



REVISIÓN

Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón no microcítico avanzado. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica

José Javier Gómez^{a,*}, Javier de Castro^b, Ángel Concha^c, Enriqueta Felip^d, Dolores Isla^e, Fernando López-Ríos^f, Luis Paz-Ares^g, José Ramírez^h, Julián Sanzⁱ y Pilar Garrido^j

^a Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Universidad de Cantabria, Santander, España

^b Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

^c Servicio de Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario Virgen de las Nieves, Granada, España

^d Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

^e Servicio de Oncología Médica, Hospital Clínico Lozano Blesa, Zaragoza, España

^f Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Madrid Norte-Sanchinarro, Madrid, España

^g Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Virgen Rocío, Sevilla, España

^h Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínic. IDIBAPS. Universidad de Barcelona, Barcelona, España

ⁱ Servicio de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, España

^j Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, España

Recibido el 10 de octubre de 2011; aceptado el 14 de noviembre de 2011

Disponible en Internet el 10 de enero de 2012

PALABRAS CLAVE

Cáncer de pulmón de célula no pequeña;
EGFR;
ALK;
KRAS;
HER-2;
BRAF;
Biomarcadores

Resumen Actualmente los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado portadores de mutaciones del receptor del cáncer de crecimiento epidérmico (EGFR), y probablemente en un futuro cercano los pacientes con reordenamientos del gen de la quinasa del linfoma anaplásico (ALK), pueden recibir un tratamiento específico basado en el resultado del análisis de biomarcadores. Esto les proporcionará mayor calidad de vida y supervivencia libre de progresión que la quimioterapia convencional.

Este documento de consenso nace como una iniciativa conjunta de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y propone recomendaciones diagnósticas y terapéuticas para el paciente con CPNM avanzado basadas en la evidencia científica relacionada con el uso de biomarcadores. Por tanto, supone una oportunidad para mejorar la eficiencia de la actividad asistencial y la utilización de recursos, lo que sin duda redundará en un beneficio para estos pacientes.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: apagrj@humv.es (J.J. Gómez).

Aunque este campo está en constante evolución, en la actualidad, con los datos disponibles, este grupo de expertos recomienda que en todos los pacientes con CPNM avanzado de células no escamosas, así como en pacientes no fumadores con independencia del subtipo histológico, se determine el estado mutacional del gen *EGFR* en un plazo máximo de 7 días a partir del diagnóstico anatomopatológico. Los laboratorios involucrados deben participar en programas de gestión de calidad externos. Por el contrario, los reordenamientos del gen *ALK* solo se deben analizar en el marco de un ensayo clínico, aunque con los datos tan prometedores que se han obtenido se justificará previsiblemente en un futuro próximo su estudio rutinario en pacientes sin mutaciones de *EGFR*. Por último, no se considera necesaria la determinación rutinaria de otras anomalías moleculares en la práctica clínica actual.

© 2011 SEAP y SEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Non-small cell lung cancer;
EGFR;
ALK;
KRAS;
HER-2;
BRAF;
Biomarkers

Guidelines for 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

Abstract Patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) carrying epidermal growth factor receptor (*EGFR*) mutations can now have specific treatment based on the result of biomarker analysis. Furthermore, this will probably soon be available for patients with rearrangements of the anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene. More than conventional chemotherapy, such treatment provides a better quality of life and progression-free survival.

This consensus document is a joint initiative of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). It makes diagnostic and treatment recommendations for advanced NSCLC patients based on scientific evidence of biomarker use. Thus it aims to improve both the efficiency of healthcare and the use of resources, undoubtedly to the patients' benefit.

Although this field of research is constantly evolving, with data available at the present time, this panel of experts recommends that all patients with advanced NSCLC of non-squamous cell subtype, or non-smokers regardless of the histological subtype, should be tested for *EGFR* gene mutations within a maximum of 7 days subsequent to the histopathological confirmation of the diagnosis. Participating laboratories must comply with external quality controls. However, at present, *ALK* gene rearrangements should only be tested in the context of a clinical trial, although the promising results obtained to date would suggest that its routine testing in patients with no *EGFR* mutations will be justified in the near future. Lastly, routine testing for other molecular abnormalities is not considered necessary in current clinical practice.

© 2011 SEAP y SEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El cáncer de pulmón supone un reto sanitario de gran envergadura. De los más de 11 millones de casos nuevos al año de cáncer a nivel mundial, uno de cada ocho es un cáncer de pulmón, y en el mundo cada año fallecen más de 1.100.000 personas debido a este tumor. En España se estima que en 2012 habrá 24.500 casos incidentes de cáncer de pulmón, siendo esta la primera causa de muerte por cáncer en varones (19.681 casos) y la tercera en mujeres (4.011 casos). Datos similares se observan cuando se analizan cifras europeas, norteamericanas o incluso mundiales¹.

En los últimos años se han producido múltiples cambios en el abordaje del cáncer de pulmón, y en particular en el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), entre los que destaca el reconocimiento de biomarcadores que permiten seleccionar el tratamiento en algunos subgrupos de pacientes con enfermedad avanzada. La decisión de qué biomarcadores y en qué subgrupo de pacientes deben ser analizados es clave, y además debe hacerse en un tiempo adecuado, ya que el primer tratamiento que recibe un paciente con cáncer es el que le proporciona más posibilidades. Además, el estudio

de biomarcadores debe realizarse en un entorno asistencial que garantice los controles de calidad adecuados y la disponibilidad de los resultados en el tiempo recomendado.

No cabe duda de que la complejidad del abordaje del cáncer requiere, cada vez más, una estrecha colaboración entre distintos profesionales, y que el éxito de la implantación de estrategias terapéuticas individualizadas basadas en el uso de biomarcadores en el entorno asistencial necesita coordinación entre patólogos y oncólogos.

El primer biomarcador y, por ello, la base sobre la que debe ser construida esta relación es el diagnóstico anatomopatológico. Conscientes de ello, este documento de consenso nace como una iniciativa conjunta de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Ha sido elaborado por 10 expertos (5 patólogos con actividad asistencial y 5 oncólogos médicos) y tiene como objetivo proponer recomendaciones diagnósticas y terapéuticas basadas en la evidencia científica para pacientes con CPNM avanzado.

La intención de este documento es que sirva de marco para que el Comité de Tumores de cada centro, de acuerdo con la Dirección, establezca los circuitos apropiados que

garanticen que los pacientes con CPNM avanzado subsidiarios de estudio de biomarcadores cuenten con esta posibilidad y que las determinaciones se lleven a cabo siguiendo las recomendaciones de las sociedades científicas, con procedimientos de calidad contrastada y en un tiempo clínicamente razonable.

Este documento promueve la estandarización y la calidad de la práctica clínica, potenciando una menor variabilidad clínica por causas organizativas. Por ello, es una gran oportunidad para mejorar la eficiencia de la actividad asistencial y optimizar el uso de los recursos disponibles, lo que sin duda redundará en un claro beneficio para los pacientes.

Aspectos clínicos

A pesar de los avances realizados, actualmente solo se han podido identificar alteraciones moleculares en aproximadamente el 50% de los adenocarcinomas². Aunque la mutación de *KRAS* es la más frecuente, merecen mención especial las mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y los reordenamientos de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) por su trascendencia clínica.

Importancia clínica de la mutación de *EGFR*

EGFR es una glucoproteína transmembrana compuesta por un dominio extracelular aminoterminal para la unión de ligandos, una hélice transmembrana hidrófoba, un dominio citoplasmático que contiene el dominio tirosina quinasa y una región carboxiterminal que contiene residuos de tirosina y elementos reguladores del receptor. La unión de los ligandos al dominio extracelular da lugar a la oligomerización del receptor, que activa la porción tirosina quinasa de la molécula y origina la autofosforilación de ambos dominios del receptor.

Aunque existen distintas alteraciones relacionadas con *EGFR*, como la amplificación génica y la sobreexpresión proteica, solo la presencia de mutaciones del gen se considera hoy en día un factor predictivo de eficacia al tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa (ITK) de *EGFR* (ITK-*EGFR*). Estas mutaciones se identificaron por primera vez en pacientes con CPNM en el año 2004 y su descubrimiento representó el reconocimiento de un subgrupo molecular de carcinomas clínicamente diferentes^{3,4}. La mutación da lugar a un incremento de la actividad del factor de crecimiento y conlleva cambios conformacionales que convierten a la célula mutada en «adicta» a las señales de *EGFR*, por lo que, al administrar un ITK-*EGFR*, la activación se interrumpe y desencadena la muerte celular. La presencia de mutaciones de *EGFR* en nuestro medio se identifica en el 5 al 15% de los casos de CPNM⁵.

Las mutaciones más frecuentes (85-90%) son las deleciones de los nucleótidos 9, 12, 15, 18 o 24 en el exón 19 y las mutaciones puntuales CTG/CGG en el exón 21 (L858R). Existen otras menos comunes (L861Q en el exón 21, G719A/C/S en el exón 18 y S768I en el exón 20) cuyo comportamiento es diferente. Además, se han descrito comportamientos asociados a la resistencia frente a T790M en el exón 20.

La importancia del tratamiento con ITK-*EGFR* en pacientes con tumores portadores de mutaciones activadoras proviene de múltiples estudios, si bien han sido los resultados

de los ensayos fase III con gefitinib o erlotinib los que han demostrado su beneficio con respecto al tratamiento estándar con quimioterapia (tabla 1). Además de los dos ITK-*EGFR* ya comentados, existen otros cuyo papel final en la clínica dependerá de los resultados de los estudios que están en marcha.

Estudio IPASS

En el estudio IPASS se incluyeron 1.217 pacientes con CPNM avanzado seleccionados por criterios clínicos a los que se aleatorizó a recibir tratamiento con gefitinib o carboplatino y paclitaxel⁶. El estudio demostró la no inferioridad de gefitinib, con unas medianas de supervivencia libre de progresión (SLP) de 5,7 meses para gefitinib y de 5,8 para la rama con quimioterapia. El análisis de eficacia realizado de forma retrospectiva sobre 437 pacientes (36%) que tenían muestra disponible para la determinación de la mutación de *EGFR* y que resultó positiva en 261 casos, demostró la superioridad de gefitinib en términos de SLP (HR=0,48; $p < 0,0001$) y de tasa de respuestas (71,2% vs. 47,3%; $p = 0,0001$). La interacción entre la mutación de *EGFR* y el tratamiento fue significativa (prueba de interacción, $p < 0,001$). Por el contrario, en pacientes con carcinomas carentes de mutación la quimioterapia fue significativamente más eficaz. En cambio, la tolerancia y la calidad de vida fueron mejores en la rama tratada con gefitinib.

Estudio First-SIGNAL

En este estudio se reclutaron 309 pacientes coreanos con adenocarcinoma de pulmón avanzado y no fumadores⁷. El objetivo principal, que era demostrar un incremento del 40% en la supervivencia global (SG) al comparar gefitinib con cisplatino y gemcitabina, no se alcanzó (HR = 1,02; $p = 0,42$). Sí se observaron diferencias estadísticamente significativas en términos de SLP, calidad de vida y tolerancia a favor de gefitinib. En el análisis por subgrupos, que se realizó en el 31% de los pacientes incluidos, se evidenciaron mutaciones de *EGFR* en el 44% de ellos. En este subgrupo, los pacientes tratados con gefitinib alcanzaron una SLP superior (HR = 0,61; $p = 0,084$).

Estudio WJTOG3405

En este estudio japonés se comparó gefitinib con cisplatino y docetaxel en 177 pacientes con CPNM avanzado portadores de mutaciones de *EGFR*⁸. Los resultados mostraron una diferencia significativa en la SLP, que era el objetivo primario del estudio, a favor de gefitinib (medianas de 9,2 vs. 6,3 meses; HR = 0,48; $p < 0,0001$), en la tasa de respuesta y en el perfil de toxicidad.

Estudio NEJ002

Este estudio japonés pretendía demostrar, en 230 pacientes con CPNM avanzado con mutaciones de *EGFR*, la superioridad de gefitinib frente a carboplatino y paclitaxel en términos de SLP⁹. En el análisis intermedio previsto inicialmente se detectó una diferencia significativa a favor de gefitinib (medianas, 10,8 vs. 5,4 meses; HR = 0,30; $p < 0,001$) y también en la tasa de respuesta, por lo que se cerró el estudio. La tolerancia al tratamiento fue mejor de nuevo para gefitinib.

Tabla 1 Estudios aleatorizados, fase III, que comparan gefitinib o erlotinib con quimioterapia como primera línea de tratamiento en pacientes con CPNM avanzado con mutación de EGFR

Estudio	N.º de pacientes	Selección de pacientes	ITK-EGFR	QT	Tasa de respuesta (%)		SLP HR, p
					ITK	QT	
IPASS ⁶	1.217 (261 con EGFR ^a)	Clínica	Gefitinib	Carboplatino/paclitaxel	71,2 ^a	47,3 ^a	HR = 0,48 ^a p = 0,000 ^a
First-SIGNAL ⁷	309 (42 con EGFR ^a)	Clínica	Gefitinib	Cisplatino/gemcitabina	84,6 ^a	37,5 ^a	HR = 0,61 ^a p = 0,084 ^a
WJTOG3405 ⁸	177	Mutación de EGFR	Gefitinib	Cisplatino/docetaxel	62,1	32,2	HR = 0,48 p = 0,0001
NEJ002 ⁹	230	Mutación de EGFR	Gefitinib	Carboplatino/paclitaxel	73,7	30,7	HR = 0,30 p = 0,001
OPTIMAL ¹⁰	165	Mutación de EGFR	Erlotinib	Carboplatino/gemcitabina	83	36	HR = 0,16 p = 0,0001
EURTAC ¹¹	174	Mutación de EGFR	Erlotinib	Dobletes de platino	54,5	10,5	HR = 0,42 p = 0,0001

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HR: hazard ratio; ITK: inhibidor de la tirosina quinasa; QT: quimioterapia; SLP: supervivencia libre de progresión.

^a En pacientes con mutación de EGFR.

Estudio OPTIMAL (CTONG 0802)

Este estudio, realizado en China, comparó el tratamiento en primera línea de erlotinib con carboplatino y gemcitabina en 165 pacientes con CPNM avanzado portadores de mutaciones de EGFR¹⁰. En él se observó una diferencia estadísticamente significativa en la SLP a favor de erlotinib (medianas, 13,1 vs. 4,6 meses; HR = 0,16; p < 0,0001), que era el objetivo primario, así como una mejor tasa de respuesta y un perfil de toxicidad más favorable.

Estudio EURTAC

Este estudio, coordinado por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GCEP) y el único realizado en población caucásica, comparó erlotinib con quimioterapia basada en platino en 174 pacientes con CPNM avanzado con mutación de EGFR¹¹. El estudio fue favorable a erlotinib en su objetivo primario, SLP (medianas, 9,4 vs. 5,2 meses; HR = 0,42, p < 0,0001), además de en la tasa de respuesta y la tolerabilidad.

Por tanto, estos estudios sustentan el uso de ITK-EGFR como tratamiento de elección en pacientes con CPNM avanzado portadores de una mutación activadora de EGFR, y como tal se recoge en las guías terapéuticas nacionales e internacionales¹²⁻¹⁴. Es importante destacar que en ninguno de los estudios comentados se ha demostrado un beneficio estadísticamente significativo en SG. Este hecho puede ser explicado por el elevado número de pacientes que reciben tratamiento con ITK-EGFR tras progresión con quimioterapia.

Importancia clínica de la translocación de EML4-ALK

ALK es una proteína transmembrana de 1.620 aminoácidos que está formada por un dominio extracelular con un péptido señal aminoterminal, un dominio intracelular con un segmento yuxtamembranoso que acoge el lugar de unión para el substrato-1 del receptor de insulina y un dominio carboxiterminal. ALK es un receptor tirosina quinasa de la insulina, y su función fisiológica sigue siendo poco clara. Este receptor fue identificado por primera vez como parte de la traslocación t(2;5) asociada a la mayoría de los linfomas anaplásicos y algunos otros linfomas no hodgkinianos¹⁵. Se ha puesto de manifiesto recientemente que varios tumores humanos, como el CPNM, activan la señalización de ALK mediante la creación de fusiones del gen ALK con diferentes parejas¹⁶, dando lugar a proteínas que activan el dominio quinasa de ALK^{17,18}.

EML4 es una proteína citoplasmática involucrada en la formación de microtúbulos. EML4-ALK es una fusión de genes que surge de la inversión del brazo corto del cromosoma 2 [Inv (2)(p21p23)] que une los exones 1-13 de EML4 a los exones 20-29 de ALK¹⁸.

En CPNM se han identificado múltiples variantes de EML4-ALK, así como otros tipos menos frecuentes de fusiones de ALK con otras parejas, como por ejemplo TFG-11 y KIF5B¹⁹. De forma equivalente a las mutaciones de EGFR, los reordenamientos de ALK originan actividades de EGFR, la quinasa constante, la dependencia de las vías de la cascada mitogénica activada, y una elevada sensibilidad a la inhibición de ALK, constituyendo otro ejemplo de «adición oncogénica»¹⁹.

Las alteraciones moleculares de *ALK* se pueden identificar por hibridación *in situ* fluorescente (FISH), por inmunohistoquímica (IHQ) y por transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Actualmente, FISH es el procedimiento diagnóstico de referencia a nivel clínico. La presencia de la fusión *EML4-ALK* se identifica en el 2 al 7% de los casos de adenocarcinoma².

En general, los pacientes con CPNM avanzado que tienen una translocación de *ALK* tienden a ser jóvenes con escasa o nula historia de tabaquismo (<10 paquetes de cigarrillos al año)^{20,21}. La mayoría de los casos son adenocarcinomas con producción de mucina, fundamentalmente intracelular. La presencia de reordenamientos de *ALK* no suele coexistir con otras mutaciones como las de *EGFR* y *KRAS*.

En la actualidad, existen diferentes inhibidores de *ALK* en estudio. Crizotinib, que es también un inhibidor del factor de transición epitelio-mesenquimal (MET), es el que se encuentra en una fase de desarrollo clínico más avanzada²⁰. Se administra de forma oral, a dosis de 250 mg, dos veces al día. Su perfil de toxicidad incluye náuseas y diarrea leves, trastornos visuales transitorios sin hallazgos oftalmológicos, así como alteraciones en la bioquímica hepática y hematológica.

Los datos iniciales de eficacia de crizotinib provienen de una serie de 82 pacientes con reordenamientos de *ALK*, la mayoría previamente tratados, seleccionados a partir de una cohorte de 1.500 pacientes con CPNM avanzado²². Con una duración media de tratamiento de 6,4 meses, la tasa de respuesta global fue del 57%, mientras que el 33% de los pacientes mostró enfermedad estable. En el momento del análisis, 63 pacientes (77%) continuaban recibiendo crizotinib, y la SLP estimada a los 6 meses era del 72%.

Estos hallazgos han dado lugar a la puesta en marcha de ensayos clínicos fase III que comparan crizotinib con quimioterapia en distintas líneas de tratamiento del CPNM avanzado y cuya fase de reclutamiento se espera que finalice el año 2012.

Importancia clínica de otros biomarcadores

Además de los biomarcadores antes descritos, hay otros en investigación cuyo papel biológico está aún por definir². A excepción de las mutaciones de *KRAS*, la incidencia del resto de alteraciones moleculares caracterizadas es inferior al 5% y casi todas suelen ser mutuamente excluyentes.

Activación de RAS

La activación de la vía mediada por RAS, especialmente a través de *KRAS*, ocurre en el 30% de los adenocarcinomas y en el 5% de los carcinomas de células escamosas²³ (fig. 1). Las mutaciones de *KRAS* en CPNM ocurren en los codones 12 y 13 y están asociadas al hábito tabáquico. Aunque numerosos estudios atribuyen un valor pronóstico negativo a la presencia de estas mutaciones, no existe aún evidencia científica concluyente. Hasta el momento, la búsqueda de inhibidores específicos eficaces ha resultado infructuosa. Por ello, aunque la detección de mutaciones de *KRAS* puede excluir razonablemente la existencia de mutaciones de *EGFR* o de *ALK*, su determinación no es prioritaria desde el punto de vista clínico.

Amplificación de MET

MET es el gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento hepatocitario (HGFR) situado en el cromosoma 7q21-q31 (fig. 1). Si bien las mutaciones de *MET* son raras, la amplificación se ha descrito en un porcentaje variable de pacientes con CPNM avanzado (1,4-21%) en función del método de detección que se utilice²⁴. A diferencia de las alteraciones descritas con anterioridad, ésta se ha identificado tanto en adenocarcinomas como en carcinomas de células escamosas y es independiente de la presencia de mutaciones de *KRAS* o *EGFR*. De hecho, el 20% de los pacientes con tumores *EGFR* mutados adquieren la resistencia a los ITK-*EGFR* a través de la amplificación de *MET*.

En la actualidad existen diferentes inhibidores de *MET* en fase avanzada de investigación clínica, tanto anticuerpos monoclonales como ITK, por lo que se espera disponer de ellos en un futuro cercano²⁵.

Mutación de HER-2

El receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2), también conocido como c-erbB-2, está sobreexpresado en el 20% de los pacientes con CPNM avanzado, mientras que la amplificación o la mutación del gen solo ocurren en el 2% de los casos, respectivamente²⁶. Esta mutación aparece sobre todo en mujeres, en pacientes no fumadores, en adenocarcinomas y en la población asiática. Suelen consistir en inserciones en el exón 20 y no están presentes en tumores con mutaciones de *EGFR* o de *KRAS*.

Con la información actualmente disponible, se cree que las inserciones que ocurren en este tipo de mutaciones provocan una activación constitutiva del receptor que confiere mayor sensibilidad a ITK duales frente a *EGFR* y *HER-2*, como lapatinib o BIBW 2292^{27,28}, pero no a inhibidores exclusivos de *EGFR*²⁹.

Mutación de BRAF

En pacientes con CPNM avanzado, la incidencia de mutaciones de *BRAF* se sitúa entre el 1 y el 3%, y no se localizan en la misma posición que la mutación clásica del melanoma (fig. 1).

A diferencia de *EGFR* y *ALK*, las mutaciones de *BRAF* aparecen en pacientes fumadores o ex fumadores ($p < 0,001$)³⁰. En la actualidad se están desarrollando inhibidores específicos, como PLX4032, que han demostrado su eficacia en melanomas portadores de esta mutación.

Mutación de PI3KCA

Las mutaciones del gen *PI3KCA* que codifica las enzimas fosfatidilinositol 3-quinasa catalítica alfa son muy poco frecuentes en CPNM³¹ (fig. 1). Se localizan en el exón 9, pueden detectarse tanto en adenocarcinomas de células escamosas como en los adenocarcinomas, e incluso pueden estar presentes en tumores *EGFR* mutados³². Por otra parte, la amplificación de *PI3KCA* también se ha visto en CPNM avanzado, sobre todo en carcinomas de células escamosas, en varones y en pacientes fumadores, aunque no necesariamente se encuentra asociada a la presencia de mutaciones³³.

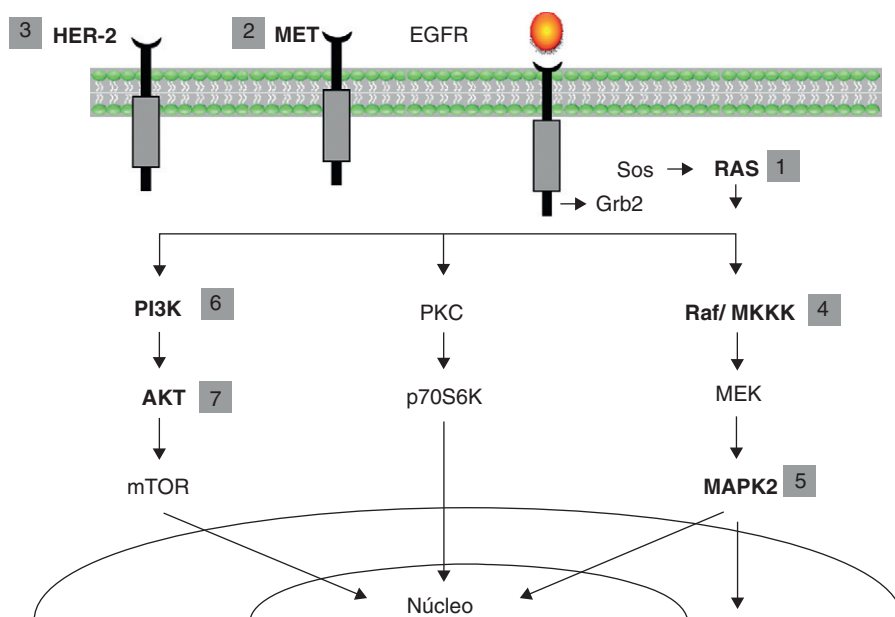


Figura 1 Principales alteraciones moleculares en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER-2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano; mTOR: molécula diana de la rapamicina en mamíferos.

¿Qué pacientes requieren un estudio de biomarcadores?

Mutación de EGFR

En la actualidad *debe* considerarse la determinación de las mutaciones de *EGFR* durante el diagnóstico de la enfermedad en un grupo de pacientes con CPNM avanzado. Los factores más importantes que nos ayudarán a identificar a los pacientes con mayores probabilidades de tener una mutación de *EGFR* son el hábito tabáquico y el subtipo histológico.

En el estudio IPASS⁶, el 96% de los pacientes tenían adenocarcinoma, el 3% carcinoma bronquioloalveolar según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2004³⁴, y solo en el 0,2% de los pacientes no se conocía el subtipo histológico. Otro criterio de inclusión era el hábito tabáquico, aceptando solo pacientes no fumadores (definido como los que han tenido menos de 100 cigarrillos en toda su vida) o pacientes «ex fumadores ligeros» (definido como los que habían dejado de fumar al menos 15 años antes y/o que fumaban igual o menos de 10 paquetes/año). El 93% de los pacientes incluidos en el estudio eran no fumadores y el 6% eran «ex fumadores ligeros». Con estas características clínicas, la frecuencia de mutaciones en el estudio fue del 59,7%.

Aunque no existen guías publicadas en las que se recomienda de forma taxativa en qué grupo de pacientes se debe realizar la determinación de la mutación de *EGFR*, en este trabajo medio la información más importante al respecto es la publicada por Rosell et al.⁵ en 2009 con los datos del GECP. En dicho estudio se analizó la mutación de *EGFR* en 2.105 pacientes y se encontró que estaba presente en 350 (16,6%). Cuando se analizó la frecuencia de mutaciones de *EGFR* en función de las características de los pacientes, se observó que era del 30% en mujeres, del 8,2% en hombres, del 38%

en pacientes no fumadores, del 9,5% en pacientes ex fumadores, del 5,8% en fumadores, del 17% en adenocarcinomas, del 23% en adenocarcinomas de tipo bronquioloalveolar y del 11,5% en adenocarcinomas de tipo células grandes. No se observaron mutaciones en ninguno de los 37 pacientes para los que no existían datos acerca del subtipo histológico.

Así pues, con la información disponible en la actualidad, se recomienda analizar la mutación de *EGFR* en los siguientes pacientes con CPNM avanzado: a) todos aquellos con diagnóstico de carcinoma no-escamoso, y b) todos aquellos no fumadores, independientemente del subtipo histológico.

Translocación de EML4-ALK

El oncogén de fusión *EML4-ALK* está presente entre el 2 y el 7% de los CPNM^{35,36}, pero su frecuencia aumenta en pacientes no fumadores, o en los que tienen una historia de hábito tabáquico ligero, y en pacientes con adenocarcinoma. Así, las frecuencias características y en pacientes no mutado, la frecuencia de esta translocación se incrementa hasta el 33%²¹.

En el estudio de Kwak et al.²² sobre 82 pacientes con translocación de *ALK* tratados con crizotinib, el 96% tenían adenocarcinoma, el 1% carcinoma de células escamosas y el 2% tenían otros tipos de histología. El 76% de los pacientes eran no fumadores, el 18% fumaba menos de 10 paquetes/año y el 6% más de 10 paquetes/año.

Actualmente se recomienda la determinación de reordenamientos de *ALK* solo en los que se conocen son muy prometedores. Sin embargo, los datos que se conocen son muy prometedores y llevarán casi con toda seguridad en un futuro inmediato a la determinación rutinaria de *ALK* en algunos pacientes con CPNM avanzado. En principio, este subgrupo debería incluir aquellos casos en los que se ha analizado la mutación de *EGFR*, según los criterios que se han comentado en el punto anterior, y el resultado ha sido negativo.

Otras alteraciones moleculares

Dado que en la práctica clínica actual el resultado de otras alteraciones moleculares no condiciona el tratamiento de los pacientes, no se considera necesaria su determinación de forma rutinaria.

Aspectos anatomopatológicos

Servicios de Anatomía Patológica y centros de referencia

Los Servicios de Anatomía Patológica han de trabajar en coordinación con el resto de servicios involucrados en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con CPNM. Dada la relativa complejidad de los procedimientos y la participación de distintos profesionales, es necesario establecer un flujo de trabajo en cada centro que permita la optimización de los recursos para disponer de un diagnóstico integrado en un tiempo adecuado. En el caso de estudios en los que existe una base morfológica, como en IHQ o en FISH, la participación del patólogo es determinante, ya que se deben reconocer las estructuras no patológicas y diferenciarlas de las neoplásicas para realizar el diagnóstico correctamente. Cuando se llevan a cabo ensayos con ácido desoxirribonucleico (ADN), ácido ribonucleico (ARN) o con proteínas extraídas a partir de muestras tisulares o celulares, se debe realizar un control microscópico para seleccionar, con o sin microdissección, las áreas más representativas de la lesión y planificar los procedimientos a realizar, teniendo en cuenta que las muestras suelen ser de tamaño pequeño y que puede existir heterogeneidad tumoral y/o diferenciación divergente.

La determinación de biomarcadores en CPNM avanzado debe cumplir los siguientes requisitos: a) elevado nivel de calidad científico-técnica; b) garantía de seguridad para el paciente; c) aplicación de criterios de eficiencia, y d) cumplimiento de los principios éticos y el marco legal vigente, teniendo en cuenta que se refieren a actuaciones en el ámbito de la asistencia sanitaria y no a la investigación biomédica. Tienen especial importancia los aspectos relacionados con la trazabilidad, la generación de informes, la preservación, la custodia y la gestión de las muestras. Los Servicios de Anatomía Patológica y los centros de referencia deben tener la acreditación necesaria para realizar estos estudios y cumplir con el marco jurídico (Ley 14/2007, Ley 44/2003, Real Decreto 1277/2003, Real Decreto 1691/1989, Ley 55/2003).

Es lógico que los ensayos moleculares complejos no se realicen en todas las instituciones sanitarias. Por tanto, deben establecerse centros de referencia que incluyan estas determinaciones dentro de sus carteras de servicios de forma institucional y que actúen en red. Estos centros de referencia deben constituirse en base a: a) la cualificación de los profesionales; b) las características de las instalaciones; c) el volumen de casos al año; d) el desarrollo de actividades científicas o de formación; e) la participación en programas de garantía de calidad; y el programa de la SEAP y la Academia Internacional de Patología (IAP)³⁷, y por último, f) la acreditación de estos centros por una agencia competente como la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) (UNE-EN-ISO 15189:2007; UNE-EN-ISO 9001: 2008).

El diagnóstico histológico certero como primer biomarcador

La clasificación histológica del cáncer de pulmón es la que ya definió la OMS en 1999 y que fue actualizada en 2004. Algunas variedades de carcinoma han sido malinterpretadas o discutidas, si bien no ha habido ninguna clasificación alternativa desde el año 2004³⁴. En 2011 se ha publicado una nueva propuesta de clasificación para los adenocarcinomas³⁸. Aunque todavía no se sabe si esta nueva clasificación se incorporará a la práctica diaria, el hecho de ser promovida y patrocinada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC), la Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Respiratoria Europea (ERS) hace pensar que su aplicación será generalizada.

La intención de este documento es indicar pautas de diagnóstico que permitan seleccionar el tratamiento, limitando al máximo el uso de técnicas que conllevan la pérdida de material.

La subclasificación de los CPNM se debe hacer separando los carcinomas escamosos del resto, ya sean adenocarcinomas o carcinomas de otras variantes poco habituales. El primer biomarcador que se va a obtener de una muestra es el diagnóstico morfológico. No hay que conformarse con un diagnóstico genérico de CPNM. La utilización de técnicas auxiliares, como la IHQ, es fundamental para conseguir un diagnóstico correcto en los casos en que se dispone de una cantidad de material escasa y en los tumores pobremente diferenciados. Términos como TTF-1, la expresión de la proteína p63 y la citoqueratina 5/6, o la napsina, deberían ser familiares para los oncólogos, ya que son los que marcan la diferencia entre carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. Se ha consensuado que el marcador de mayor utilidad para diferenciar ambos carcinomas es el TTF-1, que es positivo en adenocarcinomas. En cambio, los carcinomas de células escamosas son positivos para p63 y para citoqueratina 5/6. La pareja de anticuerpos más aceptada en la literatura es la formada por los dirigidos frente a TTF-1 y p63, junto a otros como la napsina³⁹.

Los estudios moleculares se realizan sobre material tisular, si bien pueden realizarse también sobre material de citología en centros especializados. La situación más habitual es realizar el diagnóstico en tejido procedente de una biopsia bronquial o de una punción percutánea guiada radiológicamente. En estos casos se aconseja realizar el diagnóstico con la primera sección histológica, para aplicar únicamente las técnicas imprescindibles, como son el estudio para los dos marcadores inmunohistoquímicos mencionados. El resto del material se preserva para los estudios moleculares correspondientes.

Fase pre-analítica

Consideraciones previas

La calidad de cualquier determinación molecular comienza antes de la toma de la muestra tumoral, y por tanto el personal encargado de la toma de la muestra, y los técnicos de anatomía patológica y el propio patólogo, deben conocer las variables que pueden influir en el estudio molecular.

Es importante tratar de obtener siempre la máxima cantidad de tejido posible en los distintos tipos de muestras,

siempre y cuando esto no suponga un riesgo adicional para el paciente. Por ello, es un requisito imprescindible la implicación de todos los especialistas que componen el comité de tumores, y en particular del patólogo, tanto si el análisis se realiza en su propio centro, como si la muestra se envía a un centro de referencia.

Tipos de muestras

Existen distintos tipos de muestras en función de la técnica que se ha utilizado para obtenerlas, como las biopsias endoscópicas, las biopsias por aguja gruesa, las biopsias guiadas por ultrasonido endobronquial (EBUS) o endoscópica (EUS), punción-aspiración con aguja fina (PAAF), mediastinoscopia y toracotomías. Con todas ellas se suele obtener una buena celularidad tumoral, aunque cualquier tipo de muestra que cuente con suficiente representación tumoral puede utilizarse, siempre y cuando cumpla los requisitos mínimos que se describen en la [tabla 2](#).

Se debe elegir la muestra que sea más accesible y que conlleve el menor riesgo para el paciente, sin que hasta el momento se hayan encontrado en la literatura discrepancias importantes que impidan el análisis de muestras de lesiones metastásicas.

Todos los procesos de la fase pre-analítica tendrán lugar en zonas de laboratorio «limpias», en las que no exista manipulación de productos relacionados con la PCR y que sigan las recomendaciones estándar de patología molecular para evitar contaminaciones o inhibiciones.

Procesos de la fase pre-analítica

Tiempo de hipoxia y fijación. La fijación se realizará lo antes posible, y siempre en la primera hora tras la obtención de la muestra⁴⁰⁻⁴². Se aconseja fijar la muestra en formol neutro alcohólico (B5, Penfix) o mercuriales (Bouin, Zenker). Otros fijadores están en fase de análisis. El tiempo óptimo de fijación es de 8 a 24 h para muestras quirúrgicas grandes y de 6 a 12 h para muestras pequeñas.

Las muestras citológicas fijadas de forma inmediata mediante los métodos habituales basados en alcohol pueden usarse y proporcionan ADN de calidad. También son útiles las citologías en medio líquido o bloques citológicos. Existe la posibilidad de congelar a -80°C muestras citológicas en soluciones amortiguadoras de pH, como PBS o citrato.

Selección y supervisión histopatológica de muestras. El patólogo elegirá el bloque o muestra más apropiado y cuantificará la proporción de células tumorales en una sección inmediatamente anterior a los cortes que se van a utilizar para el estudio molecular. En el caso de una citología, se examinará una extensión citológica representativa.

La cuantificación tumoral debe constar en el informe del estudio molecular. El consenso europeo recomienda un mínimo del 50% de componente invasivo si en la fase analítica se van a utilizar técnicas con baja sensibilidad (secuenciación directa) o un 10% si son técnicas de alta sensibilidad (PCR a tiempo real)⁴².

Macrodissección o microdissección. Para alcanzar una proporción de células tumorales adecuada se pueden realizar diversos procedimientos de macrodissección o microdissección. La macrodissección consiste en separar la zona del

Tabla 2 Condiciones de procesamiento según el tipo de muestra para la determinación de alteraciones moleculares en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado

Biopsias endoscópicas

- Secciones de $5\ \mu\text{m}$ de bloque completo, si la proporción tumoral es superior al 10% para técnicas de PCR a tiempo real, o mayor del 50% para técnicas de secuenciación directa. Número de cortes del bloque entre 10 y 15.
- Seleccionar fragmentos neoplásicos por microdissección si la proporción de células tumorales es menor a la referida en el punto anterior. Cantidad mínima recomendada: 20-30 cortes.
- Si en el bloque de parafina la muestra tumoral está agotada o es insuficiente, se puede retirar el cubre de una preparación ya teñida, con acetona durante 10 min e hidratar con alcohol de 96° durante 24 a 48 h, si hay una celularidad mínima recomendada de 1.000 células^a.

Citologías mediante EBUS, EUS o PAAF

- Si la proporción tumoral es adecuada, se puede retirar el cubre de la extensión citológica y raspar todo el porta con cuchilla.
- En centros que tengan experiencia en microdissección láser o microdissección con aguja, se debe marcar con rotulador los grupos tumorales y después marcar con lápiz de diamante esos grupos en el porta, obteniendo células con aguja 25G bajo control microscópico. Debe existir una celularidad mínima recomendada de 500 células^a.

Piezas quirúrgicas:

- Marcar la zona tumoral con mayor proporción de tumor/estroma-inflamación, evitando zonas con necrosis en cadena de la polimerasa.

EBUS: ultrasonografía endobronquial; EUS: ultrasonografía esofágica; PAAF: punción-aspiración con aguja fina; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

^a El número de células mínimo depende del método de extracción de ADN (empleo de reactivos comerciales recomendado) y/o del volumen de tampón de lisis que se va a emplear. Existen reactivos comerciales específicos para situaciones de baja celularidad.

bloque con mejor representación tumoral en el bloque de parafina o en las secciones. La microdissección, manual o mediante láser, solo debe realizarse en centros con amplia experiencia.

Extracción y control de calidad del ADN. Se recomienda el uso de reactivos comerciales para muestras en parafina o citológicas, aunque también pueden ser válidos métodos manuales si se dispone de la experiencia adecuada. No se recomienda el uso de reactivos que usen columnas de purificación en muestras escasas o concentraciones celulares. Se recomienda comprobar la calidad y la concentración del ADN con técnicas habituales (p. ej., ratio 260/280 $>1,8$ y concentración por microlitro). En varios reactivos comerciales existen controles de ADN, para la determinación de mutaciones de *EGFR* mediante la amplificación de un gen control, que cumplen esta función.

Tabla 3 Principales métodos empleados para la determinación de mutaciones de *EGFR*

Técnica	Sensibilidad (% ADN mutado)	Mutaciones identificadas	Detección precisa de deleciones e inserciones
<i>Secuenciación directa</i>			
Método de Sanger	25	Conocidas y nuevas	Sí
Pirosecuenciación	5-10	Conocidas y nuevas	Sí
<i>PCR cuantitativa en tiempo real</i>			
TaqMan PCR	10	Solo conocidas	No
Scorpions ARMS	1	Solo conocidas	No
<i>Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado</i>			
PNA-LNA PCR clamp	1	Solo conocidas	No
Digestión con enzimas de restricción	0,2	Solo conocidas	No
Smart	0,1	Solo conocidas	No
COLD-PCR	1-10	Conocidas y nuevas	Sí
<i>PCR-RFLP</i>	5	Solo conocidas	Sí
<i>dHPLC</i>	1	Conocidas y nuevas	Sí
<i>Inmunohistoquímica</i>	Desconocida	Solo conocidas	Sí

ARMS: sistema de mutación refractaria a la amplificación; COLD: coamplificación a temperaturas de desnaturalización más bajas; dHPLC: desnaturalización cromatografía líquida de alto rendimiento; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; PNA-LNA: ácido nucleico peptídico-ácido nucleico bloqueado; RFLP: polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

Fase analítica

Mutaciones de EGFR

Se debe realizar el estudio mutacional de los cuatro exones (18-21) del gen *EGFR*. En los casos en que la cantidad o nivel del ADN sea un factor limitante, los exones 19 y 21 deben evaluarse de forma preferente^{5,42-51}.

Aunque existe un gran número de métodos para determinar mutaciones de *EGFR*, en nuestro medio los más utilizados son la secuenciación directa y la PCR en tiempo real (tabla 3).

PCR y secuenciación directa. La secuenciación directa con el método de Sanger tiene como principales ventajas frente al resto de métodos: a) uso común y disponibilidad; b) falta de necesidad de agrupar las muestras para su análisis; c) posibilidad de detectar todas las mutaciones posibles, así como d) capacidad para identificar exactamente de qué mutación se trata.

En contrapartida, sus inconvenientes son: a) baja sensibilidad (entre el 20 y el 50%); b) riesgo elevado de contaminación por el manejo de productos post-PCR, y c) menor rapidez, al ser necesarios múltiples pasos, como la extracción del ADN, la amplificación basada en PCR, la secuenciación y la interpretación de esta última.

Si se utiliza esta tecnología, se recomienda:

- Separar las áreas de trabajo destinadas a PCR y post-PCR y utilizar materiales exclusivos en cada una de ellas. Se aconseja preparar las mezclas de reacción en una campana de flujo laminar para asegurar un ambiente estéril, mientras que la adición del ADN se debe realizar fuera

de dicha campana para minimizar el riesgo de contaminación.

- Para cada reacción de PCR se debe incluir al menos un control positivo con ADN genómico previamente validado y un control sin ADN.
- Analizar la eficiencia y la especificidad de la amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa, de forma que se puedan visualizar los productos de PCR como bandas por tinción con bromuro de etidio o productos similares en dichos geles.
- Los productos de PCR deben secuenciarse en ambas direcciones, es decir hacia delante (*forward*) y hacia atrás (*reverse*).

PCR en tiempo real. Entre estas técnicas, la más utilizada se basa en la tecnología Scorpion-ARMS, que utiliza un reactivo comercial que permite la identificación de 29 mutaciones de *EGFR* (TheraScreen® EGFR29 Mutation Test Kit). Entre las ventajas de esta técnica destacan: a) una mayor sensibilidad en comparación con la secuenciación directa, en torno al 5% según nuestra propia experiencia; b) una mayor rapidez, y c) un menor requerimiento de celularidad tumoral.

Por el contrario, las desventajas de esta técnica son: a) no permite identificar todas las mutaciones, sino solo aquellas para las que se ha diseñado el reactivo; b) requiere agrupar las muestras para optimizar los productos, y c) es más cara cuando se compara con el coste de la secuenciación directa.

Si se utiliza esta tecnología, se recomienda:

- Utilizar las mismas precauciones de separación de áreas pre- y post-PCR que en la secuenciación.

- Incluir un control positivo con ADN, que habitualmente se suministra junto con el reactivo comercial, y un control negativo o reacción sin ADN en cada análisis.

Translocación de ALK

En nuestro entorno, la única opción analítica realista para determinar la translocación de *ALK* es mediante FISH. Su protocolo no difiere en lo esencial del empleado para el estudio de otros genes. Solo los laboratorios que tengan más de 100 pruebas FISH al año deberían acometer la implementación de esta técnica, según los resultados obtenidos frente a centros de referencia. Actualmente existen dos sondas en el mercado que pueden proporcionar resultados valorables, si bien tienen una aproximación diferente, ya que se trata de sondas de rotura o *break-apart* (Vysis) y sondas de fusión (Kreatech).

Fase post-analítica

Mutaciones de EGFR

PCR y secuenciación directa. Se recomienda utilizar programas informáticos específicos que permitan comparar la secuencia o electroferograma obtenido con la secuencia de *EGFR* no mutado. Una muestra debe considerarse positiva cuando la mutación está presente en, al menos, dos secuencias diferentes (una *forward* y otra *reverse*) obtenidas de dos productos de PCR independientes. La persona que interprete las secuencias deberá tener una experiencia contrastada.
PCR en tiempo real. El análisis es, en principio, cerrado y no se deberían interpretar casos cuyos controles no ofrezcan el resultado esperado, por coherentes que éstos resulten.

Translocación de ALK

Para su interpretación, se deberá tener en cuenta el diseño de la sonda, ya que en general se producen imágenes de separación, así como la información predictiva, ya que la pérdida de señales también puede ser un marcador de respuesta. La persona que interprete las imágenes deberá tener una experiencia contrastada.

Control de calidad externo

Independientemente de la participación en un control de calidad externo, todos los laboratorios que utilicen estas tecnologías deben validar, como medida de control, tanto su especificidad y su sensibilidad analíticas, como su valor predictivo. La SEAP está evaluando la incorporación de otros marcadores, como BRAF o PI3K, al control de garantía de calidad.

Mutaciones de EGFR

En el año 2010, la SEAP ha puesto en marcha un Programa de Control de Calidad de mutaciones de *EGFR*³⁷ cuyas características principales se exponen a continuación.

El programa se ha diseñado para evaluar las distintas etapas, incluidas las fases pre-analítica y post-analítica o de interpretación de resultados. El laboratorio o organizador selecciona una serie de casos mutados y no mutados para *EGFR*, que son remitidos a los laboratorios participantes en forma de secciones sin teñir, de tejido fijado en formol e incluido en parafina. Cada porta está claramente

identificado con el número correspondiente a la muestra y el número correspondiente a la sección. Cada laboratorio participante utilizará los protocolos que emplee de forma rutinaria en la práctica clínica. Con el fin de valorar el porcentaje de celularidad tumoral de las muestras remitidas, es imprescindible teñir con hematoxilina-eosina (H-E) una de las secciones remitidas para que pueda ser revisada.

El envío de resultados debe realizarse de forma anónima. El número identificador de cada laboratorio participante aparece en la caja de preparaciones. Así, en un plazo de 14 días los laboratorios participantes deben remitir al organizador por vía electrónica lo siguiente:

- Formulario con la información solicitada relativa a las distintas etapas del análisis de mutaciones del gen *EGFR*.
- Informe con los resultados del análisis para cada muestra, tomando como modelo el informe que, de forma habitual, se remite al médico que solicita la determinación de mutaciones.
- Resultados analíticos sin interpretar, en los que se basa el genotipo establecido para cada una de las cuatro muestras remitidas. Por ejemplo, electroferogramas en el caso de realizar el análisis mediante secuenciación directa del producto de PCR o un archivo con los valores Ct en el caso de realizar el análisis mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Los resultados son evaluados y discutidos por un grupo de trabajo. En todo momento se debe mantener el anonimato de los participantes. Cada laboratorio participante recibe un informe personal y otro general con los resultados obtenidos.

Translocación de ALK

Hasta el momento no existe en el mundo un control de calidad externo para esta determinación. No obstante, en nuestra opinión, a nivel operativo se debería seguir un modelo similar al que se sigue con la hibridación de *HER-2* en los programas de control de calidad que se realizan en España, en el Reino Unido y en los países nórdicos.

Aspectos comunes

Flujo de trabajo y unificación de criterios

Lugar para realizar las determinaciones

Las determinaciones pueden realizarse en el propio centro asistencial o en un centro de referencia. Si la técnica se realiza en el propio centro asistencial, el laboratorio deberá: a) haber efectuado antes un programa de formación y aprendizaje de las técnicas que sea adecuado; b) estar dotado de los medios técnicos necesarios; c) tener criterios suficientes para la interpretación correcta de los resultados obtenidos, y d) disponer de un control periódico de calidad para asegurar la correcta ejecución.

Si la técnica se realiza en un centro de referencia, el Servicio de Anatomía Patológica del centro asistencial deberá preparar la muestra de biopsia o citología para su análisis, siguiendo los criterios unificados de procesamiento de muestras que existen. Con el fin de garantizar que el tiempo de proceso no exceda los 7-10 días, se deberán ajustar los

sistemas de preparación y envío de la muestra, así como de recepción de resultados.

Pacientes susceptibles de determinaciones moleculares

Dada la dificultad de obtención de muestra, el coste económico y el incremento de trabajo, es necesario hacer una correcta selección de los pacientes candidatos para el estudio de biomarcadores. A la espera de los resultados de los estudios en marcha con crizotinib y otros fármacos, de momento a nivel asistencial solo es preciso determinar la presencia de mutaciones de *EGFR* en todos los pacientes con histología de carcinoma no escamoso y en los pacientes no fumadores, independientemente del tipo histológico que tengan.

Aunque hasta el momento la decisión sobre a qué pacientes debe realizarse el estudio de mutaciones de *EGFR* la ha tomado mayoritariamente el oncólogo, es deseable que la determinación se haga sistemáticamente en el estudio diagnóstico inicial en pacientes con enfermedad avanzada. Esta aproximación deberá ser común para todos los biomarcadores que se incorporen a la práctica diaria.

Optimización de la obtención de la muestra

Con el fin de obtener la mayor cantidad de material tumoral posible para la determinación, sería recomendable facilitar la existencia de vías de comunicación entre los facultativos que obtienen la muestra (especialmente neumólogos, cirujanos torácicos y radiólogos) y los patólogos correspondientes. Disponer de información clínica —como por ejemplo el hábito tabáquico— ayudará a los patólogos a trabajar de acuerdo a los algoritmos existentes. Esto también requerirá revisar los protocolos existentes en los centros respecto a la toma de muestras, conservación y transporte hasta los servicios de anatomía patológica.

Preparación de la muestra

En el cáncer de pulmón se pueden destacar tres peculiaridades: a) la mayoría de los pacientes no son susceptibles de tratamiento quirúrgico, por lo que las muestras disponibles para realizar el diagnóstico suelen ser citologías o biopsias pequeñas. Por esta razón, es fundamental optimizar su procesamiento para obtener la mayor información útil posible; b) los avances científicos recientes están modificando las estrategias diagnósticas y terapéuticas, y c) la heterogeneidad tumoral en estos carcinomas es relevante.

Cualquiera que sea la entrada del paciente en el proceso, ha de ser evaluado en el comité de tumores del centro para decidir las actuaciones a seguir, entre las que se encuentra la toma de muestras para el diagnóstico cito-histopatológico, fenotípico y molecular.

Es aconsejable realizar una valoración y procesamiento de la muestra citológica obtenida en cuanto se recibe en el laboratorio para informar de la representatividad, de la calidad y de la celularidad del material disponible e intentar hacer una aproximación diagnóstica que facilite la continuidad del proceso asistencial. Para ello, es recomendable utilizar citología en fase líquida, ya permite extensas extensiones defectuosas y permite obtener preparaciones de gran calidad para realizar estudios morfológicos, fenotípicos y obtener además ADN y/o ARN del material celular excedente, pudiendo además conservarse a temperatura

ambiente durante largos periodos de tiempo. Aunque con un mínimo de 150 células se pueden realizar estudios moleculares, es a partir de 300-1.000 cuando se obtienen resultados fiables⁵². Si no se dispone de citología en fase líquida, una buena opción es la fabricación de botones celulares.

Ante biopsias de pequeño tamaño es importante observar la fijación (formol tamponado al 10% a pH de 7,2 durante 6 a 24 h) y aprovechar todo el tejido. Para ello, se pueden reservar los cortes del desbastado de los bloques de parafina para la extracción de ADN, colocando los cortes en tubos Eppendorf, y luego realizar secciones seriadas en portas tratados con adhesivos para tinciones de rutina e IHQ o FISH.

En caso necesario, se pueden reutilizar preparaciones ya teñidas para recuperar tejido y/o células, incluso de casos ya archivados. Los resultados obtenidos a partir de preparaciones citológicas son superponibles a los de las biopsias y piezas quirúrgicas, por lo que ambos tipos de muestras son válidas para estudios moleculares⁵³.

Si se reciben biopsias intraoperatorias o tejido en fresco, es aconsejable seleccionar un fragmento de material tumoral representativo y, mejor aún, otro de tejido no tumoral también, que se congele en no más de 30 min tras su extracción para su criopreservación, siendo de utilidad el uso de conservantes como *RNA-later* que preservan la calidad del ARN.

Algoritmo diagnóstico

En la [figura 2](#) se propone un posible algoritmo diagnóstico para pacientes con CPMN avanzado, aunque hay que tener en cuenta que cada proceso diagnóstico debe adaptarse a las características individuales de cada paciente y el manejo multidisciplinar que debe tener esta patología.

Interpretación de resultados

Los resultados de las pruebas referentes a la presencia de la mutación en el gen del *EGFR* deben ser inequívocos. Se han descrito numerosas mutaciones diferentes en este gen, pero solamente las que se centran en el exón 19 (deleciones alrededor del dominio LREA) y las mutaciones puntuales en el exón 21 (L858R) han demostrado tener valor predictivo en cuanto a la respuesta a los ITK-EGFR. Se han descrito además otras mutaciones, mucho menos frecuentes, particularmente en los codones 718 y 719 del exón 18, en el exón 21 (L861Q) y en el exón 20 (deleciones/inserciones) cuyo significado es incierto y están en continua revisión en la literatura.

Cabe señalar también que los estudios moleculares permiten detectar un rango más o menos amplio de mutaciones en función de la técnica utilizada. Estas limitaciones conviene reflejarlas en el informe, de manera que se conozca el alcance real del resultado que está valorando.

Por otra parte, se desconoce el impacto clínico que puede tener la detección de mutaciones por técnicas de suensibilización más bajas (COLD-PCR, COLD-pirosecuenciación, etc.), desaconsejándose en el momento actual su uso en el ámbito asistencial.

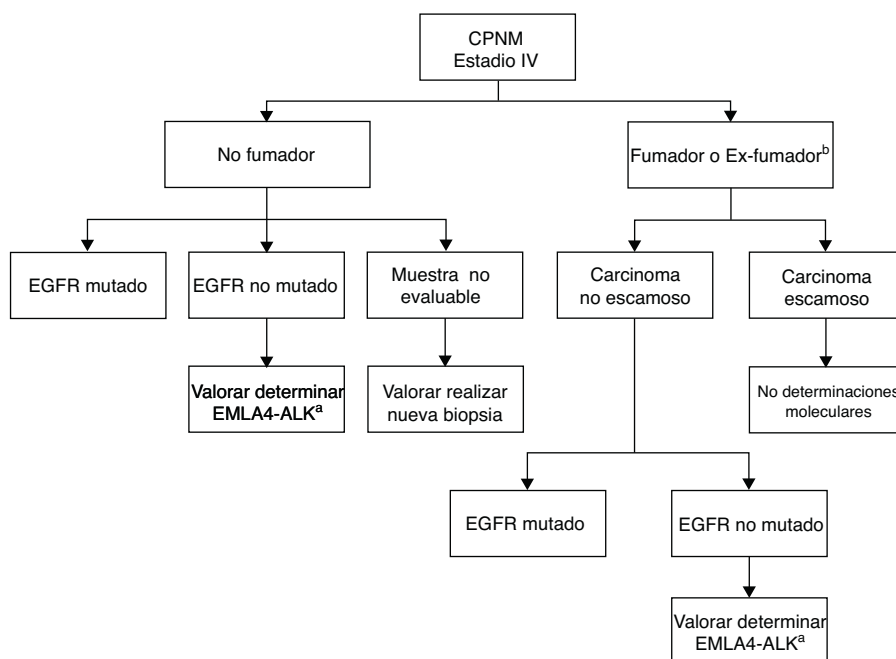


Figura 2 Algoritmo diagnóstico para pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado. ALK: quinasa del linfoma anaplásico; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico. ^aEn el contexto de ensayos clínicos con inhibidores de ALK. ^bConsiderar carga tabáquica del paciente.

Informe de resultados

El Informe de resultados de determinación de cualquier biomarcador debe contener al menos la siguiente información:

- Identificación del paciente y del médico solicitante (o persona autorizada en su defecto).
- Diagnóstico anatomopatológico.
- Muestra que se remite, a ser posible con la fecha de toma de muestra.
- Identificación del código externo en el caso de centros de referencia.
- Medio en el que se recibe la muestra (fresco, congelación, parafina, etc.).
- Origen anatómico de la muestra.
- Fecha de solicitud, recepción de la muestra y emisión de resultados.
- Identificación de la técnica realizada para la determinación del biomarcador, especificando mutaciones y/u otras alteraciones detectables. En el caso de reactivos comerciales, indicar si poseen el sello «Productos de diagnóstico *in vitro*» (IVD), nombre comercial y número de lote.
- Calidad de la muestra, especificando el porcentaje de células tumorales y si se ha hecho enriquecimiento de la muestra mediante micro o macrodissección, así como concentración de ADN y pureza.
- Especificar en comentarios si la muestra es adecuada o inadecuada.
- Resultados del análisis, definiendo el tipo de alteración molecular detectada o la ausencia de alteraciones moleculares.
- Identificación del profesional responsable de la determinación.

- Identificación del responsable del laboratorio.
- Información o comentarios adicionales que sean de interés para el médico peticionario.
- Acreditación o participación en programas de calidad.

Tiempos recomendados y aceptables

El tiempo en el que se realiza el estudio molecular es clave para el paciente, y por ello, según el consenso europeo, se recomienda que sea menor de 7 días laborables⁴².

Se estima que 2-3 días son suficientes para la toma de la muestra, la revisión histológica para comprobar la cantidad de tejido y la proporción de células tumorales disponibles y la realización de técnicas de macro o microdissección. Además, se recomiendan 1-2 días para la extracción de ADN, 1-2 días para la fase analítica y 1 día para la interpretación y envío del resultado. Por tanto, todo el proceso podría ser realizado en 5 días, disponiendo así de 2 días adicionales por si hay que repetir alguna determinación, lo cual ocurre en el 5 al 20% de los casos. Si el estudio molecular se va a demorar más de 7 días, es importante contactar con el oncólogo e informarle.

Perspectivas de futuro

Es de esperar que en los próximos años se intensifiquen las oportunidades de tratamiento individualizado para los pacientes con cáncer de pulmón. Hasta el momento, única paciente con una mínima respuesta a la terapia con inhibidores de EGFR. Asimismo, algunos de los estudios que están en curso con diferentes inhibidores dirigidos a dianas de potencial interés (p. ej., Her2, PI3K, mTor, akt, Mek, LKB1, etc.) darán

sus frutos y podrán ser incorporados a nuestro arsenal terapéutico. Adicionalmente, la búsqueda de nuevas dianas es previsible que resulte en la incorporación de nuevas moléculas en el futuro. En este sentido, cabe señalar que el propio proceso de desarrollo de nuevos fármacos anti-tumorales llevará asociado, en la mayoría de los casos, la incorporación y desarrollo concurrente de un biomarcador que defina la población de pacientes susceptibles de beneficio con el medicamento de interés.

Todo ello nos llevará con toda seguridad a extremar las medidas para obtener tejido tumoral de calidad que permita establecer el diagnóstico y la predicción terapéutica. En este sentido, será crucial la complicidad de todos los profesionales implicados en el cuidado de los pacientes con cáncer de pulmón, particularmente de los responsables de obtener las muestras (endoscopistas y cirujanos) y de los responsables de optimizar y garantizar la calidad de la información (patólogos y biólogos moleculares).

La incorporación de nuevos fármacos y biomarcadores precisará también de la revisión frecuente de los algoritmos de priorización en el uso de las muestras, que atenderá a criterios de utilidad de cada biomarcador, beneficio con cada medicamento, parámetros clínico-epidemiológicos, y disponibilidad y accesibilidad tecnológicas. Es asimismo previsible el desarrollo en un futuro próximo de tecnologías que habiliten la utilidad de marcadores basados en muestras de fácil acceso en la práctica clínica, como el suero o las células tumorales circulantes.

Otro desarrollo previsible será la confección de biomarcadores complejos, basados en múltiples predictores simples, que nos faciliten información, no solo de la utilidad potencial de diferentes tratamientos en monoterapia, sino también de sus combinaciones. La sofisticación tecnológica deberá también resolver la posibilidad de incorporar a una misma prueba diagnóstica diferentes tecnologías, como FISH y análisis mutacional.

Finalmente, si se vislumbra una intensificación del uso de predictores en la práctica clínica relacionada con el cuidado de los pacientes con cáncer de pulmón, se deberá prestar particular atención a dos aspectos adicionales. En primer lugar, la puesta a punto no solo de cada biomarcador en cada centro (local o de referencia) sino de los sistemas regulares y regulados de control de calidad. En segundo lugar, la expansión del uso de biomarcadores tendrá implicaciones económicas para los sistemas sanitarios. Por ello, su uso debe ser optimizado y basado en consensos que evalúen la tecnología empleada y su utilidad potencial.

Conclusiones

La trascendencia de la adecuada selección de tratamiento en pacientes con CPNM avanzado y la necesidad de que los biomarcadores que permiten esta selección sean analizados con los controles de calidad más rigurosos, y en el menor tiempo posible, han guiado la elaboración de este consenso liderado por las sociedades científicas SEAP y SEOM.

Este documento tiene carácter asistencial, por lo que las recomendaciones se ciñen a los biomarcadores que actualmente delimitan subgrupos de pacientes con abordajes terapéuticos diferentes, validados y basados en fármacos ya comercializados. Es de esperar, no obstante,

que en un futuro cercano esta batería se amplíe, si bien las propuestas de trabajo multidisciplinar en el entorno de los Comités de Tumores, las decisiones colegiadas y la calidad de resultados contrastada que han guiado la elaboración de este documento seguirán siendo válidas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

La SEAP y la SEOM agradecen el apoyo económico sin restricciones para este proyecto de AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Lilly Oncología, Pfizer Oncología y Roche Farma (España).

Conflicto de intereses

Los autores declaran que, en el momento de la redacción y revisión del texto, desconocían el nombre de los laboratorios que han apoyado económicamente este proyecto, por lo que este apoyo no ha influido en el contenido de este artículo.

Agradecimientos

Beatriz Gil-Alberdi de HealthCo (Madrid, España) ha proporcionado asistencia editorial para el desarrollo de este manuscrito. Los miembros del Grupo de Trabajo en Biomarcadores SEOM-SEAP son R. Colomer, P. García-Alfonso, P. Garrido, A. Ariza, E. de Álava y J. Palacios.

Bibliografía

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:69–90.
2. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2011;12:175–80.
3. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004;350:2129–39.
4. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004;304:1497–500.
5. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:958–67.
6. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009;361:947–57.
7. Lee JS, Park K, Kim SW, Lee DH, Kim HT, Han JY. A randomized phase III study of gefitinib (IRESSA™) versus standard chemotherapy (gemcitabine plus cisplatin) as a first-line treatment for

- never-smokers with advanced or metastatic adenocarcinoma of the lung [abstract]. *J Thorac Oncol.* 2009;4 Suppl 1:PRS4.
8. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): An open label, randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2010;362:11:121–8.
 9. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010;362:2380–8.
 10. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu X, Wang C. Efficacy results from the randomized phase III OPTIMAL (CTONG 0802) study comparing first-line erlotinib versus carboplatin (CBDCA) plus gemcitabine (GEM), in Chinese advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (PTS) with EGFR activating mutations [abstract]. *Ann Oncol.* 2010;21:LBA13.
 11. Rosell R, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Cardenal F, et al. Erlotinib versus chemotherapy (CT) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations: Interim results of the European Erlotinib Versus Chemotherapy (EURTAC) phase III randomized trial [abstract]. En: *ASCO Annual Meeting.* 2011. p. 7503.
 12. Felip E, Gridelli C, Baas P, Rosell R, Stahel R. Metastatic non-small-cell lung cancer: Consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010. *Ann Oncol.* 2011;22:1507–19.
 13. Keedy VL, Temin S, Somerfield MR, Beasley MB, Johnson DH, McShane LM, et al. American Society of Clinical Oncology (ASCO) expert clinical opinion: Epidermal growth factor receptor (EGFR) Mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol.* 2011;29:2121–7.
 14. Trigo Perez JM, Garrido Lopez P, Felip Font E, Isla Casado D. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small-cell lung cancer: An updated edition. *Clin Transl Oncol.* 2010;12:735–41.
 15. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science.* 1994;263:1281–4.
 16. Chiarle R, Voena C, Ambrogio C, Piva R, Inghirami G. The anaplastic lymphoma kinase in the pathogenesis of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8:11–23.
 17. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell.* 2007;131:1190–203.
 18. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561–6.
 19. Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer Res.* 2008;68:3077–80, discussion 3080.
 20. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Janne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46:1773–80.
 21. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009;27:4247–53.
 22. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693–703.
 23. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2008;455:1069–75.
 24. Beau-Faller M, Ruppert AM, Voegeli AC, Neuville A, Meyer N, Guerin E, et al. MET gene copy number in non-small cell lung cancer: Molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naive cohort. *J Thorac Oncol.* 2008;3:331–9.
 25. Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signalling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2207–14.
 26. Hirsch FR, Langer CJ. The role of HER2/neu expression and trastuzumab in non-small cell lung cancer. *Semin Oncol.* 2004;31:75–82.
 27. Perera SA, Li D, Shimamura T, Raso MG, Ji H, Chen L, et al. HER2YVMA drives rapid development of adenosquamous lung tumors in mice that are sensitive to BIBW2992 and rapamycin combination therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:474–9.
 28. Shimamura T, Ji H, Minami Y, Thomas RK, Lowell AM, Shah K, et al. Non-small-cell lung cancer and Ba/F3 transformed cells harboring the ERBB2 G776insV.G/C mutation are sensitive to the dual-specific epidermal growth factor receptor and ERBB2 inhibitor HKI-272. *Cancer Res.* 2006;66:6487–91.
 29. Wang SE, Narasani A, Perez-Torres M, Xiang B, Wu FY, Yang S, et al. HER2 kinase domain mutation results in constitutive phosphorylation and activation of HER2 and EGFR and resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Cell.* 2006;10:25–38.
 30. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011;29:2046–51.
 31. Okudela K, Suzuki M, Kageyama S, Bunai T, Nagura K, Igarashi H, et al. PIK3CA mutation and amplification in human lung cancer. *Pathol Int.* 2007;57:664–71.
 32. Kawano O, Sasaki H, Endo K, Suzuki E, Haneda H, Yukiue H, et al. PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2006;54:209–15.
 33. Angulo B, Suarez-Gauthier A, Lopez-Rios F, Medina PP, Conde E, Tang M, et al. Expression signatures in lung cancer reveal a profile for EGFR-mutant tumours and identify selective PIK3CA overexpression by gene amplification. *J Pathol.* 2008;214:347–56.
 34. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. WHO Classification. *Pathology & Genetics – Tumors of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.* 2004 [consultado 1 Juni 2011]; disponible en: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pathology/bb10/bb10-cover.pdf>
 35. Salido M, Pijuan L, Martinez-Aviles L, Galvan AB, Canadas I, Rovira A, et al. Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011;6:21–7.
 36. Sharma SV, Haber DA, Settleman J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:241–53.
 37. SEAP-IAP. Garantía de Calidad en Patología de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y la División Española del International Academy of Pathology. 2011 [consultado 1 Juni 2011]; disponible en: <http://www.seap.es/gcp/molecular/index.asp>
 38. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6:244–85.
 39. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinoma lacking morphological differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol.* 2011;35:15–25.
 40. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S, Camacci T, Baldini E, Melfi F, et al. Mutational analysis in cytological specimens of advanced lung adenocarcinoma: A sensitive method for molecular diagnosis. *J Thorac Oncol.* 2007;2:1086–90.

41. Ladanyi M, Pao W. Lung adenocarcinoma: Guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol*. 2008;21 Suppl 2:S16–22.
42. Pirker R, Herth FJ, Kerr KM, Filipits M, Taron M, Gandara D, et al. Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer: Results from a European workshop. *J Thorac Oncol*. 2010;5:1706–13.
43. Angulo B, Garcia-Garcia E, Martinez R, Suarez-Gauthier A, Conde E, Hidalgo M, et al. A commercial real-time PCR kit provides greater sensitivity than direct sequencing to detect KRAS mutations: A morphology-based approach in colorectal carcinoma. *J Mol Diagn*. 2010;12:292–9.
44. Brevet M, Arcila M, Ladanyi M. Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn*. 2010;12:169–76.
45. Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, Lopez-Encuentra A, et al. Molecular context of the EGFR mutations: Evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res*. 2006;12:710–7.
46. Kato Y, Peled N, Wynes MW, Yoshida K, Pardo M, Mascaux C, et al. Novel epidermal growth factor receptor mutation-specific antibodies for non-small cell lung cancer: Immunohistochemistry as a possible screening method for epidermal growth factor receptor mutations. *J Thorac Oncol*. 2010;5:1551–8.
47. Kawahara A, Yamamoto C, Nakashima K, Azuma K, Hattori S, Kashiwara M, et al. Molecular diagnosis of activating EGFR mutations in non-small cell lung cancer using mutation-specific antibodies for immunohistochemical analysis. *Clin Cancer Res*. 2010;16:3163–70.
48. Marchetti A, Normanno N, Pinto C, Taddei GL, Adamo V, Ardizzone A, et al. Recommendation. *Pathologica*. 2010;102:119–26.
49. Pan Q, Pao W, Ladanyi M. Rapid polymerase chain reaction-based detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in lung adenocarcinomas. *J Mol Diagn*. 2005;7:396–403.
50. Pao W, Ladanyi M. Epidermal growth factor receptor mutation testing in lung cancer: Searching for the ideal method. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4954–5.
51. Yu J, Kane S, Wu J, Benedettini E, Li D, Reeves C, et al. Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15:3023–8.
52. Travis WD, Rekhtman N. Pathological diagnosis and classification of lung cancer in small biopsies and cytology: Strategic management of tissue for molecular testing. *Semin Respir Crit Care Med*. 2011;32:22–31.
53. Billah S, Stewart J, Staerckel G, Chen S, Gong Y, Guo M. EGFR and KRAS mutations in lung carcinoma: Molecular testing by using cytology specimens. *Cancer Cytopathol*. 2011;119:111–7.