

Caracterización y clasificación molecular del cáncer de pulmón

Susana Hernández, Esther Conde, Marta Alonso, Fernando López-Ríos

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid

Palabras clave:

Carcinoma de pulmón no de célula pequeña.
Biomarcadores.
Secuenciación masiva.

Keywords:

Non-small cell lung cancer. Biomarkers.
Next-generation sequencing.

Resumen

Es importante conocer la ventajas e inconvenientes de las distintas metodologías que nos permiten clasificar molecularmente a los pacientes con carcinomas de pulmón no de célula pequeña para poder diseñar estrategias de determinaciones de biomarcadores que sean a la vez eficientes y pragmáticas.

Esto es particularmente importante si tenemos en cuenta que algunas indicaciones de tratamiento necesitan la información de biomarcadores con un nivel de detalle que solo está al alcance de la secuenciación masiva dirigida.

Abstract

It is important to know the advantages and disadvantages of the different methodologies that allow us to molecularly classify patients with non-small cell lung carcinomas to design strategies for biomarker determinations that are both efficient and pragmatic.

This is particularly important considering that some treatment indications require biomarker information at a level of detail only available with next-generation sequencing (NGS).

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Susana Hernández y Esther Conde deben ser consideradas como primeros autores, ya que su contribución ha sido la misma.

Hernández S, Conde E, Alonso M, López-Ríos F. Caracterización y clasificación molecular del cáncer de pulmón. Rev Cáncer 2023;37(3):114-120

DOI: 10.20960/revcancer.00042

Correspondencia:

Fernando López-Ríos. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario 12 de Octubre. Av. de Córdoba, s/n. 28041 Madrid
e-mail: fernandolopezriosmoreno@gmail.com

CARACTERIZACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN

Desde la primera clasificación histológica de los tumores pulmonares llevada a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 1981, se han realizado considerables progresos en el conocimiento de la patogénesis, la histología y la biología molecular del carcinoma de pulmón (CP), lo que se ha ido traduciendo en sucesivas clasificaciones que incorporan los nuevos avances. La última actualización, publicada en el año 2021, aporta parámetros para una mayor precisión en el diagnóstico histológico no solo en piezas quirúrgicas sino también en biopsias pequeñas y muestras citológicas y, además, integra el diagnóstico molecular como una herramienta para el diagnóstico y el tratamiento (en concreto, para terapias dirigidas e inmunoterapia) en los pacientes con CP (1).

Los carcinomas de pulmón se clasifican en dos grandes grupos según su morfología, la cual está relacionada con una clínica y una biología molecular características que condicionan una diferente actitud terapéutica inicial. Dichos grupos son:

- Carcinomas de pulmón de célula pequeña (CPCP o SCLC del inglés *small cell lung carcinomas*). Representan aproximadamente un 15 % de los CP (1).
- Carcinomas de pulmón no de célula pequeña (CP-NCP) NSCLC, del inglés *non-small cell lung carcinomas*). Representan aproximadamente un 85 % de los CP. Dentro de este grupo se incluyen los dos principales tipos histológicos del CP: el adenocarcinoma (AC) y el carcinoma escamoso (CE), representando un 40 % y un 25 %, respectivamente (1).

Dado el cambio paradigmático que se ha experimentado en el conocimiento y manejo del CP, en especial en los CPNCP, se ha hecho necesaria una clasificación más

precisa de los tipos histológicos. Por este motivo, esta última actualización de la OMS recomienda la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) para subclasificar los CPNCP (AC *versus* CE) en aquellos casos en los que los criterios morfológicos (con técnica de hematoxilina-eosina, H&E) no sean suficientes (1,2). En este sentido, los marcadores IHQ más aceptados son: a) TTF1 como marcador de AC; y b) p40 como marcador escamoso (1,2). Si bien es necesario realizar un diagnóstico anatomopatológico lo más preciso posible, el patólogo tiene la obligación de preservar muestra tumoral suficiente para la determinación de biomarcadores predictivos de respuesta (3,4). Un aspecto primordial es la revisión exhaustiva de todo el material de cada paciente para la selección del más adecuado en términos de porcentaje de celularidad tumoral. Los requerimientos varían mucho en función de la metodología, lo que puede influir en el porcentaje de resultados no concluyentes para cada una de ellas (5).

CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA DE PULMÓN

El desarrollo en las últimas décadas de tratamientos dirigidos contra determinadas alteraciones moleculares de las neoplasias humanas ha supuesto un importante cambio, tanto práctico como conceptual, en oncología (6). El CP, y en especial, el CPNCP, es uno de los mejores paradigmas de esta filosofía por dos razones principales: a) su enorme complejidad y variabilidad molecular (al menos un 30-40 % de los CPNCP tienen una alteración genómica tratable (7); y b) la gran cantidad de fármacos dirigidos contra muchas de estas dianas terapéuticas, ya aprobados o en fase de desarrollo clínico (8). La figura 1 resume las frecuencias de las alteraciones moleculares en los pacientes con CPNCP. Por otra parte, la irrupción de la inmunoterapia

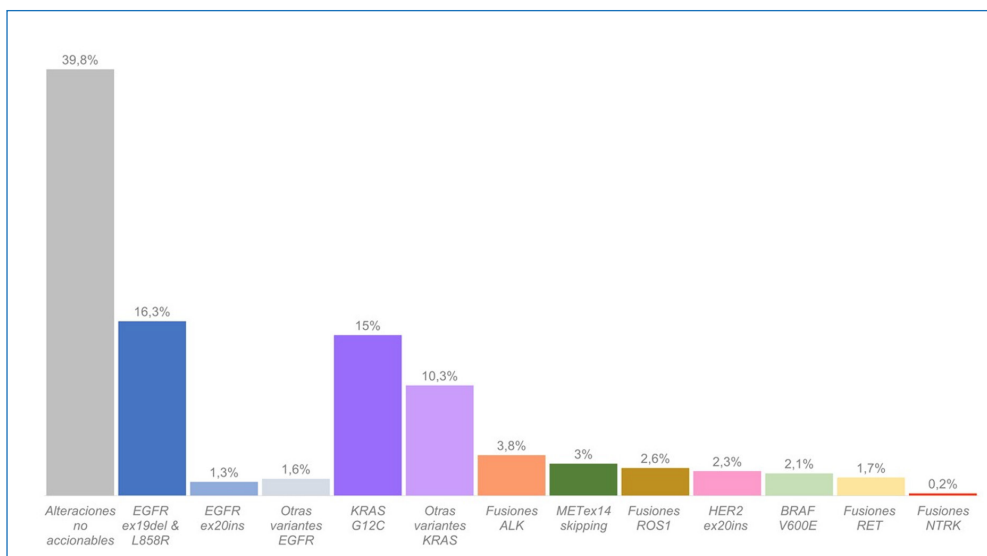


Fig. 1. Frecuencia de alteraciones moleculares en el CPNCP (adenocarcinoma) en población occidental. Datos obtenidos de Tan AC et al. (7) (Del: *delección*; *ex*: *exón*; *ins*: *inserción*).

ha supuesto una nueva revolución en el tratamiento oncológico dirigido de los tumores sólidos, incluido el CP. Una de las aproximaciones terapéuticas de la inmunoterapia más desarrolladas en el CP es la inhibición de los puntos de control del sistema inmune, usando anticuerpos monoclonales dirigidos frente a PD-1 (*programmed death-1*) o PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) (9). En los siguientes apartados desarrollaremos las ventajas e inconvenientes de las diferentes metodologías que se pueden utilizar para la clasificación molecular del CP para terminar ilustrando cómo organizar los flujos de trabajo y los algoritmos en los pacientes con CP.

Metodologías

Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) es una metodología que nos permite estudiar la sobreexpresión proteica en muestras tisulares o citológicas. Sus principales ventajas es que es una técnica de bajo coste y tiempo de respuesta, que necesita poca cantidad de tejido. Sus principales inconvenientes son dos: a) en ocasiones su especificidad no es del 100 % y todos los resultados positivos han de confirmarse con un método genómico; y b) su sensibilidad puede verse afectada por las condiciones preanalíticas. Las principales aplicaciones de la IHQ en los pacientes con CPNCP son:

- El estudio de PD-L1, como marcador predictor de respuesta a inmunoterapia (10,11).
- El estudio de la fusión de *ALK* (método definitivo) (12-17).
- El estudio de la fusión de *ROS1* (método de cribado) (17,18).
- El estudio de la fusión de los genes de la familia *NTRK* (método de cribado) (19-22).

Hibridación *in situ* fluorescente

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es el método de referencia para estudiar amplificaciones (por ejemplo, en el gen *MET*) y es también una opción excelente para identificar fusiones mediante la utilización de sondas de rotura o *break-apart* (*ALK*, *ROS1*, *RET* y *NTRK*). Sus principales ven-

tajas son similares a las de la IHQ. Sus principales desventajas son que su sensibilidad depende mucho del diseño de las sondas comerciales y que no aporta un conocimiento preciso de la composición o variante de fusión (16).

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real nos permite estudiar mutaciones (o variantes) y fusiones a partir del estudio del ADN y del ARN. Sus principales ventajas e inconvenientes se resumen en la tabla I (16).

Teniendo en cuenta las implicaciones terapéuticas de conocer con precisión la mutación de *KRAS* (por ejemplo, la variante *G12C*) o la mutación de *EGFR* (por ejemplo, las inserciones en el exón 20) que presentan nuestros pacientes (sensibilidad diagnóstica, véase más adelante), en ocasiones hay que combinar de forma secuencial o simultánea la PCR en tiempo real (identificación genérica de la presencia de una variante) y la secuenciación masiva dirigida (SMD; anotación precisa de la variante) (23,24).

Secuenciación masiva dirigida

La SMD se está convirtiendo en el método de referencia para estudiar mutaciones (o variantes) y fusiones. También puede detectar aumento o disminución en el número de copias de un gen, sobre todo de manera más precisa, con la optimización de los algoritmos bioinformáticos (25). Sus principales ventajas e inconvenientes se resumen en la tabla II.

En el momento actual hay dos tecnologías principales de SMD: la captura de híbridos y el uso de amplicones. Aunque cada una de las opciones tiene fervientes defensores y detractores y no es el objetivo de este capítulo esgrimir argumentos en favor de uno u otro, es importante resaltar algunas cuestiones (26):

- La captura de híbridos requiere más cantidad de ácidos nucleicos, pero en contrapartida suele ofrecer paneles con mayor número de genes.
- El estudio del ARN junto con el estudio del ADN es más sensible para la detección de fusiones que si solo analizamos el ADN.

Tabla I. Ventajas e inconvenientes de la PCR en tiempo real

Metodología	Ventajas	Inconvenientes
PCR en tiempo real	<ul style="list-style-type: none"> – Rápida – Barata – Requiere poco tejido – Muy sensible 	<ul style="list-style-type: none"> – La sensibilidad puede verse afectada por el diseño del producto comercial – No se especifica la pareja de fusión – No se especifica la mutación concreta, solo su presencia dentro de un gen

Tabla II. Ventajas e inconvenientes de la secuenciación masiva dirigida

Metodología	Ventajas	Inconvenientes
Secuenciación masiva dirigida	Muy sensible y específica	<ul style="list-style-type: none"> - La sensibilidad en la búsqueda de fusiones puede verse afectada si solo se utiliza ADN - Coste - Tiempo de respuesta - Algunos paneles requieren más cantidad de muestra (captura de híbridos)

- Hay que conocer con detalle la sensibilidad diagnóstica del panel que estamos usando (también definida como cobertura en anchura o capacidad del panel para detectar el mayor número de alteraciones moleculares).

Biopsia líquida

La definición global de biopsia líquida incluye las células tumorales circulantes (CTC), exosomas, DNA libre circulante (cfDNA, del inglés *cell free DNA*), RNA libre circulante (cfRNA, del inglés *cell free RNA*) y ARN plaquetario, aislados principalmente a partir de sangre periférica (plasma) pero también de orina, líquido pleural, líquido cerebroespinal y saliva, entre otros. Sobre estas biopsias líquidas se pueden utilizar sobre todo PCR en tiempo real y SMD, con profundidades de lectura mucho mayores en comparación a la SMD sobre tejido. Los resultados falsos negativos suelen ser debidos a una escasa representación de los ácidos nucleicos circulantes (limitada carga metastásica extratorácica del paciente). En contrapartida, los resultados falsos posi-

tivos pueden estar relacionados con el fenómeno de hematopoyesis clonal, pero también con el intento de aumentar la sensibilidad de la técnica (17,27-30).

Atributos de las metodologías

Además de conocer en detalle las ventajas e inconvenientes de las diferentes metodologías que podemos usar para estudiar biomarcadores predictivos en los pacientes con CPNCP, es importante familiarizarnos con una serie de atributos (17):

- La sensibilidad analítica.
- La sensibilidad diagnóstica.
- ¿Permite el método la anotación precisa de las variantes?
- ¿Permite el método conocer la frecuencia alélica de la alteración?
- ¿Cuál es la cantidad de ácidos nucleicos que se recomienda?
- ¿Cuál es el coste?
- ¿Cuál es el tiempo de respuesta?

En la tabla III se resumen los atributos de los métodos más utilizados para la detección de las mutaciones de *EGFR*.

Tabla III. Atributos de los métodos más utilizados para la detección de mutaciones *EGFR*

Técnica	Sensibilidad analítica	Sensibilidad diagnóstica	Anotación precisa de variantes	Información de frecuencia alélica	Cantidad necesaria de ADN	Coste	Tiempo de respuesta
PCR y secuenciación directa	La más baja	Excelente	Sí	No	Alta	La más barata	3-4 días
PCR y pirosecuenciación	Variable	Intermedia	Algunas veces	No	Alta	Bajo	3-4 días
PCR en tiempo real	Alta	Intermedia	Algunas veces	No	Baja	Bajo	Horas a 1-2 días
PCR digital	La más alta	Baja	Sí	No	La más Baja	Bajo	Horas a 1-2 días
SMD-amplicones	Variable (alta)	Variable (alta)	Sí	Sí	Baja	Intermedio	1-2 días a 10 días
SMD-captura de híbridos	Variable (alta)	Variable (alta)	Sí	Sí	Alta	Intermedio	15-20 días
Secuenciación completa del exoma	Variable	Excelente	Sí	Sí	Alta	Alto	Semanas
Secuenciación completa del genoma	Variable	Excelente	Sí	Sí	Alta	La más cara	Semanas

Algoritmos de biomarcadores predictivos en CPNPC

La figura 2 resume los dos principales algoritmos para el estudio de biomarcadores predictivos en los pacientes con CPNPC (10,11,17,19,24,31-40).

Debido a la menor sensibilidad diagnóstica de cualquier método que no sea la SMD (Tabla III) en el momento actual, recomendamos las dos acciones siguientes:

- Si se identifica una mutación, pero el método utilizado no permite anotarla con precisión: realizar SMD a continuación.

- Si los métodos utilizados inicialmente no identifican ninguna alteración en las principales dianas tratables de los CPNPC. Realizar SMD a continuación.

Flujo de trabajo de la SMD en los pacientes con CPNPC

Teniendo en cuenta que la mayoría de las guías internacionales recomiendan el uso prioritario de la SMD en los pacientes con CPNPC (3,4), hemos considerado que una buena manera de concluir este capítulo es mostrar como es el flujo de trabajo de la SMD (41) (Fig. 3).

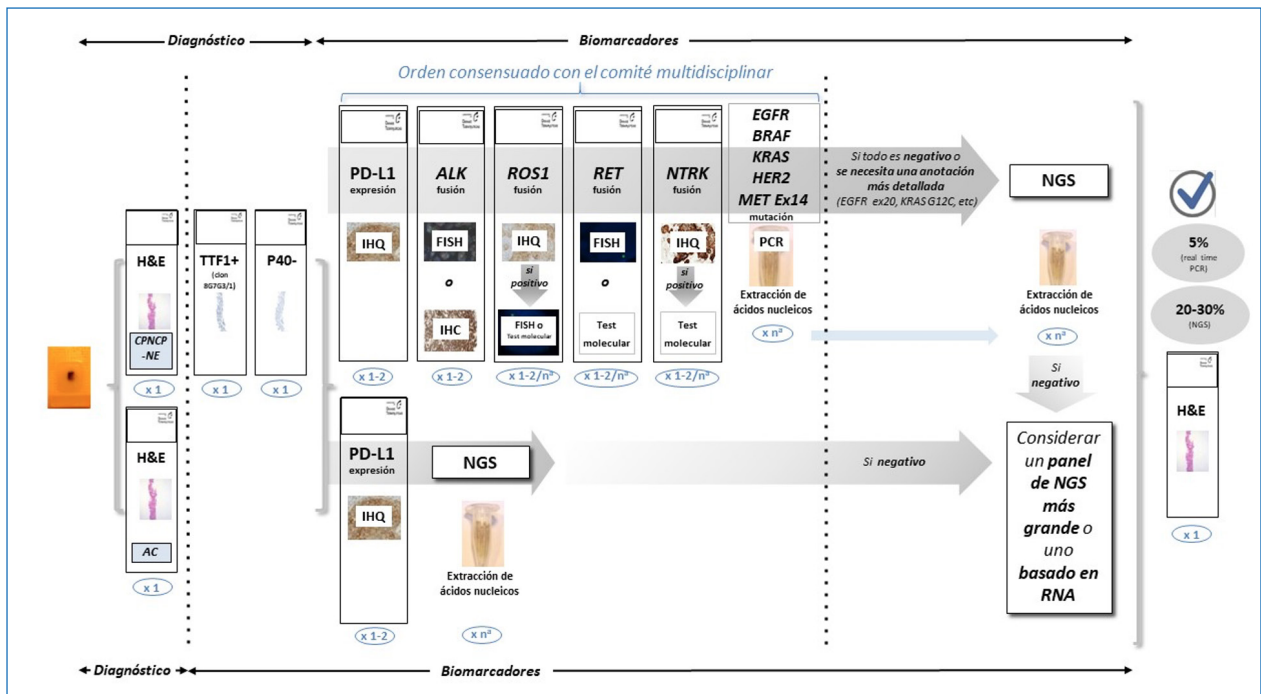


Fig. 2. Algoritmos para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNPC. El número de secciones de cada prueba se muestra en azul. Los requisitos para la extracción de ácidos nucleicos en pruebas moleculares individuales o paneles de secuenciación masiva (NGS, del inglés next-generation sequencing) son variables (ALK: anaplastic lymphoma kinase; BRAF: B-Raf proto-oncogene; EGFR: epidermal growth factor receptor; FISH: hibridación in situ fluorescente; HER2: human epidermal receptor 2; H&E: hematoxilina-eosina; IHQ: inmunohistoquímica; KRAS: kirsten rat sarcoma virus; MET: mesenchymal epithelial transition factor; NGS: next-generation sequencing; NTRK: neurotrophic tyrosine receptor kinase; PCR: polymerase chain reaction; PD-L1: programmed death ligand-1; RET: rearranged during transfection; ROS1: c-ros oncogene 1).

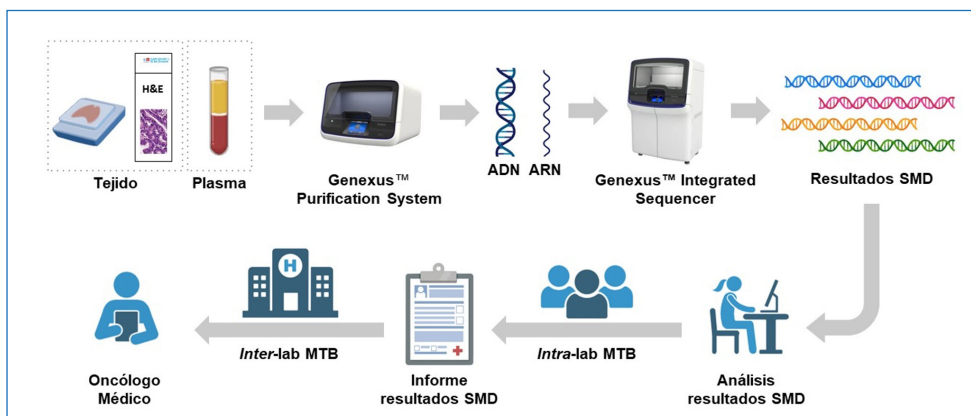


Fig. 3. Flujo de trabajo de la SMD (ADN: ácido desoxirribonucleico; ARN: ácido ribonucleico; MTB: molecular tumor board; SMD: secuenciación masiva dirigida). Figura creada parcialmente con recursos disponibles en BioRender.com.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO Classification of Tumours: Thoracic Tumours. 5th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2021.
2. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2019;14(3):377-407. DOI: 10.1016/j.jtho.2018.12.005
3. NCCN Guidelines 2023. Available from: <https://www.nccn.org/guidelines/guidelines-detail?category=1&id=1461>
4. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, et al. Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2023;34(4):339-57. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.12.009
5. Devereaux KA, Souers RJ, Graham RP, Portier BP, Surrey LF, Yemelyanova A, et al. Neoplastic Cellularity Assessment in Molecular Testing A Multi-institutional Practice Survey and Performance Challenge Identifies a Need for Standardization. *Arch Pathol Lab Med* 2022;146(9):1062-71. DOI: 10.5858/arpa.2021-0166-CP
6. Aggarwal C, Marmarelis ME, Hwang WT, Scholes DG, McWilliams TL, Singh AP, et al. Association Between Availability of Molecular Genotyping Results and Overall Survival in Patients With Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Precis Oncol* 2023;7:e2300191. DOI: 10.1200/PQ.23.00191
7. Tan AC, Tan DSW. Targeted Therapies for Lung Cancer Patients with Oncogenic Driver Molecular Alterations. *J Clin Oncol* 2022;40(6):611-25. DOI: 10.1200/JCO.21.01626
8. Mateo J, Steuten L, Aftimos P, André F, Davies M, Garralda E, et al. Delivering precision oncology to patients with cancer. *Nat Med* 2022;28(4):658-65. DOI: 10.1038/s41591-022-01717-2
9. Li M, Mok K, Mok T. Developments in targeted therapy & immunotherapy—how non-small cell lung cancer management will change in the next decade: a narrative review. *Ann Transl Med* 2023;11(10):358. DOI: 10.21037/atm-22-4444
10. Buttner R, Gosney JR, Skov BG, Adam J, Motoi N, Bloom KJ, et al. Programmed death-ligand 1 immunohistochemistry testing: A review of analytical assays and clinical implementation in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2017;35(34):3867-76. DOI: 10.1200/JCO.2017.74.7642
11. Lantuejoul S, Sound-Tsao M, Cooper WA, Girard N, Hirsch FR, Roden AC, et al. PD-L1 Testing for Lung Cancer in 2019: Perspective From the IASLC Pathology Committee. *J Thorac Oncol* 2020;15(4):499-519. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.12.107
12. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Muñoz L, Suárez-Gauthier A, Plaza C, et al. The ALK translocation in advanced non-small-cell lung carcinomas: Preapproval testing experience at a single cancer centre. *Histopathology* 2013;62(4):609-16. DOI: 10.1111/his.1203713
13. Conde E, Suárez-Gauthier A, Benito A, Garrido P, García-Campelo R, Biscuola M, et al. Accurate identification of ALK positive lung carcinoma patients: Novel FDA-cleared automated fluorescence in situ hybridization scanning system and ultrasensitive immunohistochemistry. *PLoS One* 2014;9(9):e107200.
14. Conde E, Taniere P, Lopez-Rios F. The anaplastic lymphoma kinase testing conundrum. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15(2):161-3. DOI: 10.1586/14737159.2015.997713
15. Conde E, Hernandez S, Prieto M, Martinez R, 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. DOI: 10.1586/14737159.2016.1172963
16. Hernandez S, Conde E, Alonso M, Illarramendi A, Bote de Cabo H, Zugazagoitia J, et al. A narrative review of methods for the identification of ALK fusions in patients with non-small cell lung carcinoma. *Transl Lung Cancer Res* 2023;12(7):1549-62. DOI: 10.21037/tlcr-22-855
17. Sholl LM, Cooper WA, Kerr KM, Tan DSW, Tsao MS, Yang J. IASLC Atlas of Molecular Testing for Targeted Therapy in Lung Cancer 2023. Available from: <https://www.iaslc.org/iaslc-atlas-molecular-testing-targeted-therapy-lung-cancer>
18. Conde E, Hernandez S, Martinez R, Angulo B, De Castro J, Col-lazo-Lorduy A, et al. Assessment of a New ROS1 Immunohistochemistry Clone (SP384) for the Identification of ROS1 Rearrangements in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma: the ROSING Study. *J Thorac Oncol* 2019;14(12):2120-32. DOI: 10.1016/j.jtho.2019.07.005
19. Marchiò C, Scaltriti M, Ladanyi M, lafrate AJ, Bibeau F, Dietel 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. DOI: 10.1093/annonc/mdz204
20. 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. DOI: 10.5858/arpa.2020-0400-RA
21. Hernandez S, Conde E, Molero A, Suarez-Gauthier A, Martinez R, Alonso M, et al. Efficient Identification of Patients With NTRK Fusions Using a Supervised Tumor-Agnostic Approach. *Arch Pathol Lab Med* 2023. DOI: 10.5858/arpa.2022-0443-OA
22. Conde E, Hernandez S, Alonso M, Lopez-Rios F. Pan-TRK Immunohistochemistry to Optimize the Detection of NTRK Fusions: Removing the Hay When Looking for the Needle. *Mod Pathol* 2023;36(12):100346. DOI: 10.1016/j.modpat.2023.100346
23. Rolfo C, Russo A. Exploiting the Full Potential of Novel Agents Targeting EGFR Exon 20 Insertions in Advanced NSCLC: Next-Generation Sequencing Outperforms Polymerase Chain Reaction-Based Testing. *J Thorac Oncol* 2023;18(6):674-7. DOI: 10.1016/j.jtho.2023.02.020
24. Lim TKH, Skoulidis F, Kerr KM, Ahn MJ, Kapp JR, Soares FA, et al. KRAS G12C in advanced NSCLC: Prevalence, co-mutations, and testing. *Lung Cancer* 2023;184:107293. DOI: 10.1016/j.lungcan.2023.107293
25. Solomon JP, Yang SR, Choudhury NJ, Ptashkin RN, Eslamdoost N, Falcon CJ, et al. Bioinformatically Expanded Next-Generation Sequencing Analysis Optimizes Identification of Therapeutically Relevant MET Copy Number Alterations in >50,000 Tumors. *Clin Cancer Res* 2022;28(21):4649-59. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-1321
26. Eyerer FIR, Bradshaw G, Vasalos P, Laser JS, Chang CC, Kim AS, et al. Getting Your Laboratory on Track With Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase. *Arch Pathol Lab Med* 2023;147(8):872-84. DOI: 10.5858/arpa.2022-0042-CP
27. Rolfo C, Mack P, Scagliotti G V, Aggarwal C, Arcila ME, Barlesi F, et al. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2021;16(10):1647-62. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.06.017
28. Krebs MG, Malapelle U, André F, Paz-Ares L, Schuler M, Thomas DM, et al. Practical Considerations for the Use of Circulating Tumor DNA in the Treatment of Patients with Cancer: A Narrative Review. *JAMA Oncol* 2022;8(12):1830-9. DOI: 10.1001/jamaoncol.2022.4457
29. Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* 2022;33(8):750-68. DOI: 10.1016/j.annonc.2022.05.520
30. Lockwood CM, Borsu L, Cankovic M, Earle JSL, Gocke CD, Hameed M, et al. Recommendations for Cell-free DNA Assay Validations: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn* 2023;S1525-1578(23)00219-2. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2023.09.004
31. Hofman P, Berezowska S, Kazdal D, Mograbi B, Ilić M, Stenzinger A, et al. Current challenges and practical aspects of molecular pathology for non-small cell lung cancers. *Virchows Arch.* 2023 Oct 6. DOI: 10.1007/s00428-023-03651-1
32. Tsao MIS, Hirsch FR, Yatabe Y. The IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer 2017. Available from: <https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/iaslc-atlas-alk-and-ros1-testing-lung-cancer>
33. Mok TS, Carbone DP, Hirsh FR. The IASLC Atlas of EGFR Testing in Lung Cancer 2017. Available from: <https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/iaslc-atlas-egfr-testing-lung-cancer-guidebook>

34. Hirsch FR. The IASLC Atlas of PD-L1 Immunohistochemistry (IHC) Testing in Lung Cancer 2017. Available from: <https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/iaslc-atlas-pd-l1-testing-lung-cancer>
35. 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. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.11.021
36. Yang SR, Aypar U, Rosen EY, Mata DA, Benayed R, Mullaney K, et al. A performance comparison of commonly used assays to detect RET fusions. *Clin Cancer Res* 2021;27(5):1316-28. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3208
37. Ren S, Wang J, Ying J, Mitsudomi T, Lee DH, Wang Z, et al. Consensus for HER2 alterations testing in non-small-cell lung cancer. *ESMO open* 2022;7(3):100482. DOI: 10.1016/j.esmoop.2022.100482
38. Mazieres J, Vioix H, Pfeiffer BM, Campden RI, Chen Z, Heeg B, et al. MET Exon 14 Skipping in NSCLC: A Systematic Literature Review of Epidemiology, Clinical Characteristics, and Outcomes. *Clin Lung Cancer* 2023;24(6):483-97. DOI: 10.1016/j.clcc.2023.06.008
39. Lim SM, Lee JB, Oya Y, Nutzinger J, Soo R. Path less Traveled: Targeting Rare Driver Oncogenes in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO Oncol Pr* 2023;OP2300273. DOI: 10.1200/OP.23.00273
40. Mino-Kenudson M, Schalper K, Cooper W, Dacic S, Hirsch FR, Jain D, et al. Predictive Biomarkers for Immunotherapy in Lung Cancer: Perspective From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol* 2022;17(12):1335-54. DOI: 10.1016/j.jtho.2022.09.109
41. Hernandez S, Conde E, Alonso M, Veras M, Illarramendi A, Curto D, et al. 35th European Congress of Pathology. *Virchows Arch* 2023;483(1):341 (Abstract E-PS-21-017). DOI: 10.1007/s00428-023-03602-w