrón de señal aislado 3'. Se han descrito algunos FN de FISH, por lo que aconsejan que cada laboratorio debe establecer sus propios *cut-offs*. Además, se reconoce la importancia de realizar el estudio de las alteraciones genéticas en paralelo y no en serie, y que esta pauta va a resultar aún más necesaria en un futuro próximo cuando la detección de determinadas alteraciones genéticas sea imprescindible para establecer la terapia dirigida.

Sobre la NGS recuerdan que es capaz de detectar mutaciones somáticas, indels, fusiones y alteraciones en el número de copias en una muestra de biopsia con una cantidad escasa de células tumorales (tan baja como del 5%). Además, a diferencia de FISH, la NGS permite identificar algunas mutaciones de valor pronóstico como son *ALK V3* o *CD74-ROS1* cuya presencia en pacientes con cáncer de pulmón presupone mayor probabilidad de metástasis cerebrales.

Dada la buena respuesta a la terapia con TKIs observada en los NSCLC positivos a *ROS1*, respaldan el uso de estos fármacos como primera línea en casos de tumores en estadio avanzados, y se recomienda la incorporación de los tests para estudio de los reordenamientos *ROS1* entre las primeras pruebas a realizar en los NSCLC no-escamosos.

4.2.7.6. Documento de consenso sobre diagnóstico molecular en NSCLC de India

Se trata de un documento de consenso basado en la evidencia cuyo objetivo era guiar el diagnóstico molecular de NSCLC avanzado, con el fin de reducir la complejidad del análisis de múltiples genes y minimizar las variaciones en la práctica clínica, y así conseguir un *screening* coste-efectivo que permita orientar el tratamiento personalizado para alcanzar los mejores resultados en salud de estos pacientes en India ([133](#)).

Las recomendaciones de este documento se generaron a partir de la evidencia encontrada en la literatura, pero para los casos de una evidencia publicada inadecuada, las recomendaciones se basaron en la experiencia del panel de expertos que elaboró este documento.

En relación a los reordenamientos *ALK* y *ROS1*, reconocen su presencia en un 3-7% y 1-2% de pacientes indios con NSCLC, respectivamente, y las fusiones *RET*, también se presentaban en un 1-2%. La fusión más prevalente de *ALK* se da con el gen que codifica la proteína *EML4*, apareciendo sobre todo en pacientes no fumadores con adenocarcinoma. Los reordenamientos *ROS1* con los genes *CD74*, *EZR*, *SLC24A2* y *FIG* se dan especialmente en mujeres, jóvenes, no fumadoras y con adenocarcinoma.

El panel de personas expertas concluye que en todos los pacientes con NSCLC de tipo adenocarcinoma se debe realizar el estudio de biomarcadores moleculares. No se alcanzó consenso respecto a los pacientes con tumores escamosos, aunque sí aceptaron que para aquellos con tumores adeno-escamosos o escamosos pero con

características clínicas de alto riesgo de presentar algunas de estas alteraciones, se podía tomar la decisión de realizar su estudio de forma individualizada.

En cuanto a los biomarcadores que deberían estudiarse, se acepta que se deben incluir mutaciones *EGFR*, reordenamientos *ALK* y *ROS1* y sobreexpresión PD-L1, bien de forma simultánea o secuencial según el criterio del oncólogo y dependiendo de las posibilidades económicas, pues se reconoce que el elevado coste del estudio supone una limitación en el acceso a estos tests. No obstante, se recomienda realizar este estudio genético por su relevancia clínica y porque en casos de progresión ofrece una alternativa terapéutica.

Por el contrario, concluyen que no se debían incluir otros genes (*BRAF*, *MET*, *RET*, *HER2* y *KRAS*) para los que no hay terapias dirigidas, y que sólo debían estudiarse en caso de progresión tumoral tras haber estado sometido a tratamientos dirigidos frente a *EGFR*, *ALK* o *ROS1*. Sí se admite la opción de incluir el estudio de ciertos genes a medida que se vayan desarrollando terapias dirigidas frente a ellos.

Respecto al momento adecuado para realizar el test de biomarcadores moleculares, los expertos señalan que debe ser una decisión individualizada. Los momentos más habituales son 1) en el diagnóstico inicial, 2) en estadios precoces del tumor o 3) cuando se dan recidivas o progresiones tumorales. En los estadios precoces, en pacientes que se someten a cirugía, la toma de una muestra adecuada de biopsia es una buena opción por si sufre progresión tumoral con el tiempo. En el caso de pacientes que se someterán a resección radical, no sería obligatorio realizar estudio de biomarcadores. Para pacientes que sufren una recurrencia tardía, las personas expertas recomiendan interpretar cuidadosamente muestras previas, pudiendo ser necesario repetir la biopsia.

Para el estudio de reordenamientos *ALK*, se recomienda el uso de IHC con el anticuerpo D5F3, mientras que para los de *ROS1* se recomienda FISH. En entornos con limitación de recursos, se puede emplear IHC como *screening*, seguido de FISH para confirmar los casos de resultado incierto o negativos en pacientes con alta probabilidad clínica. Además, se recomienda un tiempo de respuesta de ambas técnicas inferior a 7 días.

El panel de personas expertas señala el papel crucial del personal de anatomía patológica en la fase preanalítica, en el almacenamiento y procesamiento de las muestras, dada la importancia que el aislamiento de DNA y la adecuada cantidad de carga tumoral tienen para el correcto resultado de los tests. La forma más habitual de conservar las muestras tumorales de biopsia es como FFPE. Consideran que el tiempo entre la obtención de la muestra y su fijación no debe exceder de 30 minutos, y que ésta debe realizarse entre 6-48 horas antes de su inclusión en parafina

para asegurar la adecuada preservación del DNA. Si se realiza una microdissección manual, se debe garantizar que al menos un 20-30% de tejido tumoral sea extraído para análisis molecular. También se insiste en que deben seguirse cuidadosamente los procedimientos operativos estándar de cada laboratorio para asegurar la mejor calidad de la muestra.

4.3. Estudios sobre los tratamientos agnósticos

4.3.1. Estudios estimativos de efectividad comparada

Ya se han descrito las limitaciones de los ensayos clínicos realizados en humanos con inhibidores de *NTRK*, debido al número limitado de casos. Se han realizado algunas aproximaciones metodológicas para intentar comparar la efectividad del larotrectinib y el entrectinib, así como entre estos fármacos agnósticos y el tratamiento estándar. El objetivo de estos estudios fue superar las limitaciones de trasladar a la clínica los datos de los ensayos en cesta y facilitar la incorporación de estos fármacos a la práctica habitual.

Algunas personas autoras ([134](#)) han realizado **comparaciones indirectas** entre los datos de series históricas de pacientes con tumores sólidos que recibieron tratamiento convencional en estados avanzados o metastásicos (sin información sobre la presencia o no de fusiones *NTRK*) sometidos al tratamiento convencional, frente a los datos agregados de los ensayos clínicos de larotrectinib. A pesar del número pequeño de pacientes, se observa que la ORR del larotrectinib es superior a los tratamientos históricos. Otras limitaciones que deben señalarse de este estudio son la ausencia de ajuste por variables demográficas o clínicas y que no se dispone de confirmación de fusiones *NTRK* en las series históricas.

García-Foncillas y cols ([135](#)) han realizado un estudio con la metodología de **comparación indirecta ajustada con emparejamiento (*matching-adjusted indirect comparison, MAIC*)** entre larotrectinib y entrectinib en pacientes oncológicos con fusiones *NTRK*. Se identificó la población adulta tratada con uno u otro fármaco en los ensayos clínicos y el emparejamiento se basó en las variables que podían ser predictivas de algunos resultados como la edad, ECOG, fusiones *NTRK*, enfermedad metastásica, etc. Los resultados muestran que el larotrectinib se asocia a una mayor OS en comparación al entrectinib y que la DoR del larotrectinib es significativamente mayor (mediana de 32,5 vs 12,9 meses, respectivamente; $p < 0,05$). La PFS del larotrectinib es mayor, aunque sin alcanzar significación estadística (mediana de 19,3 vs 11,2 meses; $p = 0,07$). La ORR es similar para ambos fármacos (67,3%

vs 63,5%; $p=0,63$), aunque la CR es significativamente mayor con larotrectinib (20,3% vs 6,8%; $p<0,05$). Ambos fármacos han demostrado ser bien tolerados por las personas tratadas; la reducción de dosis e interrupción del tratamiento debido a los EA se ha dado en un 8% y 2%, respectivamente, de pacientes tratados con larotrectinib, y en un 27% y 4%, respectivamente, de pacientes tratados con entrectinib (89,95). El MAIC ha ofrecido los siguientes resultados: EA serios ocasionados por larotrectinib del 6,2% y por entrectinib del 10%, y una interrupción del tratamiento en el 0,5% y 4% pacientes tratados con larotrectinib y entrectinib, respectivamente.

Otros estudios (136-138) han realizado **estudios de efectividad comparada intrapaciente** entre los fármacos agnósticos y el tratamiento previo, teniendo como control al propio paciente, con el objetivo de poder realizar dichas comparaciones y la ventaja de no necesitar realizar ensayos clínicos, dada la limitación para reclutar una población adecuada para ese tipo de estudios. Para ello utilizaron el denominado **GMI** (*growth modulation index*). El GMI es una nueva medida de resultados, que puede utilizarse en ensayos de un solo brazo para realizar análisis de comparación intrapaciente. El GMI es el cociente entre la PFS con el nuevo fármaco y el TTP (o fallo del tratamiento) con el tratamiento previo en la misma persona, de modo que permite estudiar el beneficio aportado por el nuevo fármaco en comparación al anterior. Se acepta un punto de corte para GMI de $\geq 1,33$ que indicaría que se produce un 33% de mejoría en la PFS en comparación al tratamiento previo y se considera que existe actividad clínica significativa (161). Otra ventaja del GMI es que se relaciona con la progresión del tumor, que puede ser más relevante como variable de resultado que la respuesta tumoral.

El estudio publicado en 2020 por Italiano y cols (136) incluye un análisis exploratorio y retrospectivo de las bases de datos de los ensayos clínicos iniciales con los que se había decidido la aprobación del larotrectinib por la FDA y EMA (NCT02122913; SCOUT (NCT02637687) y NAVIGATE (NCT02576431). Se comprueba que el larotrectinib mejora la PFS en la mayoría de pacientes con tumores positivos a fusiones *NTRK* en comparación a la terapia previa. Entre los 72 pacientes considerados para el análisis, el GMI mediano es de 2,68 (rango de 0,01-48,75), teniendo el 65% de pacientes un GMI $\geq 1,33$ y el 26%, un GMI ≥ 5 . El análisis de Kaplan-Meier estima un GMI mediano de 6,46; la PFS mediana para larotrectinib es mayor que el TTP mediano del tratamiento previo (no estimable [NE] vs 3,0 meses; hazard ratio [HR]: 0,220; IC 95%: 0,146-0,332). Entre pacientes con metástasis ($n=53$), el TTP mediano del tratamiento previo es de 4,4 meses (IC 95%: 2,8-6,1) y la PFS del larotrectinib es de 19,3 meses (IC 95%: 10,9-NE), con un HR de 0,228; IC 95%: 0,146-0,357.

Un año más tarde, Hong y cols (137) publica los resultados de un nuevo análisis de las bases de datos ampliadas de estos mismos ensayos clínicos, con un total

de 140 pacientes. El estudio de supervivencia de Kaplan-Meier estima un GMI mediano de 8,9 (IC 95%: 6,2-17,4). El 74% de estos pacientes presenta un GMI $\geq 1,33$, el 5% presenta valores de GMI entre 1 y 1,33 y en el 21% de pacientes el GMI es < 1 . El TTP mediano con el tratamiento previo es de 3,0 meses (IC 95%: 2,1-3,5) y la PFS mediana con larotrectinib es de 33,0 meses (IC 95%: 16,6-34,9), con un HR: 0,22; IC 95%: 0,16-0,30. Las personas autoras concluyen que el estudio en un periodo de tiempo más largo permite observar que casi tres cuartas partes de pacientes tratados con larotrectinib tienen una PFS superior a la que se alcanza con el tratamiento previo más reciente, lo que lleva a validar el uso de este fármaco en pacientes con cáncer positivos a fusiones *NTRK*.

Krebs y cols (138) publicaron en 2021 un estudio de comparaciones intrapaciente de la eficacia del entrectinib basado en los datos de 71 pacientes con tumores positivos a fusiones *NTRK* del ensayo STARTRK-2. Entre pacientes que habían progresado tras tratamiento (n=38), el GMI mediano es de 2,53, de quienes el 65,8% tienen un GMI $\geq 1,3$. La ORR es de 60,5% para entrectinib vs 15,8% para el tratamiento previo, y la PFS mediana del entrectinib es superior a la del tratamiento previo (11,2 vs 2,9 meses).

En ausencia de estudios comparativos directos o de meta-análisis entre ambos fármacos tumor-agnósticos en cáncer de pulmón, algunos autores (139) han utilizado un modelo de supervivencia particional para proyectar la efectividad comparada a largo plazo del larotrectinib (n=12) frente a entrectinib (n=10) como tratamientos de segunda línea en pacientes con NSCLC metastásico. Tras 13 meses de seguimiento, se estima que el larotrectinib alcanza mejores resultados: en el caso base, la mediana de años de vida (LYs) pre-progresión es de 5,4 tras tratamiento con larotrectinib y de 1,2 con entrectinib; y la mediana de LYs totales es de 7,0 y 1,8, respectivamente. La media de LYs y años de vida ajustados por calidad (QALYs) pre-progresión es de 7,5 y 5,0, respectivamente, para larotrectinib y de 1,9 y 1,2 para entrectinib. La media de LYs y los QALYs totales son de 9,2 y 5,8, respectivamente, para larotrectinib y de 4,4 y 2,4 para entrectinib.

Suh y cols (140) también utilizaron un modelo de supervivencia particional, con tres estados de salud mutuamente excluyentes: libre de progresión, progresión y muerte, para realizar un estudio comparativo entre la efectividad del larotrectinib vs entrectinib en CCR, SPB y metástasis cerebrales con fusiones *NTRK*. Con este modelo estimaron la PFS, la OS, los LYs y QALYs. La proporción de pacientes en cada estado de salud se determinó extrapolando las curvas de PFS y OS. A los LYs y QALYs obtenidos del modelo se les aplicó un descuento del 3%. Se hizo un análisis de sensibilidad de una vía (*one-way*) para determinar la influencia de los parámetros en el modelo y un análisis de sensibilidad probabilístico con 10.000 simulaciones para obtener los intervalos de credibilidad al 95% (ICr 95%) alrededor del

estimador de LYs y QALYs. Se observan mejores resultados en salud en aquellos pacientes que habían recibido larotrectinib frente a pacientes tratados con entrectinib, aunque la magnitud del beneficio es diferente en función del tipo de tumor. Con larotrectinib se consiguen 1,58 LYs (1,17 QALYs), 5,81 LYs (2,02 QALYs) y 1,01 LYs en el CCR, SPB y metástasis cerebrales. Por todo ello, las personas autoras concluyen que en el caso de pacientes que sólo tienen una oportunidad para elegir un TKI, se debería optar por el larotrectinib para maximizar los resultados en salud, en años de vida ganados. Esta decisión es particularmente relevante en pacientes con metástasis cerebrales porque su pronóstico es peor.

Estos mismos autores también han publicado en 2022 otro estudio (141) de efectividad comparada a largo plazo entre larotrectinib y la terapia estándar en población adulta con tumores metastásicos de CDT, CCR y SPB positivos a genes *NTRK* de fusión, utilizando la misma metodología de modelo de supervivencia particional. Se realiza una actualización de datos a julio de 2020 en 19 pacientes con CDT, 8 pacientes con CCR y 23 con SPB. Pacientes tratados con larotrectinib presentan una mayor supervivencia y QALYs en comparación a los pacientes que habían recibido el tratamiento estándar (datos tomados de la literatura publicada). Pacientes con CDT, tratados con larotrectinib muestran una media de LYs totales de 12,62 (ICr 95%: 5,19-16,12) y una media de QALYs totales de 9,05 (ICr 95%: 4,26-12,17). En comparación al tratamiento con lenvatinib, el larotrectinib consigue 8,26 LYs adicionales y 6,12 QALYs adicionales; y en comparación al sorafenib, de 7,15 y 5,87, respectivamente. Los resultados con larotrectinib en pacientes con CCR son los siguientes: unos LYs totales de 2,11 (ICr 95%: 0,84-5,10) y QALYs totales de 1,60 (ICr 95%: 0,71-3,60). En comparación al regorafenib, el larotrectinib incrementa a 1,26 LYs y 1,00 QALYs y en comparación a trifluridina/tipiracil, 1,27 LYs y 1,00 QALYs. En pacientes con SPB, la media de LYs totales es de 7,07 (ICr 95%: 3,31-12,34) y la media de QALYs totales es de 2,59 (ICr 95%: 1,45-4,25); lo que supone 5,56 LYs y 1,99 QALYs adicionales en comparación a los tratamientos convencionales. Las personas autoras reconocen las limitaciones metodológicas del análisis realizado además del escaso número de pacientes considerados, y destacan la necesidad de realizar estudios comparativos entre el larotrectinib y el tratamiento habitual y que se debe incluir un seguimiento a largo plazo.

Ante la ausencia de estudios comparativos directos de **tratamientos en NSCLC positivos a fusiones *ROS1* y *ALK***, Chu y cols (142) publicaron un estudio de comparaciones indirectas ajustadas por emparejamiento, utilizando un *propensity score*, entre entrectinib y crizotinib en pacientes con NSCLC positivos a fusiones *ROS1* y *ALK*. Para ello, realizaron dos revisiones sistemáticas: una sobre pacientes con NSCLC y fusiones *ROS1* (búsqueda de literatura hasta marzo de 2019, de la que se seleccionaron 11 ensayos no comparativos y estudios observacionales de 38 referencias) y otra revisión sobre NSCLC positivo a *ALK* (búsqueda de literatura

hasta octubre de 2018, de la que fueron seleccionados 8 estudios en 20 referencias). El análisis ha permitido demostrar que el entrectinib presenta respuestas significativamente mejores, con una ORR significativamente superior a la del crizotinib, que oscila entre 2,43 y 2,74 en tres escenarios diferentes analizados. También el entrectinib se asocia a supervivencia más prolongada, la HR sugiere que el entrectinib reduce el riesgo de muerte en comparación al crizotinib, con resultados de HR que oscilan entre 0,47 y 0,61 en los tres escenarios contemplados de presencia de metástasis cerebrales. También la HR alcanzada con entrectinib es superior a la de los otros fármacos estudiados (pemetrexed con platino seguido de pemetrexed de mantenimiento). En cuanto a la necesidad de interrumpir el tratamiento por EA, es menor con entrectinib que con crizotinib (los valores de OR oscilan entre 0,79 y 0,90, aunque estas estimaciones se consideran inciertas pues los IC 95% de las OR eran muy anchos) y también es menor que con QT, aunque en este caso sin alcanzar significación estadística. En resumen, el entrectinib permite mayores respuestas tumorales y un incremento en la OS en comparación a los demás fármacos, por lo que las personas autoras consideran que sería la alternativa terapéutica más recomendada para pacientes con NSCLC positivos a fusiones *ROS1*, incluyendo aquellos con metástasis cerebrales en los que sería la mejor opción por su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica.

4.3.2. Revisiones sistemáticas

En 2020, Chu y cols ([143](#)) publicaron una revisión sistemática y meta-análisis sobre efectividad clínica y evidencia económica de los inhibidores multiquinasa TRK e inhibidores TRK selectivos (entrectinib y larotrectinib), y sobre la calidad de vida de pacientes con tumores positivos a fusiones *NTRK* tratados con estos fármacos. La búsqueda de la literatura se realizó en octubre de 2018 (para recuperar artículos sobre evaluación clínica, económica y de calidad de vida) y se amplió en enero de 2019 (para artículos de costes o uso de recursos). Se escrutaron Medline, Medline Epub Ahead of Print, Embase y EBM Reviews, además de abstracts de congresos de los 3 años anteriores a la fecha de búsqueda, listados de referencias de las publicaciones incluidas, informes de ETS y registros de ensayos clínicos. Se seleccionaron tanto TKIs como los inhibidores selectivos entrectinib y larotrectinib. Tras el proceso de selección de estudios, finalmente incluyeron 27 de efectividad clínica. No se localizaron estudios de evaluación económica ni de calidad de vida. Los 27 estudios clínicos eran ensayos de un solo brazo, 14 de ellos sobre larotrectinib (de 4 ensayos clínicos), y 7 sobre entrectinib (de otros 4 ensayos clínicos). La eficacia clínica y seguridad sólo se encontró disponible para larotrectinib, entrectinib y ropotrectinib. Chu y cols ([143](#)) intentaron realizar un meta-análisis de comparaciones indirectas para estimar la efectividad de los diferentes fármacos, pero

resultó imposible por la heterogeneidad entre las poblaciones incluidas y el escaso número de pacientes, que tampoco permitió estratificar los resultados por tipo de tumor. Además, las personas autoras señalan el reto que suponía realizar análisis robustos en este entorno tumor-agnóstico con el fin de comparar la efectividad de estos fármacos dirigidos frente a la terapia estándar. Aunque la evidencia encontrada sugiere que ambos fármacos son efectivos, se pone de relieve algunos aspectos a considerar, como el desarrollo de resistencia adquirida a dichos fármacos, o la dificultad para determinar el fármaco *gold standard* con el que comparar la nueva terapia, pues en el caso de tratamientos tumor-agnósticos existen múltiples terapias estándar disponibles dependiendo del origen del tumor; además, habitualmente se aceptan como variables de respuesta la OS y PFS, pero es posible que ninguna de ellas esté disponible en estos estudios.

El análisis conjunto de los artículos sobre efectividad clínica del larotrectinib (n=55 pacientes) muestra una ORR de 75% (IC 95%: 61-85) y después de un año, el 55% de pacientes se mantiene libre de progresión de la enfermedad y el 90% están vivos. Los EA más frecuentes (93%) son de grados 1/2 y los de grados 3/4 no se relacionan con el fármaco. Los EA llevaron a una reducción de dosis en el 15% de pacientes y en ningún paciente ha sido necesario suspender la medicación.

La ORR para los estudios de entrectinib (n=54 pacientes), tras 15,5 meses de seguimiento, es del 57,4% (IC 95%: 43,2-70,8) y se informa de una CR en el 7,4%. La mediana de DoR es de 10,4 meses (IC 95%: 7,1-NE) y la mediana de OS de 20,9 meses (IC 95%: 14,9-NE). La mediana de PFS global es de 11,2 meses (IC 95%: 8,0-14,9), mayor que en pacientes con metástasis en SNS (7,7 meses [IC 95%: 4,7-NE]). En cuanto a seguridad, los EA surgidos son de grados 1/2 y reversibles; los EA relacionados con el tratamiento llevan a una reducción de dosis en el 27,3%, a la interrupción de dosis en el 25,4% y es necesario finalizar el tratamiento en 3,9% de pacientes.

4.3.2. Guías de evaluación de tecnología, de NICE

En el año 2020, NICE publicó tres *Technology appraisal guidances*, dos sobre larotrectinib y entrectinib para el tratamiento de tumores sólidos positivos a fusiones *NTRK* (144,145) y una tercera sobre el entrectinib para el tratamiento de pacientes con NSCLC avanzado positivo a *ROSI* (146).

En la guía para estudiar el larotrectinib (144), las personas autoras reconocen la efectividad de este fármaco en estos tumores con fusiones del gen *NTRK*, aunque señalan la ausencia de comparaciones con otros fármacos en los ensayos clínicos.

También señalan que sólo se ha demostrado su efectividad para determinados tipos de tumores con fusiones *NTRK* pero no para otros. Por último, consideran que las estimaciones de coste-efectividad para larotrectinib son muy inciertas porque los datos estudiados proceden de poblaciones diferentes a las que se presentan en la práctica clínica en el *National Health System* (NHS) y, además, porque existe gran incertidumbre sobre la supervivencia a largo plazo cuando la enfermedad progresa. El larotrectinib podría ser un recurso potencialmente coste-efectivo en el NHS con el coste que presentaba en el momento de realizar el estudio, y por ello recomiendan su utilización a través del *Cancer Drugs Fund* mientras se dispone de nuevos datos para recomendarlo para la práctica rutinaria.

Por otro lado, en esta guía se señala que no existe evidencia sobre si la presencia de las fusiones *NTRK* supone un pronóstico diferente en comparación al pronóstico de tumores sin estas alteraciones.

La evidencia clínica recogida para esta guía procede de poblaciones con diferentes tipos de tumores que habían sido sometidos a diferentes tratamientos previos; la mayoría, a terapias sistémicas, pero otros a ningún tratamiento previo. Además, recuerdan que todos los tumores sólidos pueden tener, potencialmente, fusiones *NTRK*, aunque estas alteraciones no son habituales en los tumores más frecuentes, por lo que sería necesario un *screening* en muchas personas para identificar a pocos pacientes que se beneficiarían del tratamiento con larotrectinib.

Cuando se realiza este informe, en el NHS no se realizaban tests para estudiar las fusiones *NTRK* de forma rutinaria para todos los tumores sólidos, pero sí para los carcinomas secretores de mama y los análogos de mama, y este *screening* se realizaba mediante técnicas de IHC. La secuenciación del genoma completo sí estaba disponible para población pediátrica con cáncer y sarcomas aunque para la confirmación del resultado es necesario un test DNA o RNA, por ejemplo, la NGS.

Se señala que la Sp del test para identificar la presencia de las fusiones *NTRK* debe ser muy alta para descartar su presencia y concluir que pacientes no se iban a beneficiar del tratamiento con larotrectinib. Esto es especialmente importante en tumores muy frecuentes en los que las fusiones *NTRK* tienen baja prevalencia, donde el número de resultados FP podría superar los VP si el test no es lo suficientemente específico. Recogen la opinión de personal clínico experto que consideraban que la NGS-DNA y NGS-RNA con un test confirmatorio de DNA o RNA o un estudio IHC cuando el resultado es positivo, sería adecuado y minimizaría el número de resultados FP.

Además, realizan un análisis agregado de tres ensayos clínicos (NAVIGATE, SCOUT y LOXO-TRK-14001), de un solo brazo, sin grupo control y con un total

de 102 pacientes (9 con tumores del SNC y 93 con otros tumores). Señalan el sesgo de selección de pacientes de estos ensayos, cuya distribución por tipos de tumor no es representativa de la distribución en la práctica clínica del NHS, con un número muy alto de tumores con alta prevalencia de fusiones *NTRK*, probablemente con un bajo número de resultados FP. Debido a este sesgo de selección de pacientes y los tipos de tumores detectados y a la falta de datos respecto a los tratamientos recibidos, se considera que la evidencia clínica no es generalizable a la población atendida por el NHS y que son necesarios más datos, especialmente sobre los tipos de tumor y la distribución de pacientes.

La falta de datos lleva a las personas autoras de este informe NICE a considerar que no es posible estimar de forma fiable el beneficio del larotrectinib a largo plazo. Otra limitación señalada se refiere a la ausencia de evidencia respecto a si la respuesta al larotrectinib es similar en todos los tipos de tumores o si algún tipo de tumor podría no responder al fármaco. Además, el tipo histológico del tumor puede afectar al tipo de fusión *NTRK* e implicar la presencia de otras mutaciones. Se informa de una baja tasa de respuesta si la fusión era en *NTRK2* mientras que alcanzaba el 82% si se trataba de *NTRK3*. Por otro lado, se informa de una tasa de respuesta diferente en función del par de fusión. La fusión más frecuente es la *ETV6-NTRK3*, con una respuesta global del 84%, superior a las demás, aunque no se ha constatado que esta respuesta sea similar para los diferentes tipos de tumores, por lo que se concluye que no es apropiado asumir que la respuesta va a ser similar en todos los casos. También se señala que la respuesta de los tumores del SNC al larotrectinib es muy inferior a la respuesta de otros tipos de tumores. Para evaluar la respuesta de estos tumores se emplean los criterios RANO (*response assessment in neuro-oncology*), en vez de utilizar los criterios RECIST, pero la cirugía y radioterapia (RT) pueden ocasionar cicatrices e inflamación local que dificultan la evaluación mediante dichos criterios. Esto podría explicar la baja tasa de respuesta en comparación a la de otros tumores. Otras posibles causas de la baja respuesta de estos tumores del SNC podrían asociarse a una baja dosis de larotrectinib que alcanza al SNC, a que los tumores primarios del SNC respondan menos al fármaco o a la alta proporción de fusiones en el gen *NTRK2* presentes en estos tumores.

Adicionalmente, señalan los siguientes motivos por los que dichos estudios no se deben generalizar a la población atendida por el NHS: la sobre-representación de tumores raros y con alta prevalencia de fusiones *NTRK* que se asocia a mayor respuesta al fármaco, la supervivencia estimada se refiere a los tipos de tumor con mayor tasa de respuesta y algunos tipos de tumores están sobre-representados en el cálculo de los valores de utilidad, lo que implica mayor incertidumbre en las estimaciones de coste-efectividad y todos los modelos utilizaban análisis agregados no-ajustados que no pueden modelizar una población generalizable a la práctica clínica del NHS.

En uno de los ensayos considerados (SCOUT), se analizaba población infantil con tumores que son potencialmente curables, pero se incluyeron en una proporción muy superior a la observada en la práctica clínica y, además, señalaron otras limitaciones al análisis de supervivencia y de curación de pacientes como un periodo muy corto de seguimiento, la ausencia de análisis con un brazo control, el escaso número de pacientes y la elevada censura de datos, lo que resultaban en un modelo fuertemente sesgado en favor del larotrectinib y, por ello, en una marcada incertidumbre respecto a la curación de pacientes.

En los ensayos analizados en este informe de NICE, los datos de PFS y OS son incompletos. También se considera que la evidencia de los valores de utilidad post-progresión del larotrectinib es débil, basada en la evaluación de un escaso número de pacientes, la mayoría población pediátrica. Se considera que el larotrectinib cumplía los criterios NICE para ser considerado un tratamiento que alarga la vida al final de la vida, pero se reconoce la incertidumbre en su definición, que los datos existentes son escasos y analizados a muy corto plazo, y que existe heterogeneidad entre los diferentes tipos de tumores.

En esta guía se hace referencia a un ratio de coste-efectividad incremental (ICER) de £16,155 por QALY ganado con el larotrectinib en comparación a la práctica clínica.

En cuanto a los tests diagnósticos para detección de fusiones *NTRK*, se sugiere que la IHC debería ir seguida de NGS para confirmar los resultados positivos. La NGS es necesaria para establecer que una persona es o no candidata a larotrectinib. Las personas autoras mencionan que el NHS se encontraba en un momento de cambio hacia la implementación de la NGS para enfermedades localmente avanzadas o metastásicas y estiman que en uno o dos años, el NHS dispondría de suficientes laboratorios a pleno rendimiento donde realizar la NGS a pacientes con tumor sólido localmente avanzado o metastásico.

Por toda la incertidumbre existente, se concluye que el larotrectinib no se puede recomendar para uso rutinario y que se necesitan nuevos ensayos para analizar a más largo plazo la supervivencia asociada a este fármaco e incluir pacientes adicionales con tumores sólidos de otros sitios no incluidos en ensayos previos, que permitan aportar más datos para resolver dicha incertidumbre, analizar la heterogeneidad en la respuesta, así como su seguridad y eficacia.

Se reconoce la incertidumbre clínica respecto a la población, a la modelización de los tratamientos de comparación, la estimación de supervivencia y los valores de utilidad. Sin embargo, se considera que los datos de los ensayos son prometedores con buenas tasas de respuesta y que el larotrectinib podría mejorar la OS

y la PFS. Además, que posiblemente sea coste-efectivo, aunque esto debe confirmarse con nuevos datos.

En agosto de 2020, NICE publica un documento sobre el entrectinib para el tratamiento de tumores sólidos positivos a fusiones *NTRK* (145). Este trabajo reconoce que estos tumores responden al entrectinib (disminuye el tamaño tumoral) pero que su efectividad frente a otros fármacos no se ha comparado en ensayos clínicos, que se había observado su efectividad para algunos tipos de fusiones *NTRK* pero no había evidencia de si también lo era para otros tipos. Se reconoce la falta de datos de seguimiento a largo plazo y la incertidumbre en cuanto a su posible coste-efectividad por la escasez de datos económicos. Por ello, se concluye que no se puede recomendar el uso de entrectinib en la práctica rutinaria en el NHS.

También en la misma fecha, NICE publica otro documento de evaluación sobre entrectinib en NSCLC positivos a fusiones *ROS1* (146). Las recomendaciones surgieron de un estudio pequeño (STARTRK-2) con una mayoría de pacientes que habían recibido tratamiento previo y donde no se comparaba al entrectinib con otros fármacos. El comité de evaluación considera que el subgrupo de pacientes positivos a *ROS1* de este estudio es representativo de la práctica clínica del NHS. La evidencia sugiere que el entrectinib resulta efectivo para reducir el tamaño tumoral (alta tasa de respuesta global) y para enlentecer la progresión de la enfermedad. También se informa de una alta tasa de respuesta global para metástasis intracraneales. En otros dos estudios (ASCEND-4 y PROFILE 1014) se observó que entrectinib era clínicamente efectivo, pudiendo alargar la vida más de 3 meses en comparación a pemetrexed y QT con platino. Además, se considera como coste-efectivo pues el coste-efectividad estimado para el entrectinib estaba dentro del rango que NICE considera como uso aceptable de recursos del NHS para «tratamientos al final de la vida», por debajo de £50,000 por QALY ganado. Por todo ello, la conclusión es recomendar el uso de entrectinib como tratamiento de pacientes con NSCLC positivos a fusiones *ROS1*.

4.3.4. Documentos de consenso

En el documento anteriormente mencionado de las recomendaciones de la JSCO, JSMO, ESMO, ASCO y TOS (84), en lo referente a las preguntas relacionadas con el tratamiento, las personas expertas consideran que los TKIs son altamente recomendables en pacientes con fusiones *NTRK* y que deben utilizarse cuando no existen otras opciones alternativas satisfactorias (grado de acuerdo del 100% y grado de recomendación A para ambas recomendaciones).

4.4. Estudios económicos

4.4.1. Informe de Scottish Medicine Consortium

En el informe realizado por el *Scottish Medicine Consortium* (SMC) para el NHS de Escocia se recoge la autorización de uso del entrectinib en población adulta o pediátrica de ≥ 12 años con tumores sólidos positivos a fusiones *NTRK* que no hubieran recibido tratamiento con inhibidores *NTRK* o no tuvieran otras opciones terapéuticas satisfactorias. El requisito previo a su administración, es disponer de una prueba validada para identificar las fusiones *NTRK* y así poder seleccionar a pacientes candidatos al tratamiento. En este informe se presenta el **análisis de coste-utilidad** realizado por Roche que comparaba el uso de entrectinib con el mejor tratamiento de soporte (BSC, *best supportive care*) (148) (147). Se utilizó un **modelo de supervivencia particionado** con tres estados de salud (pre-progresión, progresión y muerte) y se adoptó un horizonte temporal de 30 años. Para las estimaciones clínicas se tomaron los datos agregados de los estudios ALKA, STARTRK-1 y STARTRK-2, y STARTRK-NG en población pediátrica. Se encontró una PFS media y OS media para entrectinib de 15,96 meses y 33,12 meses, respectivamente, y para el BSC de 3,59 meses y 16 meses, respectivamente. Los costes incluyeron aquellos relacionados con la adquisición y administración de los fármacos, el tratamiento de EA y los cuidados terminales. Los costes del diagnóstico de fusiones *NTRK* se basaron en la estimación del número necesario a cribar para identificar pacientes candidatos al tratamiento. Generalmente, el cribado se realizaba con IHQ seguido de NGS como prueba de confirmación. También el coste de los tests diagnósticos se asignó a pacientes tratados con BCS basados en el uso estándar de IHQ. Se estimó una media ponderada de coste del diagnóstico por paciente elegible, basada en la proporción de pacientes con cada tipo de tumor para los estudios de entrectinib. Para el caso base se estimó un ICER de £37,398/QALY. Tanto a los costes como a los QALYs se les aplicó una tasa de descuento del 3,5%. El análisis de sensibilidad de una vía de entrectinib versus BSC fue más sensible a la variación de $\pm 20\%$ en los valores de utilidad de PFS, costes de diagnóstico de la enfermedad y OS. El ICER estimado inferior (£26,498) correspondía a un escenario donde se excluían los tests diagnósticos para ambas ramas, y el ICER superior (£59,906) se observó en el caso de incluir los tests diagnósticos sólo en la rama del entrectinib.

Respecto al posible impacto presupuestario, se estimó que podría haber un número total de 47 nuevos pacientes al año con tumores avanzados o metastásicos positivos a fusiones *NTRK* en Escocia. De ellos, se estimó que sólo 22 serían candidatos a terapia dirigida con entrectinib en el primer año y que ascendería a 30 pacientes a los 5 años.

4.4.2. Informe de ETS del Norwegian Institute of Public Health (NIPH)

El objetivo final del informe de ETS elaborado por NIPH (79) fue establecer el tratamiento agnóstico más adecuado y estudiar los resultados en salud de pacientes. Ningún estudio encontrado para este informe analizaba la utilidad clínica de los tests, por ello, se estimaron los costes asociados a las técnicas diagnósticas en el ámbito noruego utilizando un **modelo de micro-costes**. Los costes relevantes fueron expresados en coronas noruegas, en 2021. Se estimó que, al año, entre 10.000-11.100 pacientes con tumores sólidos en estadio avanzado podrían ser elegibles para estudio de fusiones *NTRK* y de ellos, unos 520 podrían presentar fusiones *NTRK* con alta prevalencia. Se consultó con varios centros hospitalarios los costes directos, que incluían consumibles y los costes asociados al personal sanitario. Se estimaron los costes de IHQ, de FISH y de un panel de NGS que pudiera detectar los tres genes *NTRK*, *ROS1*, *ALK* y *RET*. No se incluyeron datos sobre RT-PCR porque, según los expertos consultados, esta prueba no se utilizaba en Noruega para estudiar estos genes. También estas mismas personas expertas consideraron que la realización de los tests de forma simultánea en muestras de varios pacientes podía ahorrar recursos y, por tanto, reducir los costes asociados a dichos tests. En este informe se presentan resultados de costes para 1 paciente y para 10 pacientes, para cada una de las tres técnicas. Para IHQ y FISH los costes son los de estudiar un solo biomarcador, pero lo habitual es tener que hacer tests sucesivos en los que se estudie un gen diferente cada vez, lo que implica más tiempo de estudio y disponer de suficiente muestra para cada test, que no siempre es factible. Además, se señala que la presencia de genes de fusión *NTRK* puede no ser la única mutación oncogénica *driver* y que algunas personas puedan ser candidatas a más de una terapia dirigida al mismo tiempo.

Se consideraron dos escenarios, ambos en pacientes con NSCLC avanzado. En uno de esos escenarios, se presentan los costes de los diferentes métodos para detectar *ROS1* y *NTRK* y en el segundo, para *ROS1*, *NTRK* y *ALK*. Los costes de NGS se estimaron para el panel OncoPrint Focus que permite estudiar hasta 6 biomarcadores de forma simultánea.

Este estudio muestra que la NGS es, probablemente, la prueba de mayor coste si se utiliza en una sola persona enferma, debido a los costes de los reactivos. Sin embargo, como esta técnica permite realizar una secuenciación masiva en paralelo de varios biomarcadores y para varios pacientes de forma simultánea, los costes se reducen significativamente. Se estima que la NGS suponía un coste de unas 16.000 coronas noruegas por muestra, pero cuando esta prueba se realiza para estudiar varios genes y varias muestras (de *NTRK*, *ROS1*, *RET* y *ALK* en pacientes con

NSCLC) los costes se reducen a unas 2.000 coronas por paciente. A pesar de esto, se reconoce que, por el momento, la NGS sigue siendo la técnica de mayor coste en comparación a las otras tres.

Al estimar unos 520 pacientes anuales candidatos para estudio de fusiones *NTRK* en tumores con alta prevalencia de estas fusiones, los costes anuales ascenderían a unos 1,2 millones de coronas. En tumores con baja frecuencia de estas fusiones *NTRK*, se debería utilizar primero IHQ y después NGS-RNA de confirmación, y el coste estimado oscilaría entre 16,1-18,0 millones de coronas.

Dado que los costes dependen en gran medida del número de pacientes que vayan a ser estudiados y que el análisis de una sola alteración genética resulta totalmente ineficiente, se señala que en la estimación de costes para identificar fusiones *NTRK* con NGS, se debe tener en cuenta que el estudio no se va a realizar de forma aislada, sino analizando muchas alteraciones simultáneamente. Y para finalizar, indican que se preve la inclusión de la NGS como parte del proceso diagnóstico de rutina de ciertos tumores, como el NSCLC.

4.4.3. Estudios originales sobre costes de las pruebas diagnósticas y tratamientos agnósticos

Entre las publicaciones primarias, cabe mencionar el estudio de Marino y cols (149), realizado en Francia, sobre el coste asociado al uso en la práctica clínica de paneles dirigidos de NGS en el diagnóstico de cáncer. Se recogieron datos de 15 laboratorios de referencia en genética molecular, y se calculó el coste medio total de la NGS por paciente. Este coste fue estimado mediante un método de **micro-costes** con los recursos consumidos recogidos *in situ* en cada laboratorio, desde la perspectiva de proveedores en salud. También se consideraron los costes de otros pasos post-secuenciación como los del análisis bioinformático, la validación técnica, la validación biológica y otros costes adicionales no-específicos.

El coste total de los paneles dirigidos de NGS para diagnóstico de tumores genéticos somáticos (datos de 7 laboratorios) osciló entre 376 € a 968 € por paciente, siendo el coste medio total de 607 € (\pm 207). Estos mismos resultados para tumores genéticos germinales (de 8 laboratorios) osciló entre 322 € y 727 €, con un coste medio total de 550 € (\pm 140). La generación de las librerías de DNA resultó ser el paso que consume el mayor coste y también el que conlleva más tiempo de trabajo. Los costes más elevados en el proceso de secuenciación fueron los relativos a los consumibles, que supusieron el 48% del coste en los tumores somáticos y 41% en

los germinales, y en segundo lugar, los costes adicionales que supusieron el 30% y 32%, respectivamente, del coste total. Se señala que era esperable que los costes de consumibles, de validación técnica y los costes adicionales, se vean reducidos con el tiempo, mientras que los costes más relevantes serán los relacionados con el análisis bioinformático de los resultados y no los de su generación mediante la NGS.

El análisis de sensibilidad permitió observar que una reducción del 25% de los consumibles conducía a un descenso del 15% en el coste total de la NGS en los tumores somáticos y del 13% en los germinales. Por el contrario, otros costes, como los de compra de los equipos, no modificaban los costes totales.

En 2019 Pages y cols ([150](#)) publicaron un estudio prospectivo sobre el coste de la terapia oncológica dirigida basada en los resultados del diagnóstico molecular a partir de los datos del ensayo MOSCATO (Molecular *Screening* for Cancer Treatment and Optimization). El estudio analiza 529 pacientes y el diagnóstico molecular incluye varias etapas, desde la biopsia del tumor al trabajo del comité de tumores multidisciplinar. Se hizo un **análisis de micro-costes** incluyendo los costes directos desde la inclusión del paciente hasta la progresión, desde la perspectiva del *French National Health Insurance*. La NGS se realizó utilizando el IonTorrente (Life Technologies); las librerías se generaron utilizando Ion AmpliSeq Library kit 2.0. El coste total del diagnóstico molecular fue de 2.396 €. Se encontraron 220 (42%) pacientes con blancos intervenibles, 105 (20%) fueron tratados con terapia dirigida. El coste de esta terapia basada en el estudio molecular fue de 31.269 € por paciente. Sólo un 6% del coste se imputa al diagnóstico mientras que los fármacos antitumorales suponen el 54% del total y las hospitalizaciones, el 35%.

Beresford y cols ([151](#)) analizaron los elementos clave que deben considerarse cuando se evalúan los costes de los tests genómicos para identificar a pacientes candidatos a ser estudiados mediante tecnologías histología-independientes (HI) en un entorno de evaluación de tecnologías sanitarias. Estas técnicas diagnósticas se utilizan en tumores malignos avanzados o metastásicos que expresan biomarcadores agnósticos. El hecho de identificar a estos tumores conlleva importantes repercusiones en el coste-efectividad de la tecnología. El coste de los tests para identificar a personas candidatas a tecnologías HI afecta al coste-efectividad del tratamiento. De hecho, la identificación de estas personas supone un reto considerable pues de su presencia depende la administración posterior del tratamiento. Las pruebas para estudiar la presencia o no de los biomarcadores deben realizarse en pacientes con tumores sólidos avanzados o metastásicos ([144,145](#)). Por este motivo, consideran imprescindible que el uso de estos tests se extienda y, al mismo tiempo, que se incremente la inversión en los centros diagnósticos que llevan a cabo dichos tests. En el caso de tumores con fusiones *NTRK*, consideran que los elementos clave a tener en cuenta en la evaluación de los costes de las tecnologías HI son los siguientes: las

diferencias en la prevalencia del biomarcador, el tipo de test, las estrategias diagnósticas adoptadas, la disponibilidad de los tests y la línea de tratamiento en la que se decide realizar el test. En este estudio, se estima que el coste de una NGS-RNA para identificar a 1 individuo con fusiones *NTRK* oscila entre £377 y £282,258. Este coste fue calculado a partir del número necesario a cribar (NNS) que es el inverso del producto de la sensibilidad por la prevalencia de las fusiones *NTRK*, y asumiendo que el coste de una NGS basada en RNA es de £350 (coste obtenido de un centro de genómica de UK). El NNS para NGS-RNA y para IHQ oscila entre 1,1 y 1,2 del carcinoma secretor de mama a 806,5 y 917,5 del NSCLC, respectivamente. Se estima que para la estrategia diagnóstica propuesta por ESMO (*screening* con IHQ y confirmación de los casos positivos con NGS), el coste de identificar a 1 individuo positivo a fusiones *NTRK* oscila entre £540 del carcinoma secretor de mama y £198.585 del NSCLC. Dado que la prevalencia de las fusiones *NTRK* varía considerablemente (de <0,1% a >90%) según el tipo de tumor, los costes para identificar pacientes con estas alteraciones, también varían de forma significativa. Por este motivo, de cara a tomar decisiones en cuanto a reembolso, una opción podría ser priorizar la realización de los tests en aquellos tumores con alta prevalencia de dichas alteraciones o aquellos que pudieran beneficiarse más del tratamiento. Puesto que los paneles de genes de NGS permiten identificar un alto número de alteraciones genéticas en un solo test, será posible identificar pacientes candidatos a diferentes terapias dirigidas compartiendo costes al realizar una sola prueba, contribuyendo de esta manera a mejorar el coste-efectividad de los tests genómicos y pruebas HI.

En 2022, se ha publicado un **estudio de coste-efectividad** (152) del larotrectinib frente al comparador tratamiento estándar que incluía múltiples tipos de tratamientos. Los principales resultados son un incremento de 5,61 QALYs e incremento de 7,48 años de vida, un coste incremental de 232.260 €, lo que genera un ICER de 41.424 €/QALY (sustancialmente por debajo del punto de corte de 80.000 €/QALY considerado en Los Países Bajos para patologías con alta carga de enfermedad). El análisis probabilístico indica que el larotrectinib es coste-efectivo frente al comparador en el 88% de las iteraciones. Este análisis de coste-efectividad permite concluir que el tratamiento de estos pacientes con larotrectinib ofrece unos resultados muy ventajosos, tanto en la mejora en años de vida ganados como en calidad de vida. Este estudio no incluyó los costes asociados de los tests para determinar *NTRK*.

Otro **estudio de coste-efectividad** se ha realizado para comparar el entrectinib frente al tratamiento estándar en pacientes oncológicos, en Países Bajos (153). Se comparó una estrategia en la que se realizaban tests para determinar la presencia de fusiones *NTRK* y posterior tratamiento con entrectinib en los positivos y tratamiento estándar para los negativos a dichas fusiones frente a la estrategia de no realizar test para fusiones *NTRK* y administrar el tratamiento estándar a todos los pacientes. Las personas autoras utilizaron un modelo de árbol de decisión (para reflejar

la fase de diagnóstico) y de microsimulación (para reflejar el tratamiento). Se realizó el estudio desde la perspectiva social de Holanda y se utilizaron unas tasas de descuento para los efectos del 1,5% y del 4% para los costes. Los tests realizados fueron IHQ y/o NGS-RNA. El análisis del caso base ofrece los siguientes resultados: el diagnóstico de fusiones *NTRK* y tratamiento con entrectinib de pacientes positivos y con terapia estándar de los negativos se asocia a una ganancia de QALY de 0,0043 con un incremento en costes de 732 € por paciente en comparación a la segunda estrategia de no hacer tests y aplicar tratamiento estándar a todos. El ICER resultante es de 169.957 €/QALY y el beneficio monetario neto incremental es de -388 €. Si se excluyen del análisis tanto los costes como los efectos en salud asociados al test de *NTRK*, el ICER se reduce a 38.563 €/QALY. Esta diferencia tan grande se debe a la baja prevalencia de las fusiones *NTRK* en general, lo que supone que un elevado número de pacientes se somete a los tests pero tan sólo un porcentaje muy pequeño (0,29%) de pacientes resultan positivos al test y después reciben el entrectinib. Se concluye que con la evidencia disponible, el entrectinib no resulta coste-efectivo en comparación al tratamiento estándar, pero que si los tests genéticos para identificar a pacientes candidatos a este fármaco se incluyeran en la práctica clínica habitual (como era el caso con el larotrectinib) entonces, el entrectinib podría ser coste-efectivo.

5. Discusión

5.1. En relación al diagnóstico de biomarcadores de fusión

El estudio de las características genéticas y moleculares de los tumores ha supuesto un cambio significativo en el manejo terapéutico de personas con patología oncológica, convirtiéndose en uno de los pilares de la denominada medicina de precisión. La disponibilidad de tratamientos agnósticos efectivos, con un claro beneficio clínico y con un buen perfil de tolerabilidad, para los tumores con fusiones de *NTRK*, *ALK*, *ROS1* y *RET*, ha llevado a que la identificación de estos biomarcadores sea una necesidad asistencial. Es imprescindible la correcta selección de pacientes que pueden beneficiarse de estos fármacos para conseguir la mayor eficiencia de los tratamientos, al tiempo que se garantice la sostenibilidad del sistema sanitario. Por esto, las estrategias utilizadas cumplen una doble finalidad, diagnóstica y terapéutica, pues la identificación de los biomarcadores agnósticos de fusión se realizaría con la finalidad de apoyar la toma de decisiones informadas respecto al uso de fármacos dirigidos frente a las dianas biológicas presentes en cada caso.

En este informe se ha realizado una revisión de las principales propuestas de algoritmos diagnósticos, guías y recomendaciones de diferentes sociedades científicas o grupos de interés implicados, de diferentes países y contextos sanitarios, sobre el uso de las pruebas diagnósticas IHQ, FISH, RT-PCR y NGS para el *screening* los biomarcadores predictivos de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROS1* y *RET*, con el fin de realizar una correcta selección de pacientes candidatos a los tratamientos personalizados más adecuados. Además, se han revisado estudios estimativos de efectividad comparada entre los fármacos agnósticos para tratar a pacientes portadores de estos biomarcadores y estudios sobre costes de las pruebas diagnósticas necesarias para identificar a los candidatos a terapia agnóstica y/o de estos tratamientos tumor-agnósticos.

En estos estudios se han empleado diferentes **metodologías** como revisiones y revisiones sistemáticas de la literatura o reuniones de personas expertas de distintas disciplinas relacionadas, que han derivado en propuestas diagnósticas para la identificación correcta de biomarcadores de fusión y han permitido alcanzar recomendaciones para la práctica clínica. También se han encontrado diversos métodos cualitativos y cuantitativos con los que se ha evaluado la efectividad terapéutica de los fármacos agnósticos y el coste-efectividad de las pruebas diagnósticas y los tratamientos.

Sólo se han localizado dos informes de ETS (79, 122) sobre el uso de tests moleculares, uno para detección de genes de fusión *NTRK* en tumores sólidos y el otro, para identificación de reordenamientos *ROS1* en pacientes con NSCLC. En estos dos informes de ETS así como en la revisión sistemática de Albert y cols (23) se ha podido informar sobre la **baja calidad** metodológica de los artículos encontrados, la existencia de escasos datos y resultados incompletos, y se reconoce una evidencia limitada procedente de grupos pequeños de pacientes, además de una gran heterogeneidad tanto clínica (diversos tipos de tumores, estadios tumorales, tratamientos recibidos, etc) como metodológica. Por todo ello, en estos estudios se descartó la posibilidad de realizar meta-análisis, que hubiera permitido generar una evidencia más sólida.

Actualmente, todavía el diagnóstico correcto de las alteraciones moleculares sigue siendo un reto para la mayoría de los sistemas sanitarios. Las técnicas diagnósticas deberían permitir el cribado de dichos biomarcadores de forma rápida y eficiente, pero teniendo en cuenta la baja prevalencia de estas alteraciones moleculares, es preciso considerar no sólo la efectividad clínica sino los costes de los métodos diagnósticos que pueden utilizarse para identificar biomarcadores agnósticos (123). Hasta ahora, no parece factible ni sostenible realizar este tipo de pruebas a todas las personas enfermas en el momento del diagnóstico inicial del tumor. Incluso la IHQ, que es la prueba más económica, no se puede realizar de manera rutinaria en todos los tumores (123).

En la literatura seleccionada para este informe destaca la existencia de numerosos algoritmos que combinan diferentes tests y recomendaciones para la detección de genes de fusión respaldados por diferentes sociedades científicas. Algo común a todos ellos es que la elección de las pruebas para identificar estas fusiones se basa en aspectos diferentes como el tipo de tumor, la frecuencia esperada de cada biomarcador, la calidad y cantidad de material tumoral disponible, la capacidad diagnóstica de cada prueba, la accesibilidad a las distintas técnicas, la experiencia que se tenga con ellas y los recursos económicos del contexto clínico concreto, además de ser importantes la cantidad de muestra disponible y del tiempo que sea posible esperar hasta tener el resultado.

En general, los documentos revisados coinciden en que la NGS es la técnica más efectiva para determinar las fusiones *NTRK* y reordenamientos *ALK*, *ROS1* y *RET* (14,25,63). El desarrollo de la NGS ha supuesto un cambio fundamental en el abordaje del diagnóstico oncológico y ha permitido aportar gran cantidad de información sobre el perfil molecular de los tumores, por la posibilidad de estudiar de forma simultánea muchas alteraciones genéticas en una sola prueba y la ventaja sustancial de alcanzar una alta efectividad incluso en muestras de pequeño tamaño. Se acepta que la NGS se convertirá en la herramienta clave para informar

las decisiones clínicas sobre terapia de precisión en oncología dado el incremento progresivo previsto a corto y medio plazo en el número de biomarcadores predictivos de buena respuesta al tratamiento. Sin embargo, hasta el momento, su uso viene limitado por su diferente implementación y por los recursos económicos de cada contexto sanitario. Por ello, dado que no es posible realizar NGS a la totalidad de personas enfermas, la mayoría de las estrategias prefieren comenzar con un test de *screening* de bajo coste, seguido de otra prueba de mayor exactitud diagnóstica (y, generalmente de coste más elevado) para confirmar el resultado del primero.

Para poder realizar el estudio de varios biomarcadores agnósticos simultáneamente, se podría recurrir bien a la NGS o bien mediante IHQ o FISH aunque estas dos últimas técnicas requieren de una determinación para cada biomarcador. Probablemente ninguna de las dos estrategias sería adecuada; en el primer caso por tratarse de una tecnología no totalmente accesible y por los costes asociados, y en el segundo por la carga de trabajo y porque en algunos casos no se dispone de suficiente muestra de tejido (49). En ocasiones es preciso utilizar varias técnicas, lo que supone un incremento considerable en costes, o es posible que no resulte factible para el cribado de rutina, siendo necesario buscar un procedimiento de *screening* coste-efectivo, con tecnologías sencillas, robustas y accesibles para poder realizar un cribado de los principales biomarcadores agnósticos sin tener que secuenciar todos los casos.

Todos los estudios coinciden en que para asegurar la validez diagnóstica de estas pruebas es necesario realizar controles de calidad en el manejo de las muestras tisulares, de ahí la importancia de estandarizar todo el proceso de las muestras desde el momento de ser obtenidas.

Son varios los parámetros que deben especificarse en el informe de resultados de estas pruebas diagnósticas, entre ellos, el diagnóstico anatomopatológico, tipo de muestra (de biopsia, citológica), forma en que se recibe (muestra fresca, congelada, fijada en parafina), fecha de la muestra, porcentaje de células tumorales, número y porcentaje de células analizadas y de las que muestren la alteración estudiada, concentración y pureza del DNA, calidad del RNA, test utilizado, incluso se debe mencionar si la muestra era o no adecuada para alcanzar un diagnóstico fiable.

En las muestras tisulares de biopsia, algunos factores son claves, como el tiempo desde la toma de la muestra hasta su preservación, el tiempo total de fijación o el tamaño de la muestra. Un retraso en el tiempo hasta que es preservada la muestra puede ocasionar errores en IHQ y FISH. Se recomienda un tiempo de isquemia fría de menos de 1 hora. Las muestras histológicas se deben fijar por inmersión en formalina al 10% y después fijarse más de 6 horas pero menos de 24 h para mantener la antigenicidad y la integridad del DNA, o entre 24-72 horas si se trata de

piezas quirúrgicas. Las muestras citológicas no-FFPE como frotis directos o citología líquida, permiten obtener buenos resultados, siempre que se cumplan ciertos requisitos de calidad en la fijación, tinción, en los cortes o en la forma de preparación (25). Los bloques celulares en parafina suelen ser el material preferido para estudiar biomarcadores tumorales porque permiten obtener múltiples secciones para poder realizar varios análisis. El método de procesamiento preferido de estos bloques es la fijación con formalina y posterior inclusión en parafina porque estos bloques se podrán manejar de forma similar a las muestras histológicas y aplicar los mismos protocolos de análisis de biomarcadores. La desventaja es que algunos de estos bloques celulares contienen muy pocas células tumorales o incluso, ninguna, y diferenciar entre células tumorales y células reactivas resulta más complejo que en el estudio citológico convencional, especialmente si se realiza FISH. Generalmente se utilizan muestras FFPE de 4 micras de grosor tanto para IHQ como para FISH. Para IHQ es necesario un mínimo de 20 células tumorales para detectar reordenamientos *ROS1* (aunque existen discrepancias entre autores) y de al menos 50 células tumorales para FISH (34). Para los estudios moleculares, es importante evitar áreas de necrosis tumoral o de fibrosis marcada y seleccionar la zona de mayor porcentaje de células tumorales.

La NGS es el test de elección en pacientes con enfermedad avanzada o cuando no se dispone de suficiente muestra. Sin embargo, su coste y una implementación limitada, hacen que la prueba de *screening* más utilizada hasta el momento sea la IHQ. La RT-PCR y la **biopsia líquida** son pruebas poco utilizadas en la práctica clínica (25), aunque la biopsia líquida tendría ventajas en pacientes con NSCLC u otros tumores en los que sea complicado obtener muestras de biopsia, o cuando la cantidad disponible sea insuficiente para aplicar otras técnicas diagnósticas, o cuando se ha producido progresión de la enfermedad y ya no es posible volver a realizar biopsias.

La mayor parte de los estudios sobre pruebas para detectar fusiones *NTRK* se han realizado en tumores sólidos, pero considerando tipos de tumores muy diferentes y con diferentes prevalencias de biomarcadores predictivos, mientras que los estudios para diagnóstico de reordenamientos *ALK* y *ROS1* se han realizado, fundamentalmente, en pacientes con NSCLC.

El ***screening* de las fusiones *NTRK*** es un proceso complejo por el hecho de que se trata de tres genes *NTRK* diferentes y porque existe una elevada cantidad de posibles pares de fusión y de puntos de unión a estos pares de fusión. En general, se acepta que este *screening* no es una prioridad en pacientes oncológicos en estadios precoces con enfermedad localizada puesto que el tratamiento en estos casos no va a incluir inhibidores Trk. Sin embargo, sí se recomienda realizar el *screening* en población adulta con tumores con una elevada prevalencia de fusiones *NTRK* o si

presentan tumores avanzados o metastásicos (123,131). En la población pediátrica, se recomienda su estudio en tumores con alta prevalencia, tanto en el momento del diagnóstico como en casos de recaídas, y en tumores de baja prevalencia pero si presentan progresión o enfermedad metastásica (9,23,156).

La mayoría de los estudios revisados considera que la NGS es la metodología más apropiada y precisa para detectar las fusiones de *NTRK*. Representa un método útil para detectar estas fusiones, con una alta Se y Sp, así como para definir el par de fusión, incluso permite identificar fusiones nuevas del gen *NTRK*, a diferencia de otras técnicas. Y especialmente lo son las basadas en RNA por su capacidad para evitar las regiones intrónicas grandes de *NTRK* 2 y 3, difíciles de analizar con la NGS-DNA. También la NGS es la prueba indicada cuando se dispone de una muestra escasa donde hacer el diagnóstico (13,16).

Igual que ocurre con FISH, la NGS-DNA identifica los reordenamientos genómicos a nivel de DNA, pero estos pueden o no llegar a convertirse en proteínas de fusión funcionales, es decir, que muchas de las fusiones *NTRK* detectadas por NGS-DNA tienen un significado incierto y deben ser confirmadas por otros tests, bien NGS-RNA o IHQ (50). De hecho, la sobreexpresión de Trk, que es posible detectar mediante IHQ, podría predecir de forma más adecuada la respuesta a los TKIs, pues en algunas personas no respondedoras se habían detectado reordenamientos *NTRK* mediante NGS pero la IHQ no demostraba expresión de Trk, lo que indicaría que la expresión Trk en IHQ resulta necesaria para que el tumor responda a dicho tratamiento (90,162). No obstante, si se detecta sobreexpresión Trk con IHQ, habría que confirmar esta positividad por técnicas moleculares, pues podría deberse a otras alteraciones genéticas pero no a fusiones *NTRK* (163).

En general, y dado los costes de la NGS y que todavía no tiene una implantación universal, se recomienda el *screening* de fusiones *NTRK* con IHQ, que ha alcanzado valores de Se y Sp en torno al 95% y 100%, respectivamente, aunque la Se de la IHC es considerablemente menor en el caso de fusiones *NTRK3* (54,5-79%) (9,51,53), de modo que si se sospechan fusiones *ETV6-NTRK3*, estaría más indicado realizar FISH (14,23) o NGS directamente (16). La Sp de la IHQ varía dependiendo del tipo histológico del tumor pues la tinción de fondo en algunos tejidos normales impide el diagnóstico correcto de algunos tumores como los gliomas. Estos tumores expresan la proteína Trk de forma fisiológica, por ello, se descarta utilizar IHQ y se recomienda realizar directamente NGS. También pueden darse FP en carcinomas secretores de mama y análogos de secretores de mama (53).

Se ha constatado que la pan-Trk IHQ es una prueba eficiente, rápida, fiable y que está ampliamente implementada en la mayoría de los laboratorios por lo que el acceso a la misma en la práctica clínica suele ser fácil. Los estudios revisados

han confirmado que para la interpretación de IHQ no existen unos criterios de puntos de corte aceptados por la comunidad científica y que los patrones de tinción, tanto en intensidad como en localización, son muy variados (79). En caso de que se detecte esta expresión proteica, se recomendaría realizar una NGS con paneles de múltiples genes para confirmar o descartar la alteración genética sospechada.

Algunos de los algoritmos más aceptados para detección de fusiones *NTRK* son los propuestos por SEOM/SEAP/SEHOP (9,156) y ESMO (13). Cuando se espera una prevalencia muy alta de algunas alteraciones genéticas en un determinado tumor, o si incluso su presencia sea patognomónica, probablemente cualquier prueba podría ser útil, pero las mejores opciones para confirmar el diagnóstico serían FISH, RT-PCR y paneles de NGS-RNA. Si, por el contrario, se quiere realizar el estudio en una población no seleccionada, la mejor prueba sería la NGS, siendo la basada en RNA el *gold standard*, siempre que la calidad del RNA sea óptima. Cuando se detecte un caso positivo a fusiones *NTRK*, entonces habría que confirmar la expresión proteica de dichas fusiones con IHQ. Otra estrategia alternativa para tumores con baja prevalencia (<5%) de fusiones *NTRK*, es la basada en dos fases: primero *screening* con IHQ y después, NGS-RNA como prueba de confirmación de los casos positivos. Sin embargo, también se han planteado propuestas diferentes (130) como la de realizar FISH si la prevalencia esperada es alta e iniciar el tratamiento con fármacos agnósticos si resultado es positivo, mientras que se recomienda IHQ sólo en aquellos laboratorios que no dispongan de FISH, y para tumores de baja prevalencia de fusiones *NTRK*, directamente se propone hacer NGS.

En cuanto al momento **más adecuado para realizar el estudio de los biomarcadores, se han** recomendado distintas opciones: desde hacerlo en el momento del diagnóstico inicial, con el fin de poder establecer el tratamiento cuanto antes (123), a realizarlo sólo en casos de progresión de la enfermedad cuando la única alternativa terapéutica son los fármacos agnósticos (9,156).

Progresivamente se está extendiendo el uso de los paneles de NGS porque permiten el estudio simultáneo de un número alto de genes, de modo que se va consolidando como prueba de *screening* en muchos laboratorios para adenocarcinomas. Para pacientes con NSCLC avanzado se acepta que el *gold standard* para diagnóstico de biomarcadores es la NGS, tal como recomienda la SEOM (158). También ESMO recomienda la NGS en pacientes con NSCLC avanzado (126) y cuando no se dispone de suficiente muestra para realizar otros estudios (13). Una ventaja muy señalada de la NGS es su capacidad para identificar alteraciones genéticas en muestras de pequeño tamaño, como las obtenidas a partir de aspiración con aguja fina o de biopsias con aguja gruesa, que suelen ser las utilizadas para diagnosticar a pacientes con NSCLC.

En todos los pacientes con NSCLC no-escamoso resulta obligado realizar un estudio de los biomarcadores *ALK*, *ROS1*, *NTRK* y *RET* predictivos de buena respuesta a terapia. En carcinomas de células escamosas, metastásicos en no-fumadores o levemente fumadores o exfumadores desde hace mucho tiempo, estaría indicado el estudio de *ROS1*, *NTRK*, *ALK* y *RET* ([127,128](#)).

Se considera ([163](#)) que en pacientes con NSCLC la estrategia más coste-efectiva para el *screening* de fusiones *NTRK* sólo debería aplicarse en los casos en que la incidencia esperada sea alta (pues el número de casos con fusiones *NTRK* realmente es muy bajo) y cuando la intención sea administrar terapia dirigida inhibidora de *NTRK*.

En pacientes con cáncer de pulmón, el estudio de otros genes como *ERBB2*, *MET* o *KRAS*, todavía no se recomienda de forma aislada pero sí dentro de amplios paneles de genes, tanto en el momento del diagnóstico inicial como después de descartar alteraciones en *EGFR*, *ALK*, *BRAF*, *ROS1* y *RET* ([25](#)) dadas las implicaciones pronósticas y terapéuticas que supone la presencia de alteraciones en estos genes ([77](#)).

Otras guías y documentos de recomendaciones se han referido a **otros tumores** como CCR, cáncer de tiroides o SPB ([124,129,130](#)). En pacientes CCR estaría indicado realizar estudio de biomarcadores de fusión en casos de alta MSI y cuando se han descartado mutaciones *RAS*, siendo la IHQ y la NGS las técnicas recomendadas ([13,124,125](#)). Para pacientes con cáncer de tiroides se recomienda estudiar la presencia de fusiones *NTRK* si se trata de un tumor no reseccable, o tras recurrencia tumoral o si es refractario a yodo radiactivo, utilizando IHQ como prueba de screening seguido de NGS para confirmar los resultados positivos. Para pacientes diagnosticados de GIST ([129](#)), se recomienda hacer NGS como primera prueba, igual que para SPB en los que se recomienda el estudio de fusiones *NTRK* ([132](#)).

Para la identificación de **reordenamientos *RET***, la guía de ESMO descartaba utilizar IHQ y recomienda FISH para fusiones *RET*. No obstante, si se dispone de muestras FFPE, aconsejan realizar NGS e iniciar el tratamiento cuando el resultado es positivo, mientras que para aquellos laboratorios sin acceso a NGS, se recomendaría FISH o QT-PCR para estudiar fusiones o mutaciones, respectivamente. Y en casos de no disponer de muestras FFPE, dan como alternativa el estudio mediante biopsia líquida ([41](#)). En pacientes con NSCLC metastásico, la guía NCCN recomendaba estudiar la presencia de reordenamientos *RET* por la gran efectividad de los inhibidores *RET* selectivos en tumores positivos a estas alteraciones ([127](#)).

Debemos señalar que para este informe no se han localizado documentos que sigan el proceso de evaluación de tests genéticos propuesto por Pitini y cols ([164](#)). A través de una revisión sistemática, pusieron de manifiesto que el marco más

utilizado para la evaluación de tests genéticos era el modelo ACCE (que considera aspectos de validez analítica, validez clínica, utilidad clínica y revisión de las implicaciones éticas, legales y sociales). Sin embargo, consideran que este marco de evaluación resulta insuficiente para el ámbito de la medicina de precisión, al no considerar aspectos relacionados con la implementación y posibles cambios organizativos adaptados al contexto concreto donde se quieran aplicar las nuevas tecnologías, especialmente en el entorno de sistemas de salud de financiación pública donde la equidad y las limitaciones de recursos son elementos clave (165). Por este motivo, Pitini y cols. desarrollan un nuevo marco de evaluación de los tests genéticos que pueda ayudar en la toma de decisiones sobre coberturas sanitarias. Este nuevo marco integra los dos de mayor uso, el modelo ACCE y el core model de EUnetHTA (166), que analizan de un modo más sistemático aspectos organizativos y de desarrollo. Para los tests genéticos, se propone una primera sección, con una introducción donde se define la condición clínica y el test en estudio. La sección segunda se centra en el acceso de las personas candidatas y familiares al test genético, incluyendo algunos factores de interés como los aspectos organizativos (los programas de salud, el nivel asistencial, el acceso del paciente), la evaluación económica, las implicaciones éticas, legales y sociales, y la perspectiva del paciente. La tercera sección recoge las prioridades en investigación y áreas para las que no se haya identificado evidencia científica. Por último, una cuarta sección que resume la evidencia generada para respaldar el proceso de toma de decisiones respecto al uso del test; se recogería el beneficio neto, coste-efectividad y factibilidad del programa de utilización del test genético en la práctica asistencial (165).

5.2. En relación a los tratamientos agnósticos

El desarrollo de la medicina de precisión en oncología y la traslación y uso de fármacos dirigidos en la práctica clínica ha cambiado de forma sustancial el manejo terapéutico de pacientes en los que se demuestra la presencia de determinadas alteraciones genéticas susceptibles de responder a algunos fármacos, especialmente, en el caso de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica.

Los tratamientos con entrectinib y larotrectinib están aprobados para cuando «no existen otras opciones terapéuticas satisfactorias» y, por lo tanto, el momento en que un paciente será candidato a uno de estos fármacos será muy variable, dependiendo del tipo de tumor y de las opciones terapéuticas existentes para cada caso.

Para la evaluación de estos fármacos, así como de los tests para identificar a pacientes con alteraciones genéticas tan poco frecuentes, los habituales ensayos

clínicos randomizados no son factibles. En su lugar, los **ensayos en medicina de precisión** incluyen dos grandes grupos:

3. Ensayos estratificados cuyo objetivo final es evaluar la eficacia de un fármaco, es decir, determinar si un fármaco concreto tiene actividad sobre un subgrupo de pacientes con determinadas características moleculares o histológicas. Se diferencian dos tipos: estratificación molecular (ensayos paraguas, *umbrella trials*) y estratificación histológica (ensayos en cesta, *basket trials*). Los ensayos clínicos en cesta incluyen pacientes con tumores de diferentes tipos histológicos pero con la misma alteración genética y que son tratados con un mismo medicamento para estudiar su efectividad. Estos ensayos permiten obtener resultados finales de respuesta tumoral incluso con tamaños muestrales pequeños, que de otra manera necesitarían tiempos muy prolongados hasta obtener evidencias y se han convertido en una importante herramienta para generar información dentro de la medicina de precisión (80). Por el contrario, los ensayos paraguas seleccionan pacientes con tumores del mismo tipo histológico, los estratifican en función de la alteración genética que presenten, y les administran un medicamento diferente según dicha alteración.
4. Ensayos para analizar la eficacia de los algoritmos de tests diagnósticos que permitirían analizar si el uso de una tecnología aplicada para guiar el tratamiento de acuerdo a un protocolo terapéutico específico, mejora los resultados en salud del paciente. Estos ensayos para algoritmos diagnósticos consideran diferentes alteraciones moleculares, diferentes fármacos y, generalmente también, diferentes tipos de tumores (167,168). A su vez, pueden ser no-randomizados y randomizados. Con ellos es posible determinar la efectividad de las pruebas. Así, la NGS se ha evaluado a través de ensayos clínicos en los que se utiliza esta prueba como guía para establecer el tratamiento. Su valor predictivo vendría dado por su capacidad para mejorar los resultados en salud de un paciente, es decir, por su utilidad clínica. Por ejemplo, el ensayo multicéntrico randomizado de fase II SHIVA no permitió confirmar que la NGS mejorara los resultados en salud del paciente, mientras que otros ensayos de algoritmos diagnósticos no-randomizados han sugerido resultados contrarios (169-171).

Tanto el larotrectinib como el entrectinib se aprobaron a partir de ensayos en cesta, que por el hecho de ser ensayos de un solo brazo presentan algunas limitaciones, como no permitir las comparaciones directas entre tratamientos y la dificultad para generar evidencia de suficiente rigor con la que respaldar su incorporación a la práctica clínica. Además, otra limitación viene dada por la gran heterogeneidad encontrada entre estudios, surgida de diferentes fuentes: pacientes con diferentes

características, tumores de diversos tipos histológicos y diferentes pronósticos. Por otro lado, el uso de los fármacos tumor-agnósticos requiere un estudio diagnóstico previo que confirme la presencia de determinados biomarcadores y por ello, en la evaluación de coste-efectividad de estos nuevos fármacos será necesario incluir esas pruebas diagnósticas que identifiquen y ayuden a seleccionar a los pacientes candidatos. Un problema añadido para la evaluación de estos fármacos es que habitualmente se requiere un comparador o *gold standard*, pero en el caso de estos fármacos tumor-agnósticos existen multitud de terapias estándar en función del tipo histológico y de la localización del tumor. Además, algunas variables de resultados como la OS o PFS, que suelen ser las más utilizadas para revisiones sistemáticas o informes de ETS, en el caso de estas terapias agnósticas no suelen estar disponibles. Algunos estudios en los que se han comparado variables de resultados como ORR o OS, han realizado ajustes en función de algunas características demográficas u otras variables y los resultados se comparan con una población con tratamiento basado en el tipo histológico de la que no se tiene información sobre la presencia o no de genes de fusión. Además, estos ensayos suelen tener un tiempo corto de seguimiento, de modo que no se conocen los resultados a largo plazo o no han podido ser estimados. Otra limitación es que la autorización de comercialización y uso de estos fármacos tumor-agnósticos se ha basado en la presencia de fusiones *NTRK*, *ROSI*, *ALK* o *RET*, asumiendo que la efectividad de los fármacos similar entre los distintos tipos histológicos (172).

La incorporación de nuevos fármacos a la cartera de servicios y su uso en la práctica clínica debería basarse en estudios sólidos de efectividad y seguridad y de coste-efectividad, pero la baja prevalencia de los biomarcadores cuya presencia debe identificarse previamente a la administración de los fármacos tumor-agnósticos, limita de forma notable la realización de estudios con resultados sólidos. Sin embargo, si se decide esperar a disponer de evidencia sólida para respaldar su uso, pacientes candidatos al tratamiento no se podrían beneficiar de ellos. Por esto, se ha propuesto (153) que sean utilizados bajo ciertos controles y que tras un periodo de estudio, se debería re-evaluar el coste-efectividad con los nuevos datos generados (173,174).

Una mayor efectividad terapéutica debe ir acompañada de un perfil de seguridad correcto y de un incremento en la calidad de vida, de modo que los pacientes vivan más tiempo pero también mejor. La mejora en la calidad de vida de pacientes oncológicos y el mantenimiento de esta mejora a lo largo del tiempo suponen uno de los objetivos clave del tratamiento del cáncer. En otros documentos (175) se ha demostrado una mejoría en la calidad de vida de pacientes adultos y pediátricos con tumores con fusiones *NTRK* tratados con larotrectinib, asociada a una rápida y potente respuesta observada tras el uso de larotrectinib, además de observar una buena tolerancia al mismo y un favorable perfil de toxicidad. Son estas variables de resultado de supervivencia y calidad de vida las más interesantes. Sin embargo,

no siempre se pueden estudiar, especialmente cuando los periodos de seguimiento son cortos, y hay que recurrir a variables subrogadas como PFS o las tasas de respuesta tumoral, que no necesariamente son predictivos de los resultados finales.

La ausencia de estudios comparativos directos entre larotrectinib y entrectinib ni entre estos y el tratamiento estándar supone un inconveniente para incorporar los nuevos tratamientos agnósticos a la práctica de rutina (103). Algunas investigaciones (134) han realizado **comparaciones indirectas** entre larotrectinib y el tratamiento estándar y otros (135), una **comparación indirecta ajustada con emparejamiento** entre larotrectinib y entrectinib para estudio de pacientes con fusiones *NTRK*. Otra metodología utilizada en otros estudios (136-138) es la de las **comparaciones intrapaciente utilizando el GMI** como instrumento para aportar mayor evidencia sobre la efectividad de los TKIs frente a terapia convencional y permitiendo superar algunas de las limitaciones de los ensayos de un solo brazo. El GMI ofrecería información intrapaciente, tomando al paciente como su propio control. Esta segunda opción ha sido respaldada por la EMA para tumores muy raros (176).

En general, se han observado resultados más favorables del larotrectinib en comparación al entrectinib y a los demás tratamientos estándar, y esta mayor efectividad se ha reflejado en prácticamente todas las variables de resultado analizadas como OS, ORR, PFS o DoR, y en mayor tolerancia al fármaco.

En otros estudios la metodología utilizada para generar datos comparativos ha sido la modelización basada en simulación (139-141) mediante **modelos de supervivencia particionados** para generar datos a partir de estudios de pequeño tamaño muestral con el fin de ayudar a la toma de decisiones de clínicos y gestores de los sistemas sanitarios. Estos estudios han demostrado mayor efectividad terapéutica del larotrectinib frente al tratamiento estándar, en términos de esperanza de vida y QALYs, lo que respalda la importancia de determinar si el tumor presenta genes de fusión *NTRK*, requisito para decidir administrar este fármaco. Pero también, estos estudios sugieren mejores resultados del larotrectinib frente al entrectinib. No obstante, es necesario señalar las limitaciones que estos estudios presentan como el pequeño número de pacientes y la escasez de datos disponibles sobre si pacientes tratados con terapia convencional presentaban o no fusiones *NTRK*, por lo que las conclusiones deben considerarse con cautela en espera de nuevos datos que añadan evidencia más sólida.

En pacientes con **NSCLC positivos a fusiones *ROS1***, el entrectinib parece mejorar la OS e incrementa de manera significativa la ORR en comparación a crizotinib (142). En espera de la finalización del ensayo clínico (NCT04603807) que ofrezca resultados sobre efectividad y seguridad comparada entre estos dos fármacos, los datos hasta el momento sugieren que no habría diferencias en cuanto a la

PFS ni a la necesidad de interrumpir el tratamiento por los EA asociados a los fármacos. En comparación a la QT convencional, el entrectinib sí ofrecería un beneficio terapéutico superior, con mejores resultados en las variables de OS, PFS y ORR, y una menor toxicidad. Por todo ello, se respaldaría el uso de entrectinib en pacientes con NSCLC portadores de fusiones *ROS1*, incluyendo pacientes con metástasis cerebrales en los que su efectividad es claramente superior.

Las revisiones y otros documentos incluidos en este informe muestran que estos fármacos agnósticos ofrecen resultados prometedores para pacientes con **tumores sólidos y fusiones *NTRK***, pendientes de confirmación con los datos de los estudios en curso solicitados por la EMA. Se necesitan estudios cuantitativos de calidad que permitan comparar la eficacia relativa de estos agentes terapéuticos y que faciliten su traslación a resultados clínicamente significativos. Debido a la baja prevalencia de estas fusiones *NTRK*, para poder generar datos en un periodo de tiempo razonable, la opción posiblemente más factible sería utilizar bases de datos de RWE con los que estudiar los tiempos de diagnóstico de fusiones *NTRK* y la modificación potencial en la toma de decisiones terapéuticas en los tumores positivos a dichas alteraciones genéticas.

5.3. Aspectos económicos y organizativos

A pesar de que los tratamientos agnósticos están autorizados para pacientes con cáncer avanzado o metastásico cuando se identifican algunos biomarcadores, tanto el uso de tests genéticos para su determinación como la terapia con esos fármacos dirigidos supone una **inversión económica** considerable, por lo que resulta necesario estimar el coste-efectividad del diagnóstico para seleccionar pacientes candidatos al tratamiento agnóstico. En algunos sistemas sanitarios, la implementación y el reembolso de ciertas tecnologías diagnósticas y terapéuticas depende de los resultados de análisis de coste-efectividad. En el caso de los fármacos agnósticos, la identificación de pacientes candidatos a dicha terapia supone un importante reto pues, en principio, pacientes con tumores sólidos en estadios avanzados o metastásicos deberían ser estudiados por si presentaran algún biomarcador.

En este informe se han revisado varios estudios económicos que contemplaban distintas metodologías de análisis (estudios de micro-costes, de coste-utilidad y de coste-efectividad) y con objetivos diferentes comparando el entrectinib o larotrectinib con el tratamiento estándar o bien se trataba de estudios centrados en el análisis de costes de las técnicas diagnósticas, en especial de la NGS.

Entre las tecnologías diagnósticas, la NGS y los distintos paneles de genes presentan un coste elevado todavía, y no tanto el coste de la propia tecnología sino el asociado al almacenamiento de datos y a la necesidad de personal altamente cualificado. En la última década, estos costes de la NGS se han visto reducidos de forma considerable, hasta 5 veces según se recogía en una de las publicaciones revisadas (150), de manera que en ciertos contextos sanitarios se ha convertido en una tecnología asumible. En este documento se estimó que el coste de la terapia dirigida utilizando NGS era de unos 31.000 € por paciente, siendo el coste más elevado (54%) el del tratamiento y las hospitalizaciones (35%). Sin embargo, en general se acepta que, aunque las plataformas NGS ofrecen un resultado más rápido y menos costoso que en los primeros años de su desarrollo, todavía el coste y el proceso técnico que conllevan, desde la preparación de las muestras y análisis posterior hasta la interpretación de los resultados y el almacenamiento de la información, pueden comprometer los potenciales beneficios de la NGS. Además, el uso de estas tecnologías genómicas para identificar biomarcadores puede suponer un consumo considerable de recursos económicos puesto que se aplican sobre un elevado número de pacientes pero sólo una pequeña proporción va a obtener beneficios clínicos. Marino y cols (149) estimaron un coste medio total de la NGS con paneles dirigidos de 607 € (\pm 207) para tumores genéticos somáticos y de 550 € (\pm 140) para tumores germinales, en comparación a los calculados en otras investigaciones de 100 € del coste medio de pan-TRK IHC, 100 € de RT-PCR y 300 € de los tres test FISH para NRTK1/2/3.

En el informe noruego (79) se estimó un coste anual para identificar fusiones *NTRK* muy diferente según la prevalencia de estas alteraciones en los tumores, con valores que oscilaron de 1,2 a incluso 18 millones de coronas, entre los tumores de alta y baja prevalencia, respectivamente. Los resultados del informe del SMC (148) comparando entrectinib frente a terapia estándar, mostraron una gran variación en el ICER estimado, según si se excluían los tests diagnósticos en ambas ramas del estudio (unas £26,500) o si se incluían sólo en la rama del entrectinib (casi £60,000). Se ha estimado que la estrategia propuesta por ESMO de cribado con IHQ seguida de NGS como prueba de confirmación (13) supondría que el coste de identificar a un paciente positivo a fusiones *NTRK* oscilaría entre los 540 si el tumor era un carcinoma secretor de mama a casi 200.000 si se trataba de un NSCLC, de ahí que sea importante priorizar el estudio en pacientes con una prevalencia esperada alta y en los pacientes que más se podrían beneficiar del tratamiento dirigido. Los dos estudios de coste-efectividad realizados en Países Bajos estimaron un ICER de casi 41.500 €/QALY del larotrectinib frente a la terapia estándar, muy por debajo del umbral considerado para patologías con alta carga de enfermedad (80.000 €/QALY) (152), mientras que el entrectinib no resultaba coste-efectivo (ICER de casi 170.00 €/QALY) frente a la terapia estándar, aunque podría llegar a serlo si se incluyeran los tests genéticos en la práctica rutinaria (153). En otras publicaciones

(63) se considera que la NGS es la prueba más coste-efectiva para detectar fusiones *NTRK* pero también para *ROS1*, *ALK* y *RET*.

Para una correcta implementación de los algoritmos diagnósticos para biomarcadores oncológicos con mayor aceptación y respaldo por parte de los diferentes profesionales implicados, resultan fundamentales varios **aspectos organizativos**. Por un lado, es necesario disponer de las técnicas diagnósticas en el centro hospitalario o poder remitir las muestras a otro centro para su determinación. Por otro lado, se requiere de profesionales expertos en el análisis genético y bioinformático que apliquen las mejores pruebas diagnósticas e informen de sus resultados, así como de un aprendizaje por parte de especialistas implicados en el manejo de pacientes oncológicos para tomar las mejores decisiones a partir de la información genética obtenida. Además, es preciso contar con la infraestructura y equipamiento tecnológico suficientes para soportar estas tecnologías diagnósticas. En la etapa final de interpretación de resultados de las pruebas moleculares y toma de decisiones terapéuticas basadas en los mismos podría ser interesante establecer los denominados comités moleculares de tumores (MTB, *molecular tumor board*) constituidos por profesionales multidisciplinares de los campos de la oncología, biología molecular, patólogos y radiólogos.

En el año 2022, Klink y cols (177) han publicado un estudio sobre el uso de tests diagnósticos y de tratamientos con TKIs realizado a través de cuestionarios dirigidos profesionales de oncología de EEUU (de la *Oncology Provider Extended Network*, OPEN). Entre los resultados obtenidos destaca que el 68% solicitaba el test para identificar posibles fusiones *NTRK* en pacientes (todos adultos) con tumores sólidos avanzados o metastásicos antes de iniciar el tratamiento, pero menos de la mitad (46%) pautaba TKIs en los casos confirmados de presentar dichas fusiones *NTRK*. Por otro lado, un 96% declaraba no tener dificultades para interpretar los informes del test de fusiones *NTRK*. Entre los 73 pacientes estudiados por estos profesionales, la NGS fue la prueba más solicitada para identificar fusiones *NTRK* (en el 83,6%) seguida de IHQ para confirmar los casos positivos con NGS, y en segundo lugar la FISH pero con una frecuencia muy inferior (15,1%). El fármaco más indicado para pacientes positivos a fusiones *NTRK* fue el larotrectinib (56%) y entrectinib el segundo en frecuencia (25%).

El acceso a los nuevos biomarcadores no se ha generalizado todavía en la práctica hospitalaria en España tal como refleja el estudio del 2020 de la SEOM sobre las condiciones de acceso a los fármacos oncológicos y a los biomarcadores predictivos necesarios para seleccionar a personas candidatas a determinados fármacos (178). Este estudio se llevó a cabo a través de cuestionarios enviados a 146 hospitales españoles para preguntar sobre 11 fármacos y 5 marcadores predictivos. En relación a los biomarcadores considerados en este informe, el estudio de

la SEOM incluía la translocación *ROS1* y los reordenamientos *ALK* como biomarcadores predictivos de respuesta en pacientes con NSCLC. Se encontraron grandes diferencias de acceso a ambos. Los cuestionarios informaron de que en el 96% de estos centros era posible solicitar la determinación de estos biomarcadores; pero era necesario derivar a otros centros externos el 37% de los análisis para *ALK* y 47% de los de *ROS1*; se encontraron grandes diferencias en la financiación de las pruebas para su determinación; y el tiempo hasta obtener el resultado también varió sustancialmente entre los diferentes centros.

Por otro lado, con el fin de responder a la demanda clínica, los laboratorios han ido implementando estrategias de secuenciación dirigida para identificar mutaciones en diferentes genes en un único análisis. Sin embargo, esta NGS no está disponible de forma general para el cribado de estas alteraciones moleculares agnósticas predictivas de respuesta a terapias específicas. En el año 2022, se conocieron los resultados de una encuesta realizada por la SEOM y SEAP para conocer la situación actual de los hospitales españoles sobre el acceso a la NGS (179). Los principales resultados de este estudio fueron los siguientes: 1) el tumor sólido donde más se utilizaba esta prueba era el cáncer de pulmón; 2) la NGS no estaba disponible en gran parte de los centros hospitalarios, sino tan sólo en el 38% de los Servicios de Anatomía Patológica, pero además, los que disponían de esta tecnología la empleaban en un número pequeño de casos al año (unos 50 casos anuales); 3) aquellos centros que externalizaban la realización de NGS, tenían un acceso limitado a la prueba.

También disponemos de datos más recientes sobre el uso en España de biomarcadores en pacientes con cáncer de pulmón. En el Congreso Europeo del Cáncer de Pulmón de 2022, se presentaron los resultados del Registro de Tumores Torácicos (<https://www.gecp.org/>), que cuenta con la participación 182 hospitales. Se trata de un registro observacional prospectivo, que ha incluido datos de 9.239 pacientes diagnosticados de NSCLC en estadio IV desde 2016 hasta marzo de 2022. Los resultados mostraron que sólo entre el 15-20% de hospitales españoles dispone de tecnologías de plataformas de secuenciación; que se realizaron pruebas de biomarcadores tumorales en el 85% de pacientes con tumores no epidermoides (no escamosos) y en el 56,3% de pacientes con tumores epidermoides (escamosos); y que casi la mitad (44,5%) de los pacientes que se sometieron a las pruebas presentaron un resultado positivo en *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *BRAF*, *ROS1* o PD-L1.

SEOM ha manifestado su preocupación por la marcada variabilidad encontrada en la práctica clínica entre Comunidades Autónomas e incluso entre hospitales dentro de la misma Comunidad Autónoma. Considera necesario reducir estas diferencias en el acceso a los fármacos y a los marcadores predictivos, y mejorar las condiciones de acceso a los mismos, con el fin de buscar la mejor calidad de los cuidados en salud y la equidad en el acceso. Por ello ha propuesto algunas

pautas de mejora, partiendo de la necesidad de desarrollar una Estrategia Nacional de Medicina de Precisión. Consideran necesario desarrollar unos procedimientos estandarizados y un marco regulatorio para la implementación y financiación de biomarcadores en España, planificar la determinación de estos biomarcadores en los diferentes centros, reducir los tiempos entre la fecha de aprobación de un fármaco para su comercialización y la aprobación de prescripción a los pacientes. Proponen la creación de una red de centros que garanticen homogeneidad y consistencia en la realización de las pruebas y para promover la elaboración de guías de práctica clínica a nivel nacional.

La propia ESMO ha reconocido la dificultad de trasladar la investigación a la práctica clínica diaria dentro de la medicina de precisión. En su documento de recomendaciones de uso de la NGS (126), se comprometía a «hacer de puente entre ambos ámbitos, investigación y asistencia sanitaria, desarrollando guías basadas en la evidencia sobre el uso de NGS para contribuir a la equidad en el acceso al mejor tratamiento de pacientes con cáncer».

El Ministerio de Sanidad junto con las comunidades autónomas ha identificado situaciones de inequidad en el acceso a las distintas pruebas genéticas en el territorio nacional por lo que se ha puesto en marcha un Grupo de trabajo dependiente de la Comisión de prestaciones, aseguramiento y financiación en el que participan representantes de las Comunidades Autónomas y las sociedades científicas implicadas que han trabajado en la actualización y concreción de la cartera común de servicios en el área de la genética a través del desarrollo de un catálogo de pruebas genéticas, presentado en enero de 2024, que pretende garantizar a todas las personas que lo precisen un acceso más homogéneo y equitativo en el marco del SNS a las mismas. La primera parte de catálogo de pruebas genéticas, que incluye el área de la oncología, fue aprobada por el Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud el 23 de junio del 2023 y presentada en una jornada en el Ministerio de Sanidad en enero de 2024, junto a la aplicación informática que da soporte al catálogo (<https://cgen.sanidad.gob.es>)».

6. Conclusiones

La posibilidad de acceder a fármacos tumor-agnósticos dirigidos frente los genes de fusión *NTRK*, *ALK*, *ROS1* y *RET* ha modificado sustancialmente el manejo terapéutico y los resultados en salud de pacientes oncológicos en los que se demuestre su presencia. Por este beneficio terapéutico, resulta fundamental identificar correctamente la presencia de estos biomarcadores agnósticos de fusión en algunos procesos tumorales para seleccionar a pacientes candidatos a dichos tratamientos.

Dado que en los tumores más prevalentes en la población general, la presencia de genes de fusión es muy baja, el *screening* no puede extenderse a toda la población sino a grupos concretos de pacientes con enfermedad avanzada o no candidatos a otros tratamientos y con opciones de ser susceptibles a la terapia dirigida.

Las pruebas diagnósticas IHQ, FISH, RT-PCR y NGS han demostrado su utilidad para identificar fusiones en los cuatros genes contemplados en este informe. Las numerosas iniciativas, traducidas en diversas propuestas de algoritmos diagnósticos y/o recomendaciones, reflejan el interés existente en este ámbito de la medicina de precisión a la vez que demuestran la falta de un consenso generalizado sobre su mejor utilización.

Las indicaciones de uso de las técnicas diagnósticas vienen determinadas por diversos factores como el tipo de tumor, la edad del paciente, el tipo de alteración genética, la prevalencia esperada de dichas alteraciones, la cantidad y calidad de la muestra disponible, la accesibilidad a las pruebas y tratamientos agnósticos y posibilidades de financiación de los mismos en cada contexto sanitario concreto.

Todos los documentos revisados coinciden en que no resulta factible realizar un estudio de cada gen de forma secuencial, y menos aún lo será a medida que el número de biomarcadores conocidos se vaya incrementando.

El conjunto de profesionales que trabaja en el departamento de Anatomía Patológica resulta esencial para garantizar la idoneidad de las muestras donde se realizará el estudio de los biomarcadores moleculares.

El manejo pre-analítico de las muestras es clave para un correcto diagnóstico molecular por lo que se debería estandarizar todo el proceso desde la obtención de dichas muestras con el fin de evitar la variabilidad en la técnica. El objetivo es disponer de suficientes células tumorales con una adecuada calidad.

Para detectar fusiones *NTRK*, la NGS basada en RNA se considera el *gold standard*. Se acepta que la NGS es la técnica de elección, pero en aquellos centros en los que no está disponible o si no se practica de rutina en tumores malignos avanzados, la opción más aceptada es realizar IHQ como método de *screening* por su sensibilidad y eficiencia para detectar la expresión de proteínas Trk, además de un rápido tiempo de respuesta y bajo coste en comparación a otras técnicas como FISH y NGS. Se discute el papel de la IHQ en el *screening* de tumores con baja prevalencia. Para los casos positivos con IHQ, existe un acuerdo generalizado de que deben ser confirmados con otro método molecular, y así descartar los posibles FP de la IHQ.

Es posible que un resultado positivo de IHQ (expresión de Trk en el tumor) permita predecir con más fiabilidad una buena respuesta a inhibidores Trk que la sola presencia de reordenamientos *NTRK* detectados por NGS.

FISH es una prueba de alta Se y Sp para la detección de genes de fusión, como *ALK*, *ROS1* y *RET*. Para *NTRK* se requiere realizar un test FISH para cada gen. RT-PCR y la biopsia líquida no son pruebas muy extendidas en la práctica clínica.

El limitado acceso a la NGS supone un problema para que se implemente su uso a nivel mundial a pesar del respaldo de las distintas Sociedades Científicas. Existen grandes diferencias en cuanto a su nivel de incorporación y experiencia de uso entre países pero también entre unos centros y otros dentro del mismo país.

La incorporación de paneles NGS en los laboratorios, asociado a un descenso en los costes, podría facilitar que esta tecnología se convirtiera en la prueba de elección para el diagnóstico de fusiones *NTRK* y reordenamientos *ALK*, *ROS1* y *RET*. Además, se preve que el aumento esperado en el número de biomarcadores predictivos de buena respuesta al tratamiento junto al desarrollo en paralelo de nuevos fármacos dirigidos, convierta a la NGS en la herramienta fundamental para informar las decisiones clínicas en el contexto de la oncología de precisión.

Para identificar reordenamientos *ALK* y *ROS1*, las guías recomiendan IHQ como método de *screening* por su elevada sensibilidad y posterior confirmación de los casos positivos mediante pruebas citogenéticas, en concreto se recomienda usar FISH, o por pruebas moleculares como RT-PCR o NGS, mientras que para reordenamientos *RET*, posiblemente sea más efectivo utilizar directamente la NGS.

Los fármacos tumor-agnósticos larotrectinib y entrectinib han demostrado resultados prometedores en pacientes con tumores sólidos y fusiones *NTRK*. Sin embargo, resulta difícil cuantificar y valorar el posible beneficio clínico de estos medicamentos en los diferentes tumores evaluados, al tratarse de un pool de tumores

diferentes con diferentes expectativas de vidas y con algunos tipos de tumor escasamente representados. Por estos motivos, su traslación a la práctica clínica supone un reto para los decisores de los sistemas de salud.

A pesar de que estos tratamientos inhibidores frente a genes de fusión se aprobaron con finalidad agnóstica, resulta muy importante tener en consideración los aspectos clínicos, histológicos y moleculares de cada tumor.

En pacientes con tumores positivos a fusiones *NTRK*, los fármacos tumor-agnósticos larotrectinib y entrectinib han demostrado mayor efectividad terapéutica, en términos de respuesta tumoral y supervivencia del paciente, que los tratamientos no-dirigidos. La aplicación de ciertas metodologías de análisis ha llevado a sugerir que el larotrectinib tendría mejores resultados de supervivencia que el entrectinib, aunque es necesario recopilar un mayor número de pacientes tratados con estos fármacos para poder confirmar estos datos con evidencia más sólida dado que la elección inicial de uno u otro fármaco tiene gran relevancia (si se generan resistencias, no será posible utilizar el otro fármaco).

Para NSCLC positivos a fusiones *ROS1*, entrectinib parece ofrecer mejores resultados que crizotinib y que la QT convencional, aunque estas conclusiones se han generado a partir de estudios de comparaciones indirectas en espera de los resultados del ensayo en fase 3 que está en marcha actualmente. Los tumores con reordenamientos *RET* muestran una buena respuesta a inhibidores *RET* selectivos, superior a la de otros quimioterápicos.

La baja prevalencia de los biomarcadores agnósticos en la población oncológica y, por ello, el reducido número de pacientes que pueden ser estudiados, limita la posibilidad de diseñar ensayos clínicos aleatorizados. Se acepta que estas pruebas diagnósticas y los fármacos tumor-agnósticos sean evaluados a partir de los datos generados en ensayos en cesta, de un solo brazo, y que para su análisis se empleen metodologías rigurosas contrastadas. No obstante, en la interpretación de los resultados de estos ensayos deben tenerse en cuenta sus potenciales limitaciones.

Se espera un desarrollo continuado de nuevos fármacos agnósticos y con ello, el *screening* de biomarcadores posiblemente será parte del proceso diagnóstico habitual en la práctica clínica.

Se dispone de pocos estudios de evaluación económica sobre pruebas diagnósticas de cribado de los biomarcadores de fusión. Los datos aportados hacen referencia a precios y costes propios de los sistemas sanitarios y países donde se han desarrollado esos estudios, por lo que la generalización de los resultados debe hacerse con cautela. La NGS-RNA para el estudio de fusiones *NTRK* en pacientes

con tumores de alta prevalencia podría resultar económicamente interesante siempre que se realice la secuenciación de múltiples muestras y de varios pacientes de forma simultánea.

6.1. Para futuras investigaciones

Sería interesante planificar estudios de cohortes de gran tamaño con poblaciones bien definidas de pacientes oncológicos, en edad adulta y pediátrica, que comparen la efectividad diagnóstica de las distintas pruebas según el tipo de tumor y los biomarcadores predictivos, y que sean estudiados en diferentes etapas, incluyendo el momento de la realización de los tests, la toma de decisiones terapéuticas y la evolución del paciente tras el tratamiento, con un seguimiento clínico, a corto y a largo plazo.

Son necesarios más estudios sobre la efectividad terapéutica y utilidad clínica y seguridad de estos fármacos, donde se incluya un número elevado de pacientes y que permitan analizar variables de resultado de interés clínico pero también de interés para pacientes como la supervivencia global y calidad de vida, y no sólo variables subrogadas como la respuesta tumoral. También deben incluirse variables de seguridad sobre el tratamiento con estos fármacos, estudiando posibles eventos adversos consecuencia de la aplicación de un tratamiento u otro en función de los resultados de las pruebas diagnósticas y también analizando los casos de progresión de la enfermedad por desarrollo de resistencias a los mismos. Si para estos pacientes se decide administrar tratamiento con fármacos de nuevas generaciones, se analizará la efectividad y seguridad de estos tratamientos. También se necesitan estudios comparativos entre los diferentes fármacos agnósticos y entre estos y los tratamientos convencionales, a corto y largo plazo, que ayuden en la toma de decisiones para elegir el tratamiento más efectivo.

Igualmente se necesitan estudios de evaluación económica que permitan el análisis completo desde la aplicación de las pruebas diagnósticas, los tratamientos escogidos en función de los resultados de dichas pruebas, la efectividad terapéutica y los costes de los eventos adversos y otras consecuencias del tratamiento.

Sería interesante poder concentrar el conocimiento más avanzado y combinar los resultados de estudios con metodología rigurosa en un meta-análisis con el fin de aumentar el nivel de evidencia y grado de confianza en los resultados, de modo que sea posible aplicar dicho conocimiento y los recursos disponibles de forma eficiente a todos los pacientes que potencialmente se puedan beneficiar de estos tests y de los tratamientos personalizados.

La creación de grandes bases de datos de pacientes de diferentes centros hospitalarios, incluso de países distintos, para recoger en un periodo de tiempo corto los resultados relacionados con el diagnóstico de los diferentes biomarcadores y con los tratamientos utilizados, permitirá en el futuro analizar un mayor número de resultados en tiempos más cortos con los que generar información y evidencia basada en el mundo real.

7. Referencias

1. Seligson ND, Knepper TC, Ragg S, and Walko CM. Developing Drugs for Tissue-Agnostic Indications: A Paradigm Shift in Leveraging Cancer Biology for Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther.* 2021;109(2):334-42.
2. Ciardiello F, Arnold D, Casali PG, Cervantes A, Douillard JY, Eggermont A, *et al.* Delivering precision medicine in oncology today and in future—the promise and challenges of personalised cancer medicine: a position paper by the European Society for Medical Oncology (ESMO). *Ann Oncol.* 2014;25(9):1673-8.
3. Yates LR, Seoane J, Le Tourneau C, Siu LL, Marais R, Michiels S, *et al.* The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary. *Ann Oncol.* 2018;29(1):30-5.
4. Hayes DF, and Schott AF. Personalized Medicine: Genomics Trials in Oncology. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2015;126:133-43.
5. Schott AF, Perou CM, and Hayes DF. Genome Medicine in Cancer: What's in a Name? *Cancer Res.* 2015;75(10):1930-5.
6. March R, and Schott C. Personalized/Precision Medicine/Personalised Healthcare: the art of giving different names to the same thing? *Per Med.* 2017;14(6):463-6.
7. Tsimberidou AM, Hong DS, Wheler JJ, Falchook GS, Janku F, Naing A, *et al.* Long-term overall survival and prognostic score predicting survival: the IMPACT study in precision medicine. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):145.
8. Tsimberidou AM, Said R, Staudt LM, Conley BA, and Takebe N. Defining, Identifying, and Understanding «Exceptional Responders» in Oncology Using the Tools of Precision Medicine. *Cancer J.* 2019;25(4):296-9.
9. Rojo F, Colomer R, López-Ríos F, Bautista F, Álvarez R, de Álava E, *et al.* [Multidisciplinary consensus on optimizing the detection of NTRK gene alterations in tumours]. *Rev Esp Patol.* 2021;54(4):250-62.

10. Tsimberidou AM, Fountzilas E, Nikanjam M, and Kurzrock R. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm. *Cancer Treat Rev.* 2020;86:102019.
11. Keeling P, Clark J, and Finucane S. Challenges in the clinical implementation of precision medicine companion diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(6):593-9.
12. Marchetti A, Di Lorito A, Felicioni L, and Buttitta F. An innovative diagnostic strategy for the detection of rare molecular targets to select cancer patients for tumor-agnostic treatments. *Oncotarget.* 2019;10(65):6957-68.
13. Marchio C, Scaltriti M, Ladanyi M, Iafrate AJ, Bibeau F, Diel M, *et al.* ESMO recommendations on the standard methods to detect NTRK fusions in daily practice and clinical research. *Ann Oncol.* 2019;30(9):1417-27.
14. Zito Marino F, Pagliuca F, Ronchi A, Cozzolino I, Montella M, Berretta M, *et al.* NTRK Fusions, from the Diagnostic Algorithm to Innovative Treatment in the Era of Precision Medicine. *Int J Mol Sci.* 2020;21(10).
15. Amatu A, Sartore-Bianchi A, and Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open.* 2016;1(2):e000023.
16. Conde E, Hernandez S, Sanchez E, Regojo RM, Camacho C, Alonso M, *et al.* Pan-TRK Immunohistochemistry: An Example-Based Practical Approach to Efficiently Identify Patients With NTRK Fusion Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2021;145(8):1031-40.
17. Westphalen CB, Krebs MG, Le Tourneau C, Sokol ES, Maund SL, Wilson TR, *et al.* Genomic context of NTRK1/2/3 fusion-positive tumours from a large real-world population. *NPJ Precis Oncol.* 2021;5(1):69.
18. Bazhenova L, Lokker A, Snider J, Castellanos E, Fisher V, Fellous M, *et al.* TRK Fusion Cancer: Patient Characteristics and Survival Analysis in the Real-World Setting. *Target Oncol.* 2021;16(3):389-99.
19. Bridgewater J, Jiao X, Parimi M, Flach C, Stratford J, Kamburov A, *et al.* Prognosis and oncogenomic profiling of patients with tropomyosin receptor kinase fusion cancer in the 100,000 genomes project. *Cancer Treat Res Commun.* 2022;33:100623.

20. Forsythe A, Zhang W, Phillip Strauss U, Fellous M, Korei M, and Keating K. A systematic review and meta-analysis of neurotrophic tyrosine receptor kinase gene fusion frequencies in solid tumors. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2020;12.
21. Solomon JP, Benayed R, Hechtman JF, and Ladanyi M. Identifying patients with NTRK fusion cancer. *Ann Oncol*. 2019;30(Suppl_8):viii16-viii22.
22. Cocco E, Scaltriti M, and Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(12):731-47.
23. Albert CM, Davis JL, Federman N, Casanova M, and Laetsch TW. TRK Fusion Cancers in Children: A Clinical Review and Recommendations for Screening. *J Clin Oncol*. 2019;37(6):513-24.
24. Kummar S, Italiano A, Brose MS, Carlson JJ, Sullivan SD, Lassen U, *et al*. Diagnosis and management of TRK fusion cancer. *Am J Manag Care*. 2022;28(2 Suppl):S15-s25.
25. Conde E, Rojo F, Gómez J, Enguita AB, Abdulkader I, González A, *et al*. Molecular diagnosis in non-small-cell lung cancer: expert opinion on ALK and ROS1 testing. *J Clin Pathol*. 2022;75(3):145-53.
26. Rami Porta R, Pérez Ochoa F, and González Pont G. In: Matilla González JM ed. *Cáncer de pulmón Monografía 4*. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR); 2016.
27. He Y, Sun LY, Gong R, Liu Q, Long YK, Liu F, *et al*. The prevalence of EML4-ALK variants in patients with non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Biomark Med*. 2019;13(12):1035-44.
28. Marinelli D, Siringo M, Metro G, Ricciuti B, and Gelibter AJ. Non-small-cell lung cancer: how to manage ALK-, ROS1- and NTRK-rearranged disease. *Drugs Context*. 2022;11.
29. Viñal D, Martínez D, Higuera O, and de Castro J. Genomic profiling in non-small-cell lung cancer in young patients. A systematic review. *ESMO Open*. 2021;6(1):100045.
30. Solomon BJ, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, Felip E, *et al*. Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus

- Chemotherapy in ALK-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2018;36(22):2251-8.
31. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, *et al*. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(25):2385-94.
 32. Millares Costas L, and Monsó Molas E. In: Matilla González JM ed. *Biología molecular en el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de pulmón*. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR); 2016.
 33. Muguruza Trueba I, Reguera Puertas P, Martínez Sáez O, and Garrido López P. In: Matilla González JM ed. *Cáncer de pulmón Monografía 4*. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR); 2016.
 34. Pavlakis N, Cooper C, John T, Kao S, Klebe S, Lee CK, *et al*. Australian consensus statement for best practice ROS1 testing in advanced non-small cell lung cancer. *Pathology*. 2019;51(7):673-80.
 35. Patil T, Smith DE, Bunn PA, Aisner DL, Le AT, Hancock M, *et al*. The Incidence of Brain Metastases in Stage IV ROS1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer and Rate of Central Nervous System Progression on Crizotinib. *J Thorac Oncol*. 2018;13(11):1717-26.
 36. Guaitoli G, Bertolini F, Bettelli S, Manfredini S, Maur M, Trudu L, *et al*. Deepening the Knowledge of ROS1 Rearrangements in Non-Small Cell Lung Cancer: Diagnosis, Treatment, Resistance and Concomitant Alterations. *Int J Mol Sci*. 2021;22(23).
 37. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, *et al*. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-46.
 38. Santoro M, Moccia M, Federico G, and Carlomagno F. RET Gene Fusions in Malignancies of the Thyroid and Other Tissues. *Genes (Basel)*. 2020;11(4).
 39. Subbiah V, Wolf J, Konda B, Kang H, Spira A, Weiss J, *et al*. Tumour-agnostic efficacy and safety of selpercatinib in patients with RET fusion-positive solid

- tumours other than lung or thyroid tumours (LIBRETTO-001): a phase 1/2, open-label, basket trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(10):1261-73.
40. Subbiah V, Yang D, Velcheti V, Drilon A, and Meric-Bernstam F. State-of-the-Art Strategies for Targeting RET-Dependent Cancers. *J Clin Oncol.* 2020;38(11):1209-21.
 41. Belli C, Penault-Llorca F, Ladanyi M, Normanno N, Scoazec JY, Lacroix L, *et al.* ESMO recommendations on the standard methods to detect RET fusions and mutations in daily practice and clinical research. *Ann Oncol.* 2021;32(3):337-50.
 42. Romei C, Ciampi R, Casella F, Tacito A, Torregrossa L, Ugolini C, *et al.* RET mutation heterogeneity in primary advanced medullary thyroid cancers and their metastases. *Oncotarget.* 2018;9(11):9875-84.
 43. Belli C, Anand S, Gainor JF, Penault-Llorca F, Subbiah V, Drilon A, *et al.* Progresses Toward Precision Medicine in RET-altered Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2020;26(23):6102-11.
 44. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J, *et al.* Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(9):813-24.
 45. Hechtman JF. NTRK insights: best practices for pathologists. *Mod Pathol.* 2022;35(3):298-305.
 46. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, *et al.* Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(11):1547-51.
 47. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, *et al.* NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(6):791-8.
 48. Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA, Vargas SO, Sheridan R, Black JO, *et al.* Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(7):927-35.
 49. Penault-Llorca F, Rudzinski ER, and Sepulveda AR. Testing algorithm for identification of patients with TRK fusion cancer. *J Clin Pathol.* 2019;72(7):460-7.

50. Solomon JP, and Hechtman JF. Detection of NTRK Fusions: Merits and Limitations of Current Diagnostic Platforms. *Cancer Res.* 2019;79(13):3163-8.
51. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, and Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Modern Pathology.* 2019;32(1):147-53.
52. De Winne K, Sorber L, Lambin S, Siozopoulou V, Beniuga G, Dedeurwaerdere F, *et al.* Immunohistochemistry as a screening tool for NTRK gene fusions: results of a first Belgian ring trial. *Virchows Arch.* 2021;478(2):283-91.
53. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D, *et al.* NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol.* 2020;33(1):38-46.
54. Conde E, Hernandez S, Prieto M, Martinez R, and Lopez-Rios F. Profile of Ventana ALK (D5F3) companion diagnostic assay for non-small-cell lung carcinomas. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16(6):707-13.
55. Uruga H, and Mino-Kenudson M. ALK (D5F3) CDx: an immunohistochemistry assay to identify ALK-positive NSCLC patients. *Pharmgenomics Pers Med.* 2018;11:147-55.
56. Jiang L, Yang H, He P, Liang W, Zhang J, Li J, *et al.* Improving Selection Criteria for ALK Inhibitor Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Pooled-Data Analysis on Diagnostic Operating Characteristics of Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(5):697-703.
57. Ma H, Yao WX, Huang L, Jin SH, Liu DH, Liu Y, *et al.* Efficacy of D5F3 IHC for detecting ALK gene rearrangement in NSCLC patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016;7(43):70128-42.
58. Brisudova A, and Skarda J. Gene rearrangement detection by next-generation sequencing in patients with non-small cell lung carcinoma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2020;164(2):127-32.
59. Zito Marino F, Ali G, Facchinetti F, Righi L, Fontanini G, Rossi G, *et al.* Fusion proteins in lung cancer: addressing diagnostic problems for deciding therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2021;21(8):887-900.
60. Ferrara R, Auger N, Auclin E, and Besse B. Clinical and Translational Implications of RET Rearrangements in Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2018;13(1):27-45.

61. Roncancio-Velandia T, Parra-Medina R, Mejía JC, and Guevara-Pardo G. Hibridación in situ fluorescente (FISH) en el Instituto Nacional de Cancerología (INC) de Colombia. Experiencia de 5 años. *Rev Colom Cancerol*. 2019;23(1):3-11.
62. Chrzanowska NM, Kowalewski J, and Lewandowska MA. Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors. *Molecules*. 2020;25(8).
63. Wong D, Yip S, and Sorensen PH. Methods for Identifying Patients with Tropomyosin Receptor Kinase (TRK) Fusion Cancer. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(3):1385-99.
64. Wojas-Krawczyk K, Krawczyk PA, Ramlau RA, Szumilo J, Kozielski J, Kalinka-Warzocho E, *et al*. The analysis of ALK gene rearrangement by fluorescence in situ hybridization in non-small cell lung cancer patients. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2013;17(6):484-92.
65. Davies KD, Le AT, Sheren J, Nijmeh H, Gowan K, Jones KL, *et al*. Comparison of Molecular Testing Modalities for Detection of ROS1 Rearrangements in a Cohort of Positive Patient Samples. *J Thorac Oncol*. 2018;13(10):1474-82.
66. Garrido P, Conde E, de Castro J, Gomez-Roman JJ, Felip E, Pijuan L, *et al*. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(7):989-1003.
67. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, Le AT, Estrada-Bernal A, Keysar S, *et al*. An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov*. 2015;5(10):1049-57.
68. Davis JL, Lockwood CM, Stohr B, Boecking C, Al-Ibraheemi A, DuBois SG, *et al*. Expanding the Spectrum of Pediatric NTRK-rearranged Mesenchymal Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2019;43(4):435-45.
69. Rogers TM, Russell PA, Wright G, Wainer Z, Pang JM, Henricksen LA, *et al*. Comparison of methods in the detection of ALK and ROS1 rearrangements in lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(4):611-8.

70. Wagner F, Streubel A, Roth A, Stephan-Falkenau S, and Mairinger T. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) is a powerful method to detect ALK-positive non-small cell lung carcinomas. *J Clin Pathol*. 2014;67(5):403-7.
71. Kim H, Yoo SB, Choe JY, Paik JH, Xu X, Nitta H, *et al*. Detection of ALK gene rearrangement in non-small cell lung cancer: a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization with correlation of ALK protein expression. *J Thorac Oncol*. 2011;6(8):1359-66.
72. Ali G, Bruno R, Savino M, Giannini R, Pelliccioni S, Menghi M, *et al*. Analysis of Fusion Genes by NanoString System: A Role in Lung Cytology? *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(4):480-9.
73. Zhang X, Zhou JG, Wu HL, Ma H, and Jiang ZX. Diagnostic accuracy of PCR for detecting ALK gene rearrangement in NSCLC patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(43):75400-10.
74. Hernandez M, Quijada NM, Rodriguez-Lazaro D, and Eiros JM. [Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis]. *Rev Argent Microbiol*. 2020;52(2):150-61.
75. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, *et al*. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.
76. Calabria I, Pedrola L, Berlanga P, Aparisi MJ, Sanchez-Izquierdo D, Canete A, *et al*. [The new challenge in oncology: Next-generation sequencing and its application in precision medicine]. *An Pediatr (Barc)*. 2016;85(5):273 e1- e7.
77. Esagian SM, Grigoriadou G, Nikas IP, Boikou V, Sadow PM, Won JK, *et al*. Comparison of liquid-based to tissue-based biopsy analysis by targeted next generation sequencing in advanced non-small cell lung cancer: a comprehensive systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020;146(8):2051-66.
78. Food and Drug Administration (FDA) Approves Companion Diagnostic to identify NTRK fusions in solid tumors for Vitrakvi. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-companion-diagnostic-identify-ntrk-fusions-solid-tumors-vitrakvi>. 2020.
79. Haimidi V, Flodgren GM, Meneses-Echavez JF, and Bidonde J. Tests for the detection of NTRK gene fusions in patients with locally advanced or metastatic

- solid tumours. A Health Technology Assessment. *Norwegian Institute of Public Health*. 2022.
80. Han SY. TRK Inhibitors: Tissue-Agnostic Anti-Cancer Drugs. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021;14(7).
 81. Lavacchi D, Roviello G, and D'Angelo A. Tumor-Agnostic Treatment for Cancer: When How is Better than Where. *Clin Drug Investig*. 2020;40(6):519-27.
 82. Hierro C, Matos I, Martin-Liberal J, Ochoa de Olza M, and Garralda E. Agnostic-Histology Approval of New Drugs in Oncology: Are We Already There? *Clin Cancer Res*. 2019;25(11):3210-9.
 83. Marcus L, Lemery SJ, Keegan P, and Pazdur R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2019;25(13):3753-8.
 84. Yoshino T, Pentheroudakis G, Mishima S, Overman MJ, Yeh KH, Baba E, *et al*. JSCO-ESMO-ASCO-JSMO-TOS: international expert consensus recommendations for tumour-agnostic treatments in patients with solid tumours with microsatellite instability or NTRK fusions. *Ann Oncol*. 2020;31(7):861-72.
 85. Yan L, and Zhang W. Precision medicine becomes reality-tumor type-agnostic therapy. *Cancer Commun (Lond)*. 2018;38(1):6.
 86. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, *et al*. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Annals of Oncology*. 2018;29(9):1895-902.
 87. Food and Drug Administration (FDA). VITRAKVI® (larotrectinib) - Highlights of prescribing information. [consultado el 19 de mayo de 2021] Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2018/211710s000lbl.pdf. 2018.
 88. European Medicines Agency (EMA). Vitrakvi: EPAR - Product information [consultado el 19 de mayo de 2021] Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vitrakvi>. 2019.
 89. Hong DS, DuBois SG, Kummar S, Farago AF, Albert CM, Rohrberg KS, *et al*. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol*. 2020;21(4):531-40.

90. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, *et al.* Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med.* 2018;378(8):731-9.
91. Laetsch TW, DuBois SG, Mascarenhas L, Turpin B, Federman N, Albert CM, *et al.* Larotrectinib for paediatric solid tumours harbouring NTRK gene fusions: phase 1 results from a multicentre, open-label, phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(5):705-14.
92. Hong DS, Shen L, van Tilburg CM, Tan DSW, Kummar S, Lin JJ, *et al.* Long-term efficacy and safety of larotrectinib in an integrated dataset of patients with TRK fusion cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2021;39:3108-.
93. Food and Drug Administration. FDA approves entrectinib for NTRK solid tumors and ROS-1 NSCLC. [consultado el 19 de mayo de 2021] Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-entrectinib-ntrk-solid-tumors-and-ros-1-nsclc>. 2019.
94. European Medicines Agency (EMA). CHMP summary of positive opinion for Rozlytrek [consultado el 19 de mayo de 2021] Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/chmp-summary-positive-opinion-rozlytrek_en.pdf. 2020.
95. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, *et al.* Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21(2):271-82.
96. Drilon A, Barlesi F, Braud FD, Cho BC, Ahn M-J, Siena S, *et al.* Abstract CT192: Entrectinib in locally advanced or metastatic ROS1 fusion-positive non-small cell lung cancer (NSCLC): Integrated analysis of ALKA-372-001, STARTRK-1 and STARTRK-2. *Cancer Research.* 2019;79(13_Supplement):CT192-CT.
97. Drilon A, Siena S, Ou SI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, *et al.* Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov.* 2017;7(4):400-9.
98. Delgado J, Pean E, Melchiorri D, Migali C, Josephson F, Enzmann H, *et al.* The European Medicines Agency review of entrectinib for the treatment of adult or paediatric patients with solid tumours who have a neurotrophic tyrosine

- receptor kinase gene fusions and adult patients with non-small-cell lung cancer harbouring ROS1 rearrangements. *ESMO Open*. 2021;6(2):100087.
99. Demetri GD, De Braud F, Drilon A, Siena S, Patel MR, Cho BC, *et al*. Updated Integrated Analysis of the Efficacy and Safety of Entrectinib in Patients With NTRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Clin Cancer Res*. 2022;28(7):1302-12.
100. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Vitrakvi. Ficha técnica. https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/1191385002/FT_1191385002html.pdf. 2019.
101. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Rozlytrek. Ficha técnica. https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/1201460001/FT_1201460001html.pdf. 2020.
102. Drilon A, Nagasubramanian R, Blake JF, Ku N, Tuch BB, Ebata K, *et al*. A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Cancer Discov*. 2017;7(9):963-72.
103. Carlson JJ, Italiano A, Brose MS, Federman N, Lassen U, Kummar S, *et al*. Comparative effectiveness of larotrectinib and entrectinib for TRK fusion cancer. *Am J Manag Care*. 2022;28(2 Suppl):S26-S32.
104. Drilon A. TRK inhibitors in TRK fusion-positive cancers. *Ann Oncol*. 2019;30(Suppl_8):viii23-viii30.
105. Harada G, and Drilon A. TRK inhibitor activity and resistance in TRK fusion-positive cancers in adults. *Cancer Genet*. 2022;264-265:33-9.
106. Harada G, Santini FC, Wilhelm C, and Drilon A. NTRK fusions in lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*. 2021;161:108-13.
107. Liu Z, Yu P, Dong L, Wang W, Duan S, Wang B, *et al*. Discovery of the Next-Generation Pan-TRK Kinase Inhibitors for the Treatment of Cancer. *J Med Chem*. 2021;64(14):10286-96.
108. Food and Drug Administration. FDA Approves Crizotinib Capsules. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-crizotinib-capsules>. 2016.

109. European Medicines Agency (EMA). Xalkori: EPAR - Product Information. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/xalkori-epar-summary-public_en.pdf. 2018.
110. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, *et al.* Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237.
111. Vuong HG, Nguyen TQ, Nguyen HC, Nguyen PT, Ho ATN, and Hassell L. Efficacy and Safety of Crizotinib in the Treatment of Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with ROS1 Rearrangement or MET Alteration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Targeted Oncology.* 2020;15(5):589-98.
112. Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, *et al.* Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch.* 2016;469(5):489-503.
113. Elliott J, Bai Z, Hsieh SC, Kelly SE, Chen L, Skidmore B, *et al.* ALK inhibitors for non-small cell lung cancer: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS One.* 2020;15(2):e0229179.
114. Wang L, and Wang W. Safety and efficacy of anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep.* 2021;45(1):13-28.
115. Wirth LJ, Sherman E, Robinson B, Solomon B, Kang H, Lorch J, *et al.* Efficacy of Selpercatinib in RET-Altered Thyroid Cancers. *N Engl J Med.* 2020;383(9):825-35.
116. Food and Drug Administration (FDA). Access Data on Selpercatinib (Retevmo). *Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration; 2020* Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/213246s000lbl.pdf Con acceso el 7 de junio de 2021. 2020
117. Markham A. Selpercatinib: First Approval. *Drugs.* 2020;80(11):1119-24.
118. Zhou C, Solomon B, Loong HH, Park K, Perol M, Arriola E, *et al.* First-Line Selpercatinib or Chemotherapy and Pembrolizumab in RET Fusion-Positive NSCLC. *N Engl J Med.* 2023;389(20):1839-50.
119. Food and Drug Administration (FDA). Access Data on Pralsetinib (Gavreto). *Silver Spring, MD: US Food and Drug Administration; 2020.* Disponible en:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2020/213721s000lbl.pdf Con acceso el 7 de junio de 2021. 2020

120. Subbiah V, Gainor JF, Rahal R, Brubaker JD, Kim JL, Maynard M, *et al.* Precision Targeted Therapy with BLU-667 for RET-Driven Cancers. *Cancer Discov.* 2018;8(7):836-49.
121. Thein KZ, Velcheti V, Mooers BHM, Wu J, and Subbiah V. Precision therapy for RET-altered cancers with RET inhibitors. *Trends Cancer.* 2021;7(12):1074-88.
122. Flodgren GM, and Haimidi V. Tests for detection of ROS1 gene alterations in people with non-small cell lung cancer (NSCLC). A health technology assessment 2021. *Norwegian Institute of Public Health.* 2021.
123. Marchetti A, Ferro B, Pasciuto MP, Zampacorta C, Buttitta F, and D»Angelo E. NTRK gene fusions in solid tumors: agnostic relevance, prevalence and diagnostic strategies. *Pathologica.* 2022;114(3):199-216.
124. Lim KHT, Kong HL, Chang KTE, Tan DSW, Tan IBH, Mohamad F, *et al.* Recommended testing algorithms for NTRK gene fusions in pediatric and selected adult cancers: Consensus of a Singapore Task Force. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2022;18(4):394-403.
125. Navarro S, Cuatrecasas M, Hernández-Losa J, Landolfi S, Musulén E, Ramón YCS, *et al.* [Update of the recommendations for the determination of biomarkers in colorectal carcinoma. National Consensus of the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology]. *Rev Esp Patol.* 2021;54(1):41-54.
126. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, *et al.* Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Annals of Oncology.* 2020;31(11):1491-505.
127. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines Version 2.2022—Non-Small Cell Lung Cancer. In NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines VR); NCCN Evidence Blocks™: Washington, DC, USA. 2022.
128. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leigh NB, *et al.* Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American

- Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(9):911-9.
129. Bebb DG, Banerji S, Blais N, Desmeules P, Gill S, Grin A, *et al*. Canadian Consensus for Biomarker Testing and Treatment of TRK Fusion Cancer in Adults. *Current oncology (Toronto, Ont)*. 2021;28(1):523-48.
 130. Perreault S, Chami R, Deyell RJ, El Demellawy D, Ellezam B, Jabado N, *et al*. Canadian Consensus for Biomarker Testing and Treatment of TRK Fusion Cancer in Pediatric Patients. *Current oncology (Toronto, Ont)*. 2021;28(1):346-66.
 131. Naito Y, Mishima S, Akagi K, Igarashi A, Ikeda M, Okano S, *et al*. Japan society of clinical oncology/Japanese society of medical oncology-led clinical recommendations on the diagnosis and use of tropomyosin receptor kinase inhibitors in adult and pediatric patients with neurotrophic receptor tyrosine kinase fusion-positive advanced solid tumors, cooperated by the Japanese society of pediatric hematology/oncology. *International Journal of Clinical Oncology*. 2020;25(3):403-17.
 132. Demetri GD, Antonescu CR, Bjerkeheggen B, Bovée JVMG, Boye K, Chacón M, *et al*. Diagnosis and management of tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion sarcomas: expert recommendations from the World Sarcoma Network. *Annals of Oncology*. 2020;31(11):1506-17.
 133. Prabhash K, Advani SH, Batra U, Biswas B, Chougule A, Ghosh M, *et al*. Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancers: Indian Consensus Guidelines for Molecular Testing. *Adv Ther*. 2019;36(4):766-85.
 134. Pollack M, Keating K, Wissinger E, Jackson L, Sarnes E, and Cuffel B. Transforming approaches to treating TRK fusion cancer: historical comparison of larotrectinib and histology-specific therapies. *Curr Med Res Opin*. 2021;37(1):59-70.
 135. Garcia-Foncillas J, Bokemeyer C, Italiano A, Keating K, Paracha N, Fellous M, *et al*. Indirect Treatment Comparison of Larotrectinib versus Entrectinib in Treating Patients with TRK Gene Fusion Cancers. *Cancers (Basel)*. 2022;14(7).

136. Italiano A, Nanda S, Briggs A, Garcia-Foncillas J, Lassen U, Vassal G, *et al.* Larotrectinib versus Prior Therapies in Tropomyosin Receptor Kinase Fusion Cancer: An Intra-Patient Comparative Analysis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(11).
137. Hong DS, Italiano A, Briggs A, Garcia-Foncillas J, Lassen UN, Vassal G, *et al.* Intra-patient comparison from larotrectinib clinical trials in TRK fusion cancer: An expanded dataset. *Journal of Clinical Oncology*. 2021;39(15_suppl):3114-.
138. Krebs MG, Blay JY, Le Tourneau C, Hong D, Veronese L, Antoniou M, *et al.* Inpatient comparisons of efficacy in a single-arm trial of entrectinib in tumour-agnostic indications. *ESMO Open*. 2021;6(2):100072.
139. Roth JA, Carlson JJ, Xia F, Williamson T, and Sullivan SD. The Potential Long-Term Comparative Effectiveness of Larotrectinib and Entrectinib for Second-Line Treatment of TRK Fusion-Positive Metastatic Lung Cancer. *J Manag Care Spec Pharm*. 2020;26(8):981-6.
140. Suh K, Carlson JJ, Xia F, Williamson T, and Sullivan SD. Comparative effectiveness of larotrectinib versus entrectinib for the treatment of metastatic NTRK gene fusion cancers. *J Comp Eff Res*. 2022;11(14):1011-9.
141. Suh K, Carlson JJ, Xia F, Williamson T, and Sullivan SD. The potential long-term comparative effectiveness of larotrectinib vs standard of care for treatment of metastatic TRK fusion thyroid cancer, colorectal cancer, and soft tissue sarcoma. *J Manag Care Spec Pharm*. 2022;28(6):622-30.
142. Chu P, Antoniou M, Bhutani MK, Aziez A, and Daigl M. Matching-adjusted indirect comparison: entrectinib versus crizotinib in ROS1 fusion-positive non-small cell lung cancer. *J Comp Eff Res*. 2020;9(12):861-76.
143. Chu P, Batson S, Hodgson M, Mitchell CR, and Steenrod A. Systematic review of neurotrophic tropomyosin-related kinase inhibition as a tumor-agnostic management strategy. *Future Oncol*. 2020;16(4):61-74.
144. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Larotrectinib for treating NTRK fusion-positive solid tumours. Technology appraisal guidance. www.nice.org.uk/guidance/ta630 2020.
145. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Entrectinib for treating NTRK fusion-positive solid tumours. Technology appraisal guidance. www.nice.org.uk/guidance/ta644. 2020.

146. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Entrectinib for treating ROS1-positive advanced nonsmall-cell lung cancer. Technology appraisal guidance. www.nice.org.uk/guidance/ta643. 2020.
147. Scottish Medicines Consortium (SMC). Entrectinib 100 mg and 200 mg hard capsules (Rozlytrek®). *Disponible en www.scottishmedicines.org.uk*. 2021.
148. Scottish Medicines Consortium (SMC). Entrectinib as monotherapy for the treatment of adult and paediatric patients 12 years of age and older with solid tumours expressing a neurotrophic tyrosine receptor kinase (NTRK) gene fusion Scotland, United Kingdom: Scottish Medicines Consortium (SMC); 2021.
149. Marino P, Touzani R, Perrier L, Rouleau E, Kossi DS, Zhaomin Z, *et al*. Cost of cancer diagnosis using next-generation sequencing targeted gene panels in routine practice: a nationwide French study. *Eur J Hum Genet*. 2018;26(3):314-23.
150. Pages A, Foulon S, Zou Z, Lacroix L, Lemare F, de Baere T, *et al*. The cost of molecular-guided therapy in oncology: a prospective cost study alongside the MOSCATO trial. *Genet Med*. 2017;19(6):683-90.
151. Beresford L, Murphy P, Dias S, Claxton L, Walton M, Metcalf R, *et al*. Appraising the Costs of Genomic Testing for Histology-Independent Technologies: An Illustrative Example for NTRK Fusions. *Value Health*. 2022;25(7):1133-40.
152. Michels RE, Arteaga CH, Peters ML, Kapiteijn E, Van Herpen CML, and Krol M. Economic Evaluation of a Tumour-Agnostic Therapy: Dutch Economic Value of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers. *Appl Health Econ Health Policy*. 2022;20(5):717-29.
153. Huygens S, Vellekoop H, Versteegh M, Santi I, Szilberhorn L, Zelei T, *et al*. Cost-Effectiveness Analysis of Treating Patients With NTRK-Positive Cancer With the Histology-Independent Therapy Entrectinib. *Value Health*. 2023;26(2):193-203.
154. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, Haddow JE, Piper M, Calonge N, *et al*. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med*. 2009;11(1):3-14.
155. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines Version 5.2019 - Non-Small Cell Lung Cancer. In NCCN Clinical Practice Guidelines

- in Oncology (NCCN Guidelines[®]); NCCN Evidence Blocks[™]: Washington, DC, USA. 2019.
156. Garrido P, Hladun R, de Alava E, Alvarez R, Bautista F, Lopez-Rios F, *et al.* Multidisciplinary consensus on optimising the detection of NTRK gene alterations in tumours. *Clin Transl Oncol.* 2021;23(8):1529-41.
 157. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Paz-Ares L, Belda-Iniesta C, Hidalgo M, *et al.* Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clin Transl Oncol.* 2013;15(7):503-8.
 158. Isla D, Lozano MD, Paz-Ares L, Salas C, de Castro J, Conde E, *et al.* New update to the guidelines on testing predictive biomarkers in non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* 2023;25(5):1252-67.
 159. Murphy DA, Ely HA, Shoemaker R, Boomer A, Culver BP, Hoskins I, *et al.* Detecting Gene Rearrangements in Patient Populations Through a 2-Step Diagnostic Test Comprised of Rapid IHC Enrichment Followed by Sensitive Next-Generation Sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(7):513-23.
 160. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, *et al.* Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2013;137(6):828-60.
 161. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Evaluation of Anticancer Medicinal Products in Man. Disponible online en: <https://www.ema.europa.eu/en/evaluation-anticancer-medicinal-products-man-scientific-guideline> (con acceso el 19 de enero de 2022). 2020.
 162. Chen Y, and Chi P. Basket trial of TRK inhibitors demonstrates efficacy in TRK fusion-positive cancers. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):78.
 163. Elfving H, Brostrom E, Moens LNJ, Almlöf J, Cerjan D, Lauter G, *et al.* Evaluation of NTRK immunohistochemistry as a screening method for NTRK gene fusion detection in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2021;151:53-9.

164. Pitini E, De Vito C, Marzuillo C, D'Andrea E, Rosso A, Federici A, *et al.* How is genetic testing evaluated? A systematic review of the literature. *European Journal of Human Genetics*. 2018;26(5):605-15.
165. Pitini E, D'Andrea E, De Vito C, Rosso A, Unim B, Marzuillo C, *et al.* A proposal of a new evaluation framework towards implementation of genetic tests. *PLOS ONE*. 2019;14(8):e0219755.
166. EUnetHTA Joint Action 2 WP. HTA Core Model ® version 3.0 (Pdf). <http://www.eunethta.eu/hta-core-model>. Accessed Disponible en www.htacoremodel.info/BrowseModel.aspx. [Acceso: 26/04/2021].
167. Le Tourneau C, Kamal M, Alt M, Verlingue L, Servois V, Sablin MP, *et al.* The spectrum of clinical trials aiming at personalizing medicine. *Chin Clin Oncol*. 2014;3(2):13.
168. Le Tourneau C, Kamal M, Tsimberidou AM, Bedard P, Pierron G, Callens C, *et al.* Treatment Algorithms Based on Tumor Molecular Profiling: The Essence of Precision Medicine Trials. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(4).
169. Tsimberidou AM, Wen S, Hong DS, Wheler JJ, Falchook GS, Fu S, *et al.* Personalized medicine for patients with advanced cancer in the phase I program at MD Anderson: validation and landmark analyses. *Clin Cancer Res*. 2014;20(18):4827-36.
170. Tsimberidou AM, Iskander NG, Hong DS, Wheler JJ, Falchook GS, Fu S, *et al.* Personalized medicine in a phase I clinical trials program: the MD Anderson Cancer Center initiative. *Clin Cancer Res*. 2012;18(22):6373-83.
171. Massard C, Michiels S, Ferte C, Le Deley MC, Lacroix L, Hollebecque A, *et al.* High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov*. 2017;7(6):586-95.
172. Murphy P, Claxton L, Hodgson R, Glynn D, Beresford L, Walton M, *et al.* Exploring Heterogeneity in Histology-Independent Technologies and the Implications for Cost-Effectiveness. *Med Decis Making*. 2021;41(2):165-78.
173. van de Wetering EJ, van Exel J, and Brouwer WB. The Challenge of Conditional Reimbursement: Stopping Reimbursement Can Be More Difficult Than Not Starting in the First Place! *Value Health*. 2017;20(1):118-25.

174. Wenzl M, and Chapman S. Performance-based managed entry agreements for new medicines in OECD countries and EU member states. 2019.
175. Kummar S, Berlin J, Mascarenhas L, van Tilburg CM, Georger B, Lassen UN, *et al.* Quality of Life in Adult and Pediatric Patients with Tropomyosin Receptor Kinase Fusion Cancer Receiving Larotrectinib. *Curr Probl Cancer.* 2021;45(6):100734.
176. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/guideline-evaluation-anticancer-medicinal-products-man-revision-5_en.pdf. 2017.
177. Klink AJ, Kavati A, Gassama AT, Kozlek T, Gajra A, and Antoine R. Timing of NTRK Gene Fusion Testing and Treatment Modifications Following TRK Fusion Status Among US Oncologists Treating TRK Fusion Cancer. *Target Oncol.* 2022;17(3):321-8.
178. Rodriguez-Lescure A, de la Pena FA, Aranda E, Calvo A, Felip E, Garrido P, *et al.* Study of the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM) on the access to oncology drugs and predictive biomarkers in Spain. *Clin Transl Oncol.* 2020;22(12):2253-63.
179. SEOM-SEAP. Encuesta sobre Medicina de Precisión. https://seom.org/images/Resultados_encuesta_Medicina_Precision_2022.pdf. 2022.
180. Food and Drug Administration (FDA). List of Cleared or Approved Companion Diagnostic Devices (In Vitro and Imaging Tools). Disponible en: <https://www.fda.gov/medical-devices/in-vitro-diagnostics/list-cleared-or-approved-companion-diagnostic-devices-in-vitro-and-imaging-tools>

8. Anexos

Anexo I. ESCAT.

Tabla 5. Niveles ESCAT.

	ESCAT evidence tier	Required level of evidence	Clinical value class	Clinical implication
Ready for routine use	I: Alteration-drug match is associated with improved outcome in clinical trials	<p>I-A: prospective, randomised clinical trials show the alteration-drug match in a specific tumour type results in a clinically meaningful improvement of a survival end point</p> <p>I-B: prospective, non-randomised clinical trials show that the alteration-drug match in a specific tumour type, results in clinically meaningful benefit as defined by ESMO MCBS 1.1</p> <p>I-C: clinical trials across tumour types or basket clinical trials show clinical benefit associated with the alteration-drug match, with similar benefit observed across tumour types</p>	Drug administered to patients with the specific molecular alteration has led to improved clinical outcome in prospective clinical trial(s)	Access to the treatment should be considered standard of care
Investigational	II: alteration-drug match is associated with antitumour activity, but magnitude of benefit is unknown	<p>II-A: retrospective studies show patients with the specific alteration in a specific tumour type experience clinically meaningful benefit with matched drug compared with alteration-negative patients</p> <p>II-B: prospective clinical trial(s) show the alteration-drug match in a specific tumour type results in increased responsiveness when treated with a matched drug, however, no data currently available on survival end points</p>	Drug administered to a molecularly defined patient population is likely to result in clinical benefit in a given tumour type, but additional data are needed	Treatment to be considered 'preferable' in the context of evidence collection either as a prospective registry or as a prospective clinical trial

Tabla 5. Niveles ESCAT.

	ESCAT evidence tier	Required level of evidence	Clinical value class	Clinical implication
Hypothetical target	III: alteration-drug match suspected to improve outcome based on clinical trial data in other tumour type(s) or with similar molecular alteration	III-A: clinical benefit demonstrated in patients with the specific alteration (as tiers I and II above) but in a different tumour type. Limited/absence of clinical evidence available for the patient-specific cancer type or broadly across cancer types III-B: an alteration that has a similar predicted functional impact as an already studied tier I abnormality in the same gene or pathway, but does not have associated supportive clinical data	Drug previously shown to benefit the molecularly defined subset in another tumour type (or with a different mutation in the same gene), efficacy therefore is anticipated for but not proved	Clinical trials to be discussed with patients
	IV: pre-clinical evidence of actionability	IV-A: evidence that the alteration or a functionally similar alteration influences drug sensitivity in preclinical in vitro or in vivo models IV-B: actionability predicted in silico	Actionability is predicted based on preclinical studies, no conclusive clinical data available	Treatment should 'only be considered' in the context of early clinical trials. Lack of clinical data should be stressed to patients
Combination development	V: alteration-drug match is associated with objective response, but without clinically meaningful benefit	Prospective studies show that targeted therapy is associated with objective responses, but this does not lead to improved outcome	Drug is active but does not prolong PFS or OS, probably in part due to mechanisms of adaptation	Clinical trials assessing drug combination strategies could be considered
	X: lack of evidence for actionability	No evidence that the genomic alteration is therapeutically actionable	There is no evidence, clinical or preclinical, that a genomic alteration is a potential therapeutic target	The finding should not be taken into account for clinical decision

ESCAT: ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets.

Anexo II. Companion Diagnostic (CDx)

En septiembre de 1998, la FDA aprobó el primer *companion diagnostic (CDx) test*, con la aprobación simultánea del trastuzumab y el test HER2 de IHQ, HercepTest. El concepto de *CDx* se refiere a un modelo de codesarrollo fármaco-diagnóstico. La FDA ha aprobado varios *CDx* ([180](#)), bien *in vitro* (IVD) o de imagen, que aportan información esencial para un uso seguro y efectivo de la terapia correspondiente. La utilización de los IVD se recoge en las instrucciones de uso del dispositivo diagnóstico y en el etiquetado del correspondiente fármaco o grupo específico de fármacos oncológicos indicados.

A partir de 2014, la FDA hace obligatorio el uso de un test *CDx* concreto y debe realizarse siempre antes de prescribir el correspondiente fármaco a un paciente.

Los test *CDx* más frecuentes habían sido IHQ y FISH, pero en 2011 se aprobó el primer *CDx* basado en PCR, denominado cobas 4800 BRAF V600 Mutation Test (de Roche Molecular System), indicado para la detección de la mutación *BRAF V600E* en pacientes con melanoma candidatos a vemurafenib. Después se aprobaron otros *CDx* basados en NGS: el primero fue FoundationFocus *CDxBRCA* Assay (de Foundation Medicine) para la detección de *BRCA1* y *BRCA2* en pacientes con cáncer de ovario posibles candidatas a rucaparib.

En la [Tabla 6](#) se presentan los *CDx* aprobados por la FDA para biomarcadores, fármacos e indicaciones clínicas concretas.

Tabla 6. CDx aprobados por la FDA

CDx	Indicación clínica	Fármaco	Biomarcador	Enlace / Fecha
FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc.)	NSCLC - Tejido	Xalkori (crizotinib)	ALK reordenamientos	P170019 (11/30/2017)
FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc.)	NSCLC - Tejido	Alecensa (alectinib)	ALK reordenamientos	P170019 (11/30/2017)
FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc.)	NSCLC - Tejido	Zykadia (ceritinib)	ALK reordenamientos	P170019 (11/30/2017)
FoundationOne Liquid CDx (Foundation Medicine, Inc.)	NSCLC - Plasma	Alecensa (alectinib)	ALK reordenamientos	P200006 (10/26/2020)

Tabla 6. CDx aprobados por la FDA

CDx	Indicación clínica	Fármaco	Biomarcador	Enlace / Fecha
FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc.)	NSCLC - Tejido	Rozlytrek (entrectinib)	<i>ROS1</i> fusiones	P170019/S014 (06/07/2022)
FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc.)	Tumores sólidos - Tejido	Rozlytrek (entrectinib)	<i>NTRK1</i> , <i>NTRK2</i> and <i>NTRK3</i> fusiones	P170019/S014 (06/07/2022)
FoundationOne CDx (Foundation Medicine, Inc.)	Tumores sólidos - Tejido	Vitrakvi (larotrectinib)	<i>NTRK1</i> , <i>NTRK2</i> and <i>NTRK3</i> fusiones	P170019/S017 (10/23/2020)
Oncomine Dx Target Test (Life Technologies Corporation)	NSCLC - Tejido	Xalkori (crizotinib)	<i>ROS1</i> fusiones	P160045 (06/22/2017)
Oncomine Dx Target Test (Life Technologies Corporation)	NSCLC - Tejido	Retevmo (selpercatinib)	<i>RET</i> fusiones	P160045/S031 (09/21/2022)
Oncomine Dx Target Test (Life Technologies Corporation)	Carcinoma medular de tiroides - Tejido	Retevmo (selpercatinib)	<i>RET</i> mutaciones (SNVs, MNVs, y deleciones)	P160045/S031 (09/21/2022)
Oncomine Dx Target Test (Life Technologies Corporation)	Cáncer de tiroides - Tejido	Retevmo (selpercatinib)	<i>RET</i> fusiones	P160045/S031 (09/21/2022)
Oncomine Dx Target Test (Life Technologies Corporation)	NSCLC - Tejido	Gavreto (pralsetinib)	<i>RET</i> fusiones	P160045/S019 (09/04/2020)
Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular Inc.)	NSCLC - Tejido	Xalkori (crizotinib)	<i>ALK</i> reordenamientos	P110012 (08/26/2011)
Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular Inc.)	NSCLC - Tejido	Alunbrig (brigatinib)	<i>ALK</i> reordenamientos	P110012/S020 (05/22/2020)
Ventana ALK (D5F3) CDx Assay (Ventana Medical Systems, Inc.)	NSCLC - Tejido	Xalkori (crizotinib)	<i>ALK</i> expresión proteica	P140025 (06/12/2015)
Ventana ALK (D5F3) CDx Assay (Ventana Medical Systems, Inc.)	NSCLC - Tejido	Zykadia (ceritinib)	<i>ALK</i> expresión proteica	P140025/S005 (05/26/2017)
Ventana ALK (D5F3) CDx Assay (Ventana Medical Systems, Inc.)	NSCLC - Tejido	Alecensa (alectinib)	<i>ALK</i> expresión proteica	P140025/S006 (11/06/2017)
Ventana ALK (D5F3) CDx Assay (Ventana Medical Systems, Inc.)	NSCLC - Tejido	Lorbrena (lorlatinib)	<i>ALK</i> expresión proteica	P140025/S014 (03/03/2021)

Anexo III. Estrategias de búsqueda

Base de datos Ovid MEDLINE(R) ALL <1946 to November 02, 2021>

1	(gene adj2 fusion?).ti,ab,kw.	14926
2	(protein adj2 fusion).ti,ab,kw.	39223
3	(ntrk adj3 (fusion? or rearrange* or fusion?-positive)).ti,ab,kw.	363
4	(RET adj3 (fusion? or rearrange* or fusion?-positive)).ti,ab,kw.	1465
5	(Anaplastic adj5 Lymphoma adj5 Receptor adj5 Tyrosine adj5 Kinase).ti,ab,kw.	282
6	(fusion? or rearrange* or fusion?-positive).ti,ab,kw.	314871
7	5 and 6	141
8	(ALK adj3 (fusion? or rearrange* or fusion?-positive)).ti,ab,kw.	3273
9	((ROS1 or ROS-1) adj3 (fusion? or rearrange* or fusion?-positive)).ti,ab,kw.	733
10	1 or 2 or 3 or 4 or 7 or 8 or 9	56869
11	Immunohistochemistry/	299115
12	High-Throughput Nucleotide Sequencing/	39237
13	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction/	153553
14	In Situ Hybridization, Fluorescence/	44155
15	11 or 12 or 13 or 14	506041
16	immunohistochemistry.ti,ab,kw.	205569
17	Immunohistocytochemistry.ti,ab,kw.	47
18	Immunocytochemistry.ti,ab,kw.	35817
19	(High adj4 Throughput adj4 Nucleotide adj4 Sequencing).ti,ab,kw.	65
20	(Next-Generation adj2 Sequencing).ti,ab,kw.	41716
21	(Next adj3 generation adj3 sequencing).ti,ab,kw.	42150
22	((DNA or RNA) adj4 sequencing).ti,ab,kw.	73378
23	(Massiv* adj3 Parallel adj3 Sequencing).ti,ab,kw.	3449
24	Pyrosequencing.ti,ab,kw.	10982
25	(Reverse adj5 Transcriptase adj5 Polymerase adj5 Chain adj5 Reaction).ti,ab,kw.	26008
26	(Reverse adj3 Transcriptase adj3 PCR).ti,ab,kw.	7650
27	RT-PCR.ti,ab,kw.	146837
28	(RT adj2 PCR).ti,ab,kw.	149564

Base de datos Ovid MEDLINE(R) ALL <1946 to November 02, 2021>

29	(Fluorescen* adj3 In-Situ adj3 Hybridization).ti,ab,kw.	36000
30	(Fluorescen* adj4 In adj4 Situ adj4 Hybridization).ti,ab,kw.	36053
31	FISH.ti,ab,kw.	180068
32	16 or 17 or 18 or 19 or 20 or 21 or 22 or 23 or 24 or 25 or 26 or 27 or 28 or 29 or 30 or 31	691062
33	15 or 32	1007458
34	((cancer or tumor?) adj3 screening).ti,ab,kw.	47828
35	algorithm.ti,ab,kw.	213085
36	diagnostic.ti,ab,kw.	781975
37	detect*.ti,ab,kw.	2529630
38	34 or 35 or 36 or 37	3334256
39	10 and 32 and 38	342
40	limit 39 to (humans and yr=>2015 -Current*)	180
41	entrectinib.ti,ab,kw.	201
42	larotrectinib.ti,ab,kw.	203
43	(TRK adj3 inhibitor?).ti,ab,kw.	503
44	41 or 42 or 43	701
45	10 and 44	271
46	limit 45 to (humans and yr=>2015 -Current*)	164

Base de datos EMBASE. Noviembre, 2021

N.º	Query	Results
#48	#11 AND #42 AND [humans]/lim AND [2015-2021]/py AND ([article]/lim OR [article in press]/lim OR [review]/lim)	208
#47	#11 AND #42 AND [humans]/lim AND [2015-2021]/py	436
#46	#11 AND #42	478
#45	#11 AND #34 AND #38 AND [humans]/lim AND [2015-2021]/py AND ([article]/lim OR [article in press]/lim OR [review]/lim)	492
#44	#11 AND #34 AND #38 AND [humans]/lim AND [2015-2021]/py	999
#43	#11 AND #34 AND #38	2357
#42	#39 OR #40 OR #41	1758
#41	(trk NEAR/3 inhibitor\$):ti,ab,kw	818

Base de datos EMBASE. Noviembre, 2021

N.º	Query	Results
#40	larotrectinib:ti,ab,kw	393
#39	entrectinib:ti,ab,kw	424
#38	#35 OR #36 OR #37	1228498
#37	diagnostic:ti,ab,kw	1156955
#36	(test* NEAR/3 algorithm):ti,ab,kw	7013
#35	((cancer OR tumor) NEAR/3 screen*):ti,ab,kw	72797
#34	#16 OR #33	1662029
#33	#17 OR #18 OR #19 OR #20 OR #21 OR #22 OR #23 OR #24 OR #25 OR #26 OR #27 OR #28 OR #29 OR #30 OR #31 OR #32	1084666
#32	fish:ti,ab,kw	231244
#31	(fluorescen* NEAR/4 in NEAR/4 situ NEAR/4 hybridization):ti,ab,kw	46060
#30	(fluorescen* NEAR/3 «in situ» NEAR/3 hybridization):ti,ab,kw	45969
#29	(rt NEAR/2 pcr):ti,ab,kw	216719
#28	«rt pcr»:ti,ab,kw	211862
#27	(reverse NEAR/3 transcriptase NEAR/3 pcr):ti,ab,kw	8852
#26	(reverse NEAR/5 transcriptase NEAR/5 polymerase NEAR/5 chain NEAR/5 reaction):ti,ab,kw	28981
#25	pyrosequencing:ti,ab,kw	16027
#24	(massiv* NEAR/3 parallel NEAR/3 sequenc*):ti,ab,kw	5900
#23	((dna OR rna) NEAR/3 sequenc*):ti,ab,kw	206323
#22	(next NEAR/3 generation NEAR/3 sequenc*):ti,ab,kw	74913
#21	(«next-generation» NEAR/2 sequenc*):ti,ab,kw	74287
#20	(high NEAR/4 throughput NEAR/4 nucleotide NEAR/4 sequencing):ti,ab,kw	387
#19	immunocytochemistry:ti,ab,kw	50596
#18	immunohistochemistry:ti,ab,kw	70
#17	immunohistochemistry:ti,ab,kw	326356
#16	#12 OR #13 OR #14 OR #15	1106596
#15	«fluorescence in situ hybridization»/exp	76791
#14	«reverse transcription polymerase chain reaction»/exp	307864
#13	«high throughput sequencing»/exp	118375
#12	«immunohistochemistry»/exp	686670

Base de datos EMBASE. Noviembre, 2021

N.º	Query	Results
#11	#1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #8 OR #9 OR #10	82477
#10	((ros1 OR «ros 1») NEAR/3 (fusion\$ OR rearrange* OR «fusion positive»):ti,ab,kw	1758
#9	(alk NEAR/3 (fusion\$ OR rearrange* OR «fusion positive»):ti,ab,kw	6659
#8	#6 AND #7	127
#7	fusion\$:ti,ab,kw OR rearrange*:ti,ab,kw OR «fusion positive»:ti,ab,kw	402040
#6	(anaplastic NEAR/5 lymphoma NEAR/5 receptor NEAR/5 tyrosin\$ NEAR/5 kinase\$):ti,ab,kw	413
#5	(ret NEAR/3 (fusion\$ OR rearrange* OR «fusion positive»):ti,ab,kw	2448
#4	(ntrk NEAR/3 (fusion\$ OR rearrange* OR «fusion positive»):ti,ab,kw	830
#3	(protein NEAR/2 fusion):ti,ab,kw	48572
#2	(gene NEAR/2 fusion):ti,ab,kw	17714
#1	«gene fusion»/exp	18526

Base de datos PubMed (Medline). Julio, 2022

Search	Query	Results
#1	Search: ((entrectinib[Title/Abstract] OR (larotrectinib[Title/Abstract])) OR («tumor agnostic»[Title/Abstract] OR «tumor agnostic therapy»[Title/Abstract] OR «tumor agnostic treatment»[Title/Abstract]) Filters: English, Spanish, Humans, from 2021 - 2022	271
#2	Search: (((NTRK[Title/Abstract] OR RET[Title/Abstract] OR «rearranged during transfection»[Title/Abstract] OR (ROS1[Title/Abstract] OR (ALK[Title/Abstract] OR «anaplastic lymphoma kinase»[Title/Abstract])) AND (fusion*[Title/Abstract] OR rearrang*[Title/Abstract])) AND ((IHC[Title/Abstract] OR immunohistochemi*[Title/Abstract] OR FISH[Title/Abstract] OR «fluorescence in situ hybridization»[Title/Abstract] OR RT-PCR[Title/Abstract] OR NGS[Title/Abstract] OR «next generation sequencing»[Title/Abstract])) Filters: Consensus Development Conference, Consensus Development Conference, NIH, Guideline, Meta-Analysis, Practice Guideline, Randomized Controlled Trial, Review, Systematic Review, Technical Report, English, Spanish, from 2021 - 2022	70

Anexo IV. Algoritmos diagnósticos para estudio de fusiones *NTRK*

En las siguientes figuras 8 a 11 se presentan los algoritmos diagnósticos para estudios de fusiones *NTRK* propuestos por Lim y cols (124).

Figura 8. Algoritmo propuesto para pacientes con NSCLC

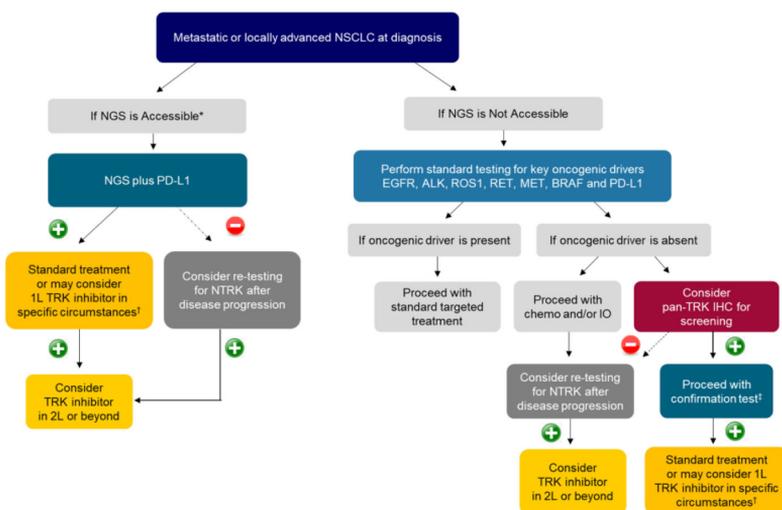


FIGURE 1 Recommended *NTRK* gene fusion testing algorithm for NSCLC. (+)/(-): Presence/absence of *NTRK* gene fusions. *Accessible: Testing platform is available and affordable. †In the 2021 NCCN Guidelines,⁴⁹ larotrectinib and entrectinib are recommended as first-line therapy when *NTRK* gene fusion is positive. ‡For confirmation test, NGS is preferred, but FISH or RT-PCR may be used if NGS is not accessible. Abbreviations: ALK, anaplastic lymphoma kinase; BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B; EGFR, epidermal growth factor receptor; IHC, immunohistochemistry; 1L/2L, first/second line; IO, immunotherapy; MET, MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase; NGS, next-generation sequencing; NSCLC, non-small cell lung cancer; *NTRK*, neurotrophic tyrosine receptor kinase; PD-L1, programmed death-ligand 1; RET, proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret; ROS1, ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase

Figura 9. Algoritmo propuesto para pacientes con CCR

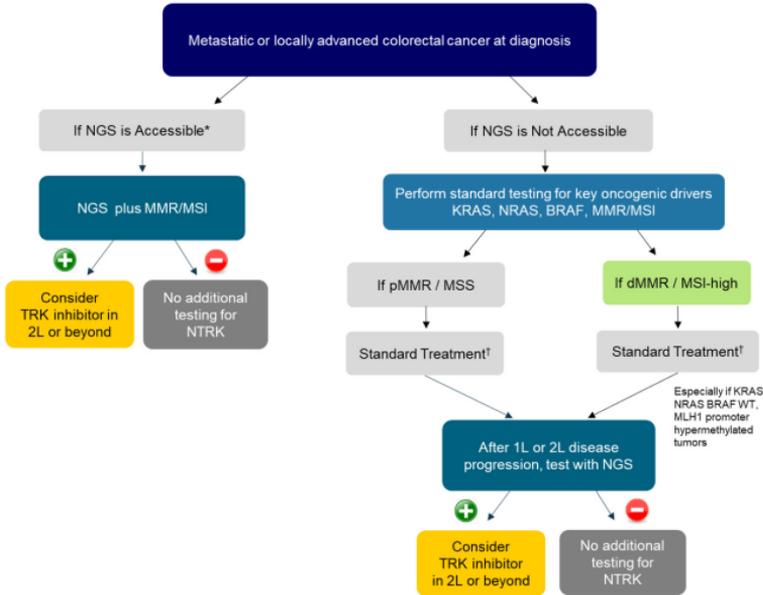


FIGURE 2 Recommended NTRK gene fusion testing algorithm for colorectal cancer. (+)/(-): Presence/absence of NTRK gene fusions. *Accessible: Testing platform is available and affordable. †Standard treatment: If pMMR/MSS, 1L/2L-chemotherapy and/or monoclonal antibody, 3L/4L: regorafenib or TAS-102; if dMMR/MSI-high: 1L-pembrolizumab or chemotherapy with or without monoclonal antibody, 2L/3L: chemotherapy and/or monoclonal antibody or pembrolizumab. Abbreviations: BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B; 1L/2L/3L/4L, first/second/third/fourth line; KRAS, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; MLH1, MutL Homolog 1; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stable; NGS, next-generation sequencing; NRAS, neuroblastoma RAS viral oncogene homolog; NTRK, neurotrophic tyrosine receptor kinase; p/d/MMR, proficient-/deficient-/mismatch repair; WT, wild type

Figura 10. Algoritmo propuesto para pacientes con sarcoma

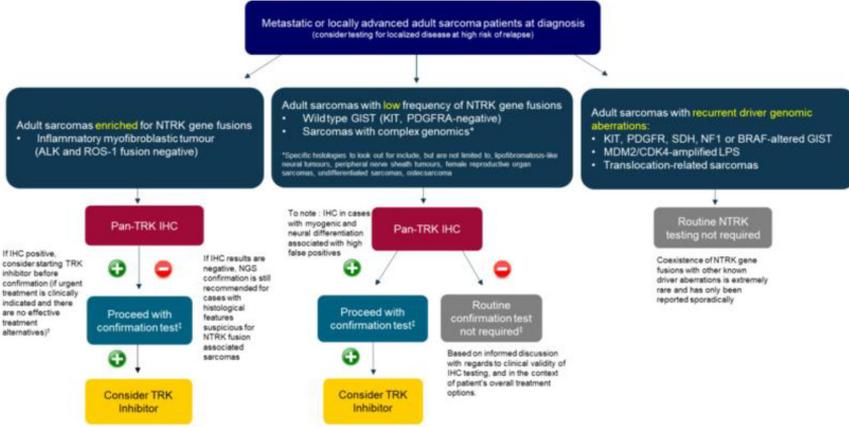


FIGURE 3 Recommended NTRK gene fusion testing algorithm for adult sarcomas, adapted from expert recommendations from the World Sarcoma Network.⁴⁴ (+)/(-). Presence/absence of NTRK gene fusions. †Please note that this is the opinion of the expert panel. Confirmation of NTRK gene fusions is required for TRK inhibitors. ‡For confirmation test, NGS is preferred, but FISH or RT-PCR may be used if NGS is not accessible. Abbreviations: ALK, anaplastic lymphoma kinase; BRAF, v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B; CDK4, cyclin-dependent kinase 4; GIST, gastrointestinal stromal tumor; IHC, immunohistochemistry; KIT, v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog; LPS, liposarcoma; MDM2, mouse double minute 2 homolog; NF1, neurofibromatosis type 1; NGS, next-generation sequencing; NTRK, neurotrophic tyrosine receptor kinase; PDGFRA, platelet-derived growth factor receptor alpha; ROS1, ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase; SDH, succinate dehydrogenase. *Specific histologies to look out for include, but are not limited to, lipofibromatosis-like neural tumours, peripheral nerve sheath tumours, female reproductive organ sarcomas, undifferentiated sarcomas, osteosarcoma

Figura 11. Algoritmo propuesto para pacientes pediátricos

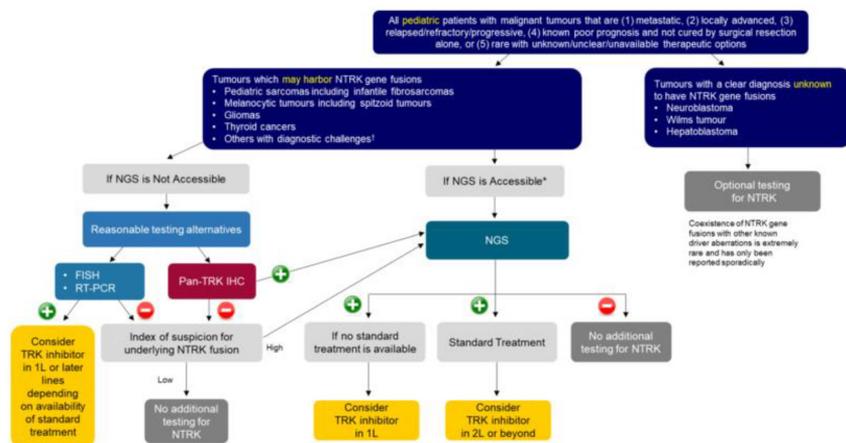


FIGURE 4 Recommended *NTRK* gene fusion testing algorithm for pediatric tumors. (+)/(-): Presence/absence of *NTRK* gene fusions. *Accessible: Testing platform is available and affordable. †Tumors that are challenging to diagnose on the basis of morphology and standard techniques alone. Note: The index of suspicion is high if there is a possibility that the tumor may harbor an *NTRK* gene fusion. The index of suspicion is low if the possibility that the tumor may harbor an *NTRK* gene fusion is low, for example, some other key oncogenic driver is identified. Abbreviations: FISH, fluorescence in situ hybridization; IHC, immunohistochemistry; 1L/2L, first/second line; NGS, next-generation sequencing; NTRK, neurotrophic tyrosine receptor kinase; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction

