

RECOMENDACIONES DEL CLUB DE PATOLOGÍA PULMONAR DE LA SEAP

Introducción

Clara Salas, coordinadora del club

Correspondencia: clara.salas@salud.madrid.org

El cáncer de pulmón constituye la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo. Actualmente, la resección quirúrgica con intención curativa es el tratamiento de elección, sin embargo, la gran mayoría de los casos se presentan en etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que la única opción terapéutica disponible es la terapia médica. El pronóstico general de los pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón es malo, con una supervivencia global a los cinco años inferior al 15%. Esto se debe a unos métodos poco eficaces para la detección precoz y a la falta de un tratamiento curativo para la enfermedad avanzada.

En los últimos años estamos asistiendo a un rápido desarrollo de técnicas de biología molecular para el estudio del cáncer de pulmón, y nuestra comprensión y apreciación de la complejidad de la biología del tumor se ha incrementado de manera exponencial. Está bien establecido que estas neoplasias son el resultado de múltiples combinaciones complejas de alteraciones morfológicas, moleculares y genéticas, que conducen a una masa de células malignas con los diferentes fenotipos de cáncer.

La mejora de los resultados en los pacientes, producto de estos avances, requiere una planificación multidisciplinar del diagnóstico y del tratamiento y ha aumentado de manera significativa el papel del patólogo quirúrgico. Éste, no sólo debe confirmar el diagnóstico de malignidad, sino definir con precisión el subtipo del tumor en función de su histología, así como indicar su perfil molecular. Debido a que en la mayoría de casos, el diagnóstico se realiza en biopsias pequeñas o muestras de citología, obtenidas a su vez por procedimientos cada vez más sofisticados, el patólogo debe obtener el máximo rendimiento diagnóstico en el escaso material disponible.

La clasificación, aun en vigor, de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2004) se aplica a los tumores malignos reseccionados quirúrgicamente. La más reciente revisión de 2011 para el adenocarcinoma por la IASLC / ATS / ERS, integra la patogenia, criterios histológicos y comportamiento clínico, y aporta parámetros para una mayor precisión en el diagnóstico del cáncer de pulmón en biopsias pequeñas y muestras de citología.

Ya conocemos que se está preparando la nueva clasificación OMS para ser publicada en 2015, y aunque muchas de sus novedades están ya reflejadas en el documento que exponemos a continuación, nos hemos ceñido a lo que está contrastado en la literatura actual, sabiendo que como tantas veces en Medicina y de manera importante en nuestra especialidad, estamos ya obsoletos, pero comprometidos a actualizarla.

Sobre estas premisas, esperamos que sea de vuestro interés y de ayuda en algún caso.

Recomendaciones para el estudio del Cáncer de Pulmón

Consenso del Club de Pulmón de la Sociedad Española de Anatomía Patológica

Aranda F. Ignacio, Conde Esther, Gómez-Román Javier, López-Ríos Fernando, Lozano María Dolores, Martín Luz, Plaza M^a Luz, Saiz Mónica, Salas Clara, Toro Paula.

I. INTRODUCCIÓN

La metodología que hemos seguido ha consistido en una reunión presencial preliminar del grupo, para discutir los puntos considerados de mayor interés y después elaborar el siguiente documento de consenso: Hemos intentado cubrir los principales aspectos del diagnóstico del carcinoma pulmonar, en las citologías, las biopsias y en piezas quirúrgicas. Se emiten las recomendaciones relativas al papel de la PAAF en el cáncer de pulmón, el estudio macroscópico de las piezas, protocolo de actuación en la biopsia intraoperatoria, marcadores inmunohistoquímicos y moleculares de mayor utilidad, tanto para el diagnóstico como en la predicción de respuesta al tratamiento, y el manejo de piezas de resección tras la neoadyuvancia. Finalmente, se aporta un modelo de informe anatomopatológico que incluye datos imprescindibles y recomendados para el informe de piezas quirúrgicas.

II. PAAF EN PULMÓN: MÉTODOS DE ABORDAJE Y MANEJO DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS MOLECULARES

M^a Dolores Lozano, Clínica Universitaria de Navarra.

Técnicas de abordaje

1. *PAAF transtorácica bajo control de TAC*: Técnica de punción más utilizada en lesiones periféricas. Permite la obtención directa de muestras citológicas y/o pequeñas biopsias de pulmón de forma percutánea a través del tórax y bajo control de TAC. En manos de un radiólogo experimentado con el patólogo presente durante la exploración tiene un rendimiento diagnóstico muy alto. Las complicaciones más frecuentes, que limitan su uso, son el desarrollo de neumotórax y la hemorragia pulmonar (1).
2. *PAAF transbronquial y broncoscopia*: La punción transbronquial (PTB) se ha consolidado como una técnica extremadamente útil en el abordaje diagnóstico del mediastino y de lesiones endobronquiales accesibles al broncoscopio. Las indicaciones principales de esta técnica incluyen el diagnóstico de adenopatías mediastínicas, patología submucosa, afectación endobronquial e incluso nódulos pulmonares periféricos. Este abanico de posibilidades da una idea de la versatilidad de la técnica (2). La rentabilidad diagnóstica de la PTB es muy alta, sobre todo en el caso de afectación neoplásica de la región subcarinal o paratraqueal derecha.

- a) Una variación de esta técnica, ya en aplicación en algunos centros, es el uso de *navegación electromagnética con PAAF transbronquial*, aumenta significativamente la rentabilidad diagnóstica de la broncoscopia en el abordaje de nódulos pulmonares periféricos, siendo muy útil en el diagnóstico de nódulos pulmonares de difícil abordaje en pacientes con alto riesgo quirúrgico (3, 4). Esta técnica se basa en tres pilares: (A) Planificación virtual previa mediante TAC, (B) Navegación empleando conceptos de GPS y (C) Una sonda electromagnética dirigible que permite navegar en tiempo real hasta una lesión alejada y biopsiarla utilizando una pinza o una aguja de punción citológica.
- b) Otra variante es la *Ultrasonografía endobronquial (EBUS)*, similar a la *ultrasonografía endoscópica*. Permite la visualización a tiempo real de los ganglios a estudio. Combina la broncoscopia tradicional con la ecografía, de forma que permite obtener imágenes ecográficas de las estructuras que se encuentran en contacto con la pared bronquial, especialmente ganglios linfáticos mediastínicos. La ecobroncoscopia puede evitar así la realización de técnicas quirúrgicas más costosas e invasivas como la mediastinoscopia (5, 6).
3. *PAAF transesofágica y ecoendoscopia*: La ultrasonografía endoscópica (USE) combina la endoscopia con la ecografía para conseguir imágenes ecográficas de 360° desde el interior del tubo digestivo. La USE-PAAF juega un papel muy importante en el diagnóstico y la estadificación mediastínica del cáncer de pulmón. Tiene un fácil acceso a la mayoría de las estaciones ganglionares implicadas en el cáncer de pulmón y especialmente a aquellas en las que las demás técnicas tienen dificultades (ventana aortopulmonar, subcarinales, paraesofágicas). Tiene también una alta sensibilidad y especificidad incluso para adenopatías menores de 1 cm y, además, ofrece la posibilidad de obtener material citológico con una rentabilidad muy superior a las demás técnicas, con una morbilidad despreciable. La tasa de complicaciones se cifra en menos del 1%.
- Comparada con TAC, PET, mediastinoscopia y PAAF-TB, la USE-PAAF es la técnica más adecuada para la estadificación del cáncer de pulmón. Datos relativamente recientes demuestran que el uso combinado de la ultrasonografía endoscópica con punción (USE-PAAF) y la PAAF-EBUS podrá reemplazar definitivamente a métodos más invasivos en el diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón (7)

Manejo del material citológico para estudios moleculares

Un aspecto esencial en cualquier tipo de abordaje es el control *in situ* de las muestras por un citopatólogo con experiencia durante el procedimiento de punción, lo que se conoce como ROSE: "*Rapid on site evaluation*". En la medida de lo posible se recomienda este abordaje que, además de asegurar la calidad y cantidad óptimas de la muestra, permite prever los estudios complementarios necesarios y adecuar el material obtenido para asegurar un diagnóstico completo del cáncer de pulmón que incluye morfología, inmunocitoquímica y estudios moleculares. Además se evita gran porcentaje de falsos negativos por muestra inadecuada. Este protocolo de trabajo representa el manejo más adecuado de los pacientes evitando procedimientos invasivos innecesarios, y optimiza recursos y costes sanitarios (8, 6, 7).

Los mismos estudios complementarios de inmunocitoquímica, molecular y citometría de flujo que tradicionalmente se realizan en material fresco o parafinado se pueden realizar en material citológico. La clave es el correcto manejo de la muestra desde su obtención. En este sentido es fundamental la implicación y la experiencia de los técnicos de citología y los citopatólogos (9-11).

- *Inmunocitoquímica*: Cualquier anticuerpo puede ser analizado en muestras citológicas. La realización de bloques celulares en la medida de lo posible facilita estos estudios en el sentido de que al poder efectuar varios cortes se pueden testar varios anticuerpos. Sin embargo, en ausencia de bloque celular, estas técnicas se pueden realizar en extensiones citológicas fijadas en alcohol y teñidas con Papanicolaou. **NO** se recomienda desteñir las extensiones y más bien tener en cuenta el tratamiento de recuperación antigénica que en general es un poco más corto. La limitación obvia en casos en que no se dispone de bloque celular es el número de extensiones disponibles para estudios inmunocitoquímicos. Se recomiendan dos: TTF-1 y p40 / p63.

- *Estudios moleculares*: Cualquier muestra citológica correctamente obtenida y procesada es válida para estudios moleculares convencionales (extensiones teñidas, líquidos, bloques celulares, citología líquida, etc.). Nuestra experiencia personal favorece el uso de extensiones citológicas teñidas sobre las que se ha realizado el diagnóstico morfológico para estudios moleculares. De esta forma tenemos la certeza de que el porcentaje de tumor presente en la muestra es adecuado para ese análisis. Además el DNA se conserva mejor en fijadores alcohólicos. Se recomienda la microdissección manual en casos necesarios.

Un aspecto importante son las técnicas de FISH, en concreto la determinación de la presencia de las alteraciones de EML4/ALK y ROS1 en adenocarcinomas de pulmón. Estos estudios pueden realizarse en cortes de bloque celular, en material de citología líquida monocapa y en extensiones citológicas teñidas. En estas últimas es necesario delimitar una zona de la preparación donde las células no estén superpuestas para visualizar correctamente las señales nucleares y optimizar la cantidad de sonda. Una ventaja importante es que analizamos núcleos enteros sin pérdida de señales por efecto del corte.

Informe citopatológico

Al igual que en el informe de biopsia / pieza quirúrgica, mencionar:

1. Tipo de muestra: Especificar en qué material se realiza cada prueba -extensión, bloque, líquido, etc. En las PAAF, especificar la vía de obtención de la muestra.
2. Diagnóstico
3. Si procede: inmunocitoquímica, pruebas moleculares (PCR, FISH)*
4. Otras pruebas (Ej.: citometría)

*PCR:

1. Tipo de muestra (extensión, bloque, etc.)
2. Especificar si se realiza microdissección manual. Método de extracción de ADN y cantidad. Tipo de técnica (pirosecuenciación, tiempo real, etc.)
3. Resultado

*IHQ:

1. Tipo de muestra (extensión, bloque, etc.)
2. Anticuerpos utilizados y controles
3. Resultado

*FISH:

1. Tipo de muestra (extensión, bloque, líquida, etc.)
2. Tipo de sonda
3. Resultado

III. PROTOCOLO PARA EL ESTUDIO MACROSCÓPICO DE LAS PIEZAS QUIRÚRGICAS TUMORALES DE PULMÓN.

Mónica Saiz. Hospital Universitario de Cruces, Bilbao

Existen algunos ítems que deben ser obligatoriamente incluidos al realizar el estudio macroscópico de las piezas quirúrgicas tumorales de pulmón. A continuación se describe la adecuada preparación del espécimen y los criterios para la selección de bloques para inclusión.

Preparación de la pieza:

El tumor se localiza e identifica por palpación, bien se secciona a lo largo de las vías respiratorias principales, o bien se realizan múltiples cortes transversales o sagitales para seccionar y exponer el tumor de acuerdo con la preferencia del patólogo. La preparación difiere según la localización del tumor:

- Central: realizar corte longitudinal de la pared bronquial, desde el margen hasta el tumor (para identificar la relación de la neoplasia con la vía aérea) y secciones seriadas consecutivas.

- Periférico: realizar cortes paralelos de la lesión en relación a la pleura, a fin de localizar el punto de máxima infiltración o proximidad. Es muy recomendable pintar con tinta china la zona de pleura más próxima al tumor, antes de realizar las secciones.

En las neumonectomías hay que distinguir si la resección vascular se ha realizado en un plano intra-pericárdico o extra-pericárdico por la necesidad de examinar el tejido pericárdico (tumores T3 frente a T4). Estos datos, junto a los límites de la pleura mediastínica, es preferible que sean señalados por el cirujano.

Se deben identificar todas las estructuras implicadas por los tumores centrales y perihiliares. Una resección en bloque puede incluir porciones de pleura mediastínica, pericardio, grandes vasos o pared de la aurícula y todos ellos necesitan muestreo completo.

Para valorar márgenes bronquiales y vasculares, incluir los extremos cortados de los vasos ligados y los tejidos blandos adyacentes. Estas muestras deben tomarse antes de la sección del pulmón.

Toma de muestras de tejido, tumoral y no tumoral, para el Biobanco: está indicada sólo en tumores mayores de 1 cm, recordando siempre que la muestra de parénquima sano debe obtenerse antes de cortar el tumor (para evitar la contaminación). En neoplasias de localización periférica, se recomienda la toma mediante un corte oblicuo que no afecte la valoración de la pleura. El número de muestras dependerá del tamaño del tumor. La toma de muestras para el Biobanco no afecta la insuflación con formol (que puede llevarse a cabo tanto desde el límite bronquial como insuflando formol con jeringa de 20 ml el parénquima pulmonar).

Selección de los bloques para la inclusión:

1. Márgenes: bronquial, vascular, mediastínico o de la pared torácica.
2. Adenopatías hiliares e intraparenquimatosas (N1) / extrapulmonares / mediastínicos (N2/3)
3. Tumor:
 - Inclusión total en todos los tumores menores de 2 cm y en todos los que se sospeche adenocarcinoma *in situ* (lepídico), menor de 3 cm.
 - Más de 2 cm: idealmente un bloque por cm del diámetro máximo del tumor
 - Incluir: punto más próximo a la pleura, relación con la pared bronquial y con el pulmón circundante.
4. Resto del pulmón:
 - Lesiones secundarias o "segundas lesiones"
 - Pulmón macroscópicamente sano, alejado del tumor

IV. CONSIDERACIONES PRÁCTICAS PARA EL MANEJO DE LA BIOPSIA INTRAOPERATORIA

M^a Luz Plaza. Hospital Universitario de Gran Canaria, Dr. Negrín

La importancia de la biopsia intraoperatoria radica en que su diagnóstico puede modificar el acto quirúrgico. Como norma general se incluye para el estudio en congelación el área más sospechosa en la macroscopía, preservando tejido adecuado y suficiente para el diagnóstico definitivo.

Segmentectomía típica, atípica o resección del nódulo tumoral:

- Localizar el nódulo* a investigar: marcado por el cirujano, ayudados por la retracción pleural, mediante palpación y, en un segundo paso, mediante secciones seriadas perpendiculares al borde suturado una vez pintado éste.
- Pintar la línea de sutura con tinta china, cortar lo mas cerca del borde de grapas y volver a pintar el margen parenquimatoso (se puede hacer con diferente color e incluso prescindir de ello).
- Pintar la pleura en la zona de retracción si es necesario realizar el corte a ese nivel. Preservar al máximo el punto de retracción pleural para el estudio en parafina.

- Seccionar el nódulo en el punto más cercano al borde quirúrgico.
 - Medir el tamaño de la lesión y la distancia al margen quirúrgico más cercano (parenquimatoso).
 - Seleccionar la sección a congelar (si es posible incluir parénquima adyacente para evaluar si hay carcinoma *in situ* en la proximidad).
 - Cortes a 5 micras hasta llegar a un diagnóstico (si la sospecha de malignidad es muy alta será preciso realizar cortes a diferentes niveles e incluir otra zona de la lesión identificada macroscópicamente).
- * Los nódulos incidentales menores de 5 mm se deben reservar para su inclusión en parafina. En el caso de que su diagnóstico modifique el acto quirúrgico, se tomará en consideración su inclusión parcial cuidando no comprometer el diagnóstico definitivo.

Lobectomía o neumonectomía para margen quirúrgico:

- Examinar macroscópicamente el margen bronquial (el vascular y /o ganglionar).
- Seccionar transversalmente los 2-3 mm proximales del bronquio para incluir en congelación (evaluamos si es extensión mucosa directa, afectación peribronquial, vasculolinfática o incluso ganglionar).

Pleura para valoración de afectación metastásica o mesotelioma:

- Garantizar la recepción de material suficiente para el estudio definitivo.
- Examinar macroscópicamente e incluir la zona más sospechosa para estudio en congelación. En este contexto, la diferenciación de mesotelioma e hiperplasia mesotelial es muy difícil, al igual que entre metástasis de un carcinoma y un mesotelioma epitelioide, por lo que en muchas ocasiones se deberá diferir el diagnóstico.

Ganglio mediastínico para valoración de metástasis ganglionar:

Si el material consiste en un ganglio **completo**, se realiza una sección medial y se evalúa macroscópicamente el área a congelar. Si el ganglio viene **fragmentado**, se incluye una parte o porción de él. Si el corte de este primer fragmento es negativo, se continúan incluyendo los siguientes.

Otras consideraciones:

La citología en intraoperatoria (extensión o impronta) hace patente el artefacto característico del carcinoma de célula pequeña (no visible en corte en congelación), ayuda a evidenciar el pigmento melánico, es de utilidad diagnóstica ante la sospecha de linfoma y en ocasiones también en el estudio del borde de la sutura (parenquimatoso).

V. MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DE MAYOR UTILIDAD

Ignacio Aranda López, Hospital General Universitario de Alicante

Los nuevos tratamientos del cáncer de pulmón hacen necesaria una clasificación más precisa de sus subtipos histológicos, principalmente con referencia a la diferenciación entre adenocarcinoma (ACA) *versus* carcinoma de células escamosas (CCE). Considerando que aproximadamente 70% de los casos de carcinoma pulmonar no son operables, se obliga a un diagnóstico basado de forma casi exclusiva en tomas de biopsias o de citología (1). La nueva clasificación del ACA pulmonar ha introducido nuevos criterios y terminología aplicadas a los diagnósticos realizados sobre biopsias pequeñas y citologías, y recomiendan la aplicación de la inmunohistoquímica (IHQ) sólo para aquellos casos en que la subclasificación basada en criterios morfológicos de H&E sea insuficiente, ya que si bien el patólogo tiene la responsabilidad de emitir un diagnóstico correcto, también está en obligación de preservar el tejido suficiente que permita la realización de técnicas moleculares en caso necesario (1). El informe patológico debe dejar claramente establecido si el diagnóstico se ha basado únicamente en criterios morfológicos convencionales o si se apoya en técnicas complementarias de IHQ (1).

ACA versus CCE

En el contexto de ACA *versus* CCE los anticuerpos de mayor utilidad son TTF-1, Napsina, p40/p63 y CK5-6 (1,2,3,4,5). En general se considera que la positividad para TTF-1 y/o Napsina es orientativa de ACA (con una sensibilidad en torno al 85-90%), y la expresión de p40/p63 y/o CK5 lo es de CCE, positivo en más del 90% para estos marcadores (**Tabla 1**). Con la combinación de estos anticuerpos se consigue reclasificar como ACA o CCE más del 80% de los casos que no presentan signos de diferenciación con H&E (6), con una sensibilidad y especificidad de prácticamente 100% para el CCE, y una sensibilidad del 86% y especificidad del 100% para el ACA (5). La CK7, si bien es positiva en más del 95% de los ACA, se considera poco útil por su baja especificidad. Si bien algunas guías recomiendan la aplicación de únicamente dos marcadores IHQ (TTF1 y p40) (7), no existe consenso al respecto, y en casos seleccionados, algunos autores utilizan paneles de 4 o incluso 6 anticuerpos. Idealmente se debe preservar tejido para las determinaciones moleculares correspondientes.

Existen otros anticuerpos de uso emergente como desmogleina-3 (8) o HNF4 α (9) cuya utilidad diagnóstica está pendiente de confirmación. Una alternativa puede ser la utilización de métodos de doble tinción que permiten una mayor preservación de tejido (10). Los tumores diagnosticados en biopsias pequeña/citología con IHQ no orientativa deberán ser denominados "carcinoma pulmonar de célula no pequeña, tipo no especificado" (CPCNP-NE) (1), si bien recientemente se ha sugerido que su perfil clínico-patológico es superponible a los adenocarcinomas sólidos (11).

Adenocarcinomas mucinosos.

Los ACA-M constituyen aproximadamente un 5% de los ACA pulmonares, y son más frecuentes en mujeres no fumadoras. En torno al 50% presentan mutaciones en KRAS, y raramente en EGFR (3%). El principal diagnóstico diferencial que plantean es con ACA-M metastático de origen gastrointestinal. Los pulmonares son generalmente positivos para CK7 y negativos o sólo positivos de forma focal para CK20. En el contexto de ACA-M, disminuye la sensibilidad de TTF-1 y Napsina, cuya expresión es muy variable. Asimismo, CDX2 (anticuerpo relativamente específico y sensible en tracto gastrointestinal), puede presentar casos negativos o con positivities focales (5). Es importante no valorar como positivos para TTF-1 o Napsina la expresión de estos marcadores en elementos incluidos. El nuevo marcador HNF4 α parece ser altamente sensible y específico para el ACA-M pulmonar (8).

Carcinomas neuroendocrinos.

Los marcadores neuroendocrinos más utilizados son cromogranina, sinaptofisina y CD56 (5), sin embargo, 5-10% de los carcinomas de célula pequeña (CCP) y de los carcinomas neuroendocrinos de célula grande (CNECG) son negativos para estos tres marcadores. La expresión de CK7 y TTF1 es variable, con un 16% y 24% de positividad de los tumores carcinoides (TC), un 56% y 47% en los CNECG y un 25% y 86% en los CCP, respectivamente (5). El índice de proliferación celular con Ki-67 puede ser útil en el diagnóstico diferencial de estos tumores sobre biopsias pequeñas, ya que se sitúa en menos del 5% en los TC típicos, en menos del 10% para los atípicos y por encima del 50% en CNECG y en CCP. Los carcinomas NE suelen ser negativos para CK 5/6 (positividad focal en el 1%), y para Napsina (salvo el CNECG, positivo en el 10%).

En ocasiones, CPCNP-NE sin rasgos neuroendocrinos pueden presentar positivities focales para CD56 o para sinaptofisina ("CPCNP con diferenciación neuroendocrina"). Por el momento se desconoce si esta expresión presenta algún significado clínico (5).

Marcadores predictivos de respuesta.

Algunos estudios inmunohistoquímicos recientes parecen demostrar la utilidad de anticuerpos específicos de mutación en la evaluación del cáncer pulmonar. En relación con EGFR, los anticuerpos específicos de la mutación en el exón 19 presentan una sensibilidad del 100%, aunque es menor cuando las mutaciones se producen fuera de las "zonas calientes" (5).

Respecto a la traslocación EML4-ALK, el clon D5F3 (*Cell Signaling Technology/Ventana*) y el 5A4 (Abcam/Santa Cruz/Novocastra) muestran sensibilidades del 90-98% con el 85-100% de especificidad comparados con el ALK-FISH (11, 12).

El reordenamiento del gen ROS1 se ha descrito en el 1-2 % de los ACA pulmonares y se asocia con respuesta a inhibidores tirosin quinasa como Crizotinib®. Se ha demostrado que la evaluación IHQ con el clon D4D6 presenta una sensibilidad del 100% con una especificidad del 92% (13, 14). La IHQ de estos marcadores parece ser una herramienta prometedora para el screening de mutaciones en el cáncer pulmonar susceptible de tratamiento específico.

VI. ESTUDIO DE LAS PIEZAS DE RESECCIÓN TRAS LA NEOADYUVANCIA

Clara Salas. Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid

En oncología, la evaluación de la respuesta al tratamiento, así como predecir de forma correcta la supervivencia, son los factores clave para el control efectivo de la enfermedad, y a la vez, para diseñar y desarrollar futuros tratamientos. Múltiples estudios demuestran que en el cáncer de pulmón, al igual que en otros tumores humanos, la regresión tumoral tras la inducción está en relación con la supervivencia global (SG) y que es un factor pronóstico independiente.

Los estudios morfológicos en las piezas de resección de la cirugía torácica oncológica tras neoadyuvancia, se basan en las publicaciones pioneras de Junker y cols., de la ciudad alemana de Bochum (1-3), quienes han descrito los cambios que señalan la regresión tumoral inducida por el tratamiento y proponen el *sistema de clasificación de la regresión tumoral de Bochum*, el más seguido en todo el mundo, y que sirve de referencia para el resto de publicaciones (**Tabla 2**). Posteriormente se ha validado la importancia pronóstica de esta evaluación patológica en los diferentes tipos de carcinomas de célula no pequeña, estadios tumorales y tipos de tratamientos (radio y/o quimioterapia e incluso con los nuevos fármacos inhibidores tirosina quinasa (ITKs)). Los porcentajes de células tumorales viables residuales predicen la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad en los pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) reseccionados después de la quimioterapia neoadyuvante, incluso cuando se controla por el estadio patológico. Potencialmente podría tener un papel a añadir a la etapa patológica en la evaluación de pronóstico, respuesta a la quimioterapia, y la necesidad o no, de terapias adyuvantes adicionales (4)

En cuanto a la valoración de la respuesta del tumor mediante tomografía computarizada (TC) utilizando los Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST) se ha evidenciado una correlación con la supervivencia global en los pacientes con CPCNP después del tratamiento neoadyuvante y resección quirúrgica. Sin embargo, en comparación con la valoración histopatológica, la TC/RECIST no es un predictor tan fiable de la SG, por lo que tiene un papel limitado como criterio de valoración de eficacia después de quimioterapia neoadyuvante (5). En resumen:

- Los grados de regresión tumoral son un factor pronóstico independiente en el cáncer de pulmón avanzado.
- La respuesta histopatológica a la inducción se asocia con la SG y la SLE si el tumor muestra <10% de células tumorales viables.
- No hay correlación entre la regresión patológica y la radiológica. TC/ RECIST proporcionan sólo una evaluación macroscópica del tumor primario, lo que supone importantes implicaciones para los ensayos clínicos.
- El estudio histopatológico tras la neoadyuvancia podría ser un valor a añadir al estado patológico para clarificar la evolución pronóstica y la necesidad de otras terapias adyuvantes.

Consideraciones a tener en cuenta en el estudio macroscópico:

- Pieza quirúrgica
 1. Dimensiones del tumor macroscópicamente visible o medida de la induración-consolidación del lecho tumoral.

2. Cortes paralelos al diámetro mayor de la pieza con un espesor aproximado 1 cm para su fijación en formaldehído.
3. Tras la fijación, se procederá a la inclusión total del tumor, según la imagen macroscópica:
 - Si no se identifica regresión tumoral se incluyen cortes representativos (1 corte por cm).
 - Si en el estudio histológico con H&E de un nódulo, los cortes incluidos no contienen tumor viable, el nódulo debe ser incluido en su totalidad antes de emitir el diagnóstico de regresión completa.
- Inclusión de los ganglios (6)
 1. En presencia de tumor macroscópico: una o varias secciones son suficientes para demostrar el tumor y su posible extensión extranodal
 2. En la ausencia de crecimiento macroscópicamente detectable: se procederá a la inclusión total del ganglio.

VII. INFORME ANATOMO-PATOLÓGICO DE LA PIEZA QUIRÚRGICA

Luz Martín, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid.

El informe anatomopatológico es esencial para planificar adecuadamente el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón. Debe ser completo, incluir información sobre el diagnóstico y estadificación de la enfermedad y señalar cualquier otro dato que pueda influir en el pronóstico de la misma.

Considerando los protocolos internacionales más ampliamente aceptados (*CAP, Royal College of Pathologists of Australasia; Royal College of Pathologists of the United Kingdom*) se presenta una propuesta, a manera de lista de verificación, para el informe de piezas quirúrgicas pulmonares con patología tumoral. En él se incluyen datos *imprescindibles* (obligatorios) y otros *recomendados* (aquellos en que no existe evidencia científica suficiente de su utilidad pronóstica) (1)

DATOS OBLIGATORIOS

A. Información macroscópica

1. Tipo de resección: Segmentectomía / Lobectomía / Bilobectomía / Neumonectomía / Resección pulmonar atípica.
2. Lateralidad
3. Estructuras anatómicas adyacentes: No / Si (especificar)
4. Otras muestras: Ganglios linfáticos
5. Localización del tumor: Periferia/ Bronquio
6. Medida (diámetro máximo) (A)
7. Afectación del bronquio principal: distancia a carina (< o > 2 cm) (B)
8. Nódulos tumorales separados: Ausentes / Presentes (especificar número, localización: mismo lóbulo; distinto lóbulo ipsilateral; pulmón contralateral (C)
9. Atelectasia / Neumonía obstructiva: Ausente / presente (especificar extensión: todo el lóbulo / pulmón) (D)
10. Distancia al margen quirúrgico (E)

B. Información microscópica

1. Tipo histológico (OMS 2004- IASLC/ATS/ERS 2011) (F)
2. Múltiples nódulos (sincrónicos / metástasis) (C)
3. Respuesta a tratamiento adyuvante (si procede)
4. Menos del 10% de tumor residual viable
5. Más del 10% de tumor residual viable
6. Invasión de estructuras adyacentes: (pared torácica, diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, grasa mediastínica, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpos vertebrales)

7. Invasión linfovascular: Presente / Ausente / Indeterminada (G)
8. Margen quirúrgico bronquial: Negativo / Positivo (carcinoma infiltrante / carcinoma in situ) (H)
9. Margen quirúrgico vascular: Negativo / Positivo (H)
10. Otros márgenes quirúrgicos: especificar (H)
11. Ganglios linfáticos
 - Número de ganglios metastatizados / total (salvo si se reciben fragmentados)
 - Extensión extranodal: especificar
 - Región: especificar
12. Invasión de la pleura visceral: Sí / No (I)
13. Estadío patológico (TNM, 7ª ed.)

DATOS RECOMENDADOS / OPCIONALES

1. Datos morfológicos complementarios
 - Grado histológico (G1/G2/G3)
 - Marcadores inmunohistoquímicos
 - Resultados de estudios moleculares (EGFR, ALK)
 - Otros procesos neoplásicos (tumorlets, lesiones precursoras: hiperplasia adenomatosa atípica, hiperplasia neuroendocrina, displasia escamosa)
2. Enfermedad pulmonar no neoplásica (fibrosis pulmonar, neumoconiosis...)
3. Aspecto macroscópico de la pleura
4. Extensión de la infiltración pleural (PL0-PL3) (I)
5. Invasión perineural (J)
6. Necrosis/Mitosis (J)
7. Infiltrado inflamatorio peritumoral

BUENA PRÁCTICA

1. Descripción macroscópica
2. Identificación de bloques

COMENTARIOS

- A. *Tamaño del tumor*: Es esencial para la estadificación T. Debe medirse en fresco para evitar artefactos postfijación; en caso de neumonitis obstructiva adyacente, la medida se debe ajustar microscópicamente (1). Si hay múltiples tumores sincrónicos, la categoría T se establece en base al nódulo de mayor tamaño (2).
- B. *Afectación del bronquio principal*: Este elemento de estadificación sólo es aplicable en tumores centrales y en piezas de neumonectomía. Generalmente es imprescindible hacer correlación con la radiología y la información del cirujano sobre la distancia del tumor a la carina (1).
- C. *Nódulos tumorales separados*: Distinguir si se trata de tumores sincrónicos o metástasis, ya que la estadificación es diferente. Se consideran tumores **sincrónicos** cuando los nódulos tumorales tienen diferente histología o en caso de histología similar, cuando están en distintos lóbulos, segmentos o pulmones, si asocian carcinoma *in situ*, en ausencia de infiltración en vasos linfáticos y de metástasis extraganglionares (2). Recientemente se ha propuesto realizar un estudio histológico exhaustivo de los tumores (patrones morfológicos, porcentajes de los mismos, características del estroma), como un método adecuado para distinguir tumores sincrónicos de metástasis (3).
 En el contexto de tumores sincrónicos, se debe añadir el sufijo (m) a la pT, que corresponderá al nódulo de mayor tamaño. En caso de tumores **metastásicos**, la estadificación será pT3 si están en el mismo lóbulo, pT4 si se encuentran en distinto lóbulo ipsilateral y pM1 si se localizan en el pulmón contralateral (4).
- D. *Atelectasia / Neumonía obstructiva*: La presencia y extensión (todo el lóbulo o todo el pulmón) de atelectasia o neumonitis obstructiva influye en la categoría pT. Se observa en tumores centrales o con creci-

miento endobronquial. No siempre es fácilmente valorable en las piezas quirúrgicas, por lo que resulta útil correlacionarlo con las técnicas de imagen (1,4).

E. *Distancia al margen quirúrgico más próximo*: Parámetro importante para la planificación de tratamientos complementarios. Sólo es relevante cuando la distancia de éste al tumor se puede visualizar en una preparación histológica, en cuyo caso se debe medir sobre la misma (1).

F. *Tipo histológico*: Los tumores se deben clasificar según la clasificación OMS 2004 (5) a excepción del adenocarcinoma, que se debe categorizar según la clasificación IASLC/ATS/ERS (6). En lo posible, evitar el término "carcinoma de célula no pequeña" ya que es esencial clasificar adecuadamente los tumores para planificar el tratamiento quimioterápico más adecuado y para solicitar los estudios moleculares correspondientes, dada la asociación (principalmente del adenocarcinoma) con determinadas alteraciones genéticas (6-8).

- En casos de **adenocarcinoma**:

1. Adenocarcinoma mínimamente invasivo (MIA, por sus iniciales en inglés): medir el foco infiltrante de mayor tamaño con una regla sobre la preparación histológica, o bien se puede calcular según el porcentaje del componente infiltrante (7,9).
2. Adenocarcinomas infiltrantes: evaluación cuantitativa de los diferentes subtipos histológicos y clasificarlo según el tipo predominante (rangos de 5%) (6,7). Recientemente se ha propuesto que la medida del adenocarcinoma infiltrante predominantemente lepidico debe realizarse sobre el componente infiltrante, ya que existe una mejor correlación con el pronóstico, sobre todo en tumores en estadio I (7,9).
3. Subtipos histológicos asociados a mal pronóstico: sólido, micropapilar (10-12) y el recientemente descrito patrón acinar complejo y cribiforme (13, 14).

No existe una propuesta definitiva para la graduación de adenocarcinomas, aunque se han sugerido varias, utilizando diferentes parámetros, de forma aislada o combinados (grado histológico, mitosis, grado nuclear) (15,16).

- El **carcinoma de célula grande** es un diagnóstico de exclusión (5). Si con técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) se demuestra diferenciación escamosa o glandular, se debe indicar en un comentario (1). Algunos autores proponen estudios moleculares y de IHQ como métodos para reclasificar el carcinoma de célula grande. En la próxima clasificación de la OMS, la categoría de carcinoma de célula grande quedará reducida a un pequeño grupo de carcinomas indiferenciados (excluyendo el carcinoma de célula pequeña y el carcinoma pleomorfo/sarcomatoide), que no presentan un perfil IHQ que permita reclasificarlos como carcinoma escamoso, adenocarcinoma o carcinoma neuroendocrino de célula grande (17-20).

- En los **carcinomas neuroendocrinos** no se ha demostrado la utilidad de aplicar el sistema de graduación de los carcinomas neuroendocrinos del tracto gastrointestinal (21, 22). El estudio IHQ con Ki-67 en la pieza quirúrgica tiene un valor limitado (23).

G. *Invasión linfovascular*: Es un factor pronóstico independiente en el cáncer de pulmón pero no hay acuerdo sobre si la invasión venosa o arterial tiene valor pronóstico independiente de la invasión linfática, por lo que en el informe no es necesario especificarlo (1)

H. *Margen quirúrgico bronquial, vascular, otros*: El estado del margen quirúrgico influye en la planificación de tratamientos adyuvantes postoperatorios y es un factor pronóstico de la enfermedad. Se deben valorar los márgenes bronquial, vascular y parenquimatoso (en segmentectomías, cuñas o resecciones atípicas) así como aquellos indicados por el cirujano en el caso de resecciones en bloque.

Se considera margen bronquial o vascular positivo cuando el tumor está en la luz, íntimamente adherido a la pared y/o la está infiltrando. Hay controversia sobre la importancia pronóstica de la afectación aislada de los tejidos peribronquiales o de permeación linfática, o de la presencia sólo de tumor endoluminal. No obstante en el informe se debe indicar la naturaleza de la afectación del borde de resección (1).

La presencia de carcinoma *in situ* en el borde bronquial es rara en caso de carcinoma escamoso y aunque aparentemente no tiene influencia pronóstica, debe indicarse (24). No está clara la influencia de

afectación de margen por adenocarcinoma *in situ* en piezas de resección en cuña (24). Si en una pieza quirúrgica se encuentran márgenes positivos adicionales, se deben indicar en el informe, especificando la localización (1).

- I. *Invasión de la pleura visceral*: Constituye un factor pronóstico adverso independiente. Modifica el estadio T en tumores <3 cm. Para considerar invasión, el tumor debe rebasar la lámina elástica de la pleura visceral o extenderse a la superficie de la pleura visceral (25, 26). En los tumores en estrecho contacto con la pleura, el empleo de técnicas de orceína son de gran ayuda. En casos dudosos (tumores con fibrosis y elastosis, en los que no se perciben bien los límites con la pleura visceral, o piezas sin revestimiento pleural) evitar la sobre estadificación (2,27). No parece necesario especificar la extensión de la afectación de pleura visceral (PL0/PL1/PL2/PL3) (26, 27), aunque se puede detallar opcionalmente (1).
- J. *Invasión perineural, presencia de necrosis, mitosis*: No se ha demostrado que la invasión perineural, o la presencia de apoptosis o necrosis tenga influencia en el pronóstico de la enfermedad (1, 28).

VIII. BIOMARCADORES CON INTERÉS PREDICTIVO EN EL CARCINOMA DE PULMÓN

Esther Conde¹, Javier Gómez-Román², Fernando López-Ríos¹

(1) Laboratorio de Dianas Terapéuticas. Hospital Universitario HM Sanchinarro. Madrid

(2) Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha experimentado un cambio paradigmático en el conocimiento y manejo del cáncer de pulmón y, en particular, en el carcinoma de pulmón de célula no pequeña (CPCNP). A medida que los avances en el estudio de la biología molecular de estos tumores han conducido a la identificación de diferentes alteraciones genético-moleculares asociadas con su desarrollo, ha sido posible dividir los CPCNP en subgrupos genéticamente definidos de acuerdo con la frecuencia de dichas alteraciones (1-3). Estas alteraciones se están convirtiendo en marcadores de utilidad en el diagnóstico y en el establecimiento del pronóstico, así como en biomarcadores predictivos de eficacia a terapias dirigidas (4). La selección del tratamiento basado en marcadores moleculares predictivos ha modificado sustancialmente el enfoque clínico de los pacientes con un CPCNP y las líneas de investigación de los últimos años.

La respuesta a inhibidores tirosina quinasa (ITKs) en pacientes portadores de mutaciones en el gen *EGFR* representa uno de los mayores avances terapéuticos en el CPCNP de la última década (5-7). En el año 2007, la identificación de la translocación del *ALK* se sumó al listado de biomarcadores predictivos en el CPCNP (8). Hoy en día, ambas determinaciones se consideran esenciales en la práctica clínica a la hora de decidir las opciones terapéuticas de un paciente con carcinoma de pulmón, siendo además una información relevante en el diseño de ensayos clínicos prospectivos.

RECOMENDACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES EN EL CARCINOMA DE PULMÓN DE CÉLULA NO PEQUEÑA

Actualmente se debe realizar la determinación de las mutaciones en el gen *EGFR* y de los reordenamientos de *ALK* en todos los pacientes con CPCNP no escamoso estadio IV independientemente del hábito tabáquico y en los no fumadores independientemente de la histología en el momento de su diagnóstico, según las guías CAP/IASLC/AMP (*College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*) (9) y la reciente actualización del consenso nacional SEAP/SEOM (Sociedad Española de Anatomía Patológica y Sociedad Española de Oncología Médica) (10). Se recomienda tener los resultados en 7-10 días laborables desde la recepción de la muestra (9, 10).

TIPO DE MUESTRA ÓPTIMA Y GESTIÓN DE LA MISMA PARA EL ESTUDIO DE BIOMARCADORES

Respecto a la muestra óptima para el estudio molecular de biomarcadores, se recomienda utilizar muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. Una muestra obtenida por cirugía, broncoscopia o biopsia por punción es igual de válida siempre que tenga una cantidad suficiente de células tumorales. Las muestras citológicas (bloques celulares, extensiones citológicas teñidas o preparaciones en base líquida) se consideran adecuadas, prefiriéndose los bloques celulares (9-11). Se considera fundamental revisar todas las muestras tumorales (tanto biopsias como citologías) de un paciente a la hora de decidir sobre cuál se van a realizar los estudios de biomarcadores (10, 12).

Con el objetivo de tratar de garantizar tanto el diagnóstico anatomopatológico como la determinación de múltiples biomarcadores predictivos se recomiendan protocolos de aprovechamiento tisular (10, 13). La secuencia de pasos que se propone es la siguiente: (i) realizar una sección inicial teñida con hematoxilina-eosina (H&E) para obtener el diagnóstico anatomopatológico y programar (sólo si la diferenciación glandular o escamosa no es evidente) 2 cortes para la realización de las pruebas inmunohistoquímicas (TTF-1 y p40); (ii) efectuar una serie de cortes para la extracción de ADN (el número y el grosor de los mismos depende del protocolo de extracción de ADN de cada laboratorio, pudiéndose realizar a partir de una sola sección de 5 micras) y llevar a cabo el estudio de las mutaciones de *EGFR*; (iii) realizar 1-2 cortes para realizar las técnicas de determinación de *ALK*; y por último, (iv) efectuar una sección teñida con H&E para comprobar la presencia de células tumorales (Figura 1) (10).

Se recomienda determinar *EGFR* y *ALK* de forma simultánea. En los casos en los que no sea posible, se aconseja realizar las secciones para ambos biomarcadores al mismo tiempo, aunque el estudio de uno de ellos se active solo en el caso de que el otro haya sido negativo (10).

MUTACIONES DE *EGFR*

Las mutaciones en el gen *EGFR* se identifican en aproximadamente el 10-16% de los CPCNP en nuestro medio, siendo más frecuentes en adenocarcinomas (AC) de patrón lepidico, papilar o micropapilar, y en pacientes no fumadores (5-7, 14-17). Las mutaciones más frecuentes y que se relacionan directamente con sensibilidad al tratamiento con inhibidores específicos afectan al exón 19, tratándose de deleciones que conservan la pauta de lectura (*in-frame deletions*) entre los codones 746 y 759 (45-50%), seguidas de mutaciones puntuales tipo "cambio de sentido" (*missense point mutations*) en el exón 21 [sustitución del aminoácido leucina por arginina en la posición 858 (L858R)] (35-45%). Otras mutaciones sin clara relación con la respuesta a fármacos inhibidores específicos comprenden inserciones y/o duplicaciones en el exón 20 y mutaciones puntuales en el exón 18 (5-7).

En relación a la metodología, las pruebas clínicas para la determinación de *EGFR* deben ser capaces de detectar todas las mutaciones individuales que han sido informadas con una frecuencia de al menos un 1% de los AC de pulmón *EGFR* mutados (9, 10). Se recomienda utilizar, siempre que sea posible, un método de alta sensibilidad como los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real cobas *EGFR* Mutation Test (CE-marked, Roche Molecular Systems) o theascreen *EGFR* RGQ PCR Kit (CE-marked, Qiagen). Asimismo, se aconseja sólo utilizar la secuenciación directa cuando el porcentaje tumoral sea de al menos un 30% (10, 12, 18). En cuanto a los informes de los resultados, se deben especificar las mutaciones que han sido detectadas y la sensibilidad de los métodos de detección utilizados (9, 10).

REORDENAMIENTOS DE *ALK*

La presencia de la translocación de *ALK* se identifica en el 3-10% de los CPCNP (19, 20), siendo más frecuente en AC de patrón cribiforme o con células "en anillo de sello", en estadios avanzados, pacientes más jóvenes y con escasa o nula historia de tabaquismo (21). La translocación de *ALK* no suele coexistir con las mutaciones de *EGFR* (3).

En cuanto a la metodología disponible, se recomienda su determinación mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas de rotura con color dual (9), como por ejemplo la sonda comercial Vysis® *ALK* Break-Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Inc.), única prueba aprobada por la *Food and Drug*

Administration (FDA) hasta la fecha, si bien existen otras sondas en el mercado disponibles en la actualidad. A este respecto es interesante destacar que un escáner de FISH ha recibido recientemente aprobación por la FDA para la interpretación de esta sonda de ALK (10, 22). Por otra parte, la inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpos con alta sensibilidad, como por ejemplo D5F3 (Ventana) y 5A4 (Novocastra), se propone como método de cribado previo a la confirmación con el método FISH (9, 10, 23). La mayor parte de las series publicadas muestran una concordancia muy elevada entre ambas técnicas (24-26), si bien existen falsos positivos y negativos con ambas metodologías. Como regla práctica, se recomienda realizar dos métodos de estudio cuando existan incertidumbres como, por ejemplo: una dudosa respuesta al tratamiento de un caso informado como positivo, las determinaciones en los carcinomas escamosos, una tinción inmunohistoquímica no claramente granular, patrones atípicos del FISH (polisomías, amplificaciones, duplicaciones, monosomías) o resultados "borderline" por FISH (10, 27). En cuanto a la técnica molecular de RT-PCR, si bien puede mostrar una sensibilidad y especificidad adecuada, no se recomienda (9).

OTROS BIOMARCADORES

Los continuos avances en el campo de la biología molecular están permitiendo la identificación de nuevos y potenciales biomarcadores predictores de eficacia a determinados fármacos, especialmente en AC de pulmón, tales como: mutaciones de *KRAS*, *BRAF* y *HER2*; reordenamientos de *ROS1*, *RET* y *NTRK1*; y amplificación de *MET* y *HER2*, entre otros (1-4).

En carcinomas escamosos, algunos potenciales biomarcadores de interés son: mutaciones o amplificación de *PI3KCA*, amplificación de *FGFR1* o mutaciones de *DDR2* (2, 28).

Por último, un campo prometedor en el tratamiento del cáncer de pulmón que está emergiendo es la inmunoterapia, con la expresión de PD-L1 como posible biomarcador inmune (29, 30).

BIBLIOGRAFÍA

PAAF en pulmón: Métodos de abordaje y manejo de muestras para estudios moleculares

1. Geraghty PR, et al. CT-guided transthoracic needle aspiration biopsy of pulmonary nodules: needle size and pneumothorax rate. *Radiology* 2013; 229:475-81.
2. Wallace MB, Pascual JM, Raimondo M, Woodward TA, McComb BL, Crook JE, Johnson MM, Al-Haddad MA, Gross SA, Pungpapong S, Hardee JN, Odell JA. Minimally invasive endoscopic staging of suspected lung cancer. *JAMA* 2008; 299:540-6.
3. Odrionic SI, Gildea TR, Chute DJ. Electromagnetic navigation bronchoscopy-guided fine needle aspiration for the diagnosis of lung lesions. *Diagn Cytopathol* 2014; 42:1045-50.
4. Seijo LM, de Torres JP, Lozano MD, Bastarrika G, Alcaide AB, Lacunza MM, Zulueta JJ. Diagnostic yield of electromagnetic navigation bronchoscopy is highly dependent on the presence of a bronchus sign on CT imaging: Results from a prospective study. *Chest* 2010; 138:1316-21.
5. Harris CL, Toloza EM, Klapman JB, Vignesh S, Rodriguez K, Kaszuba FJ. Minimally invasive mediastinal staging of non-small-cell lung cancer: emphasis on ultrasonography-guided fine-needle aspiration. *Cancer Control* 2014; 21:15-20.
6. Collins BT, Chen AC, Wang JF, Bernadt CT, Sanati S. Improved laboratory resource utilization and patient care with the use of rapid on-site evaluation for endobronchial ultrasound fine-needle aspiration biopsy. *Cancer Cytopathol* 2013; 121:544-51.

7. Fassina A, Corradin M, Zardo D, Cappellesso R, Corbetti F, Fassan M. Role and accuracy of rapid on-site evaluation of CT-guided fine needle aspiration cytology of lung nodules. *Cytopathology* 2011;22:306-12.
8. Lozano MD, Zulueta JJ, Echeveste JI, Gúrpide A, Seijo LM, Martín-Algarra S, Del Barrio A, Pio R, Idoate MA, Labiano T, Pérez-Gracia JL. Assessment of epidermal growth factor receptor and K-ras mutation status in cytological stained smears of non-small cell lung cancer patients; correlation with clinical outcomes. *Oncologist* 2011;16:877-85.
9. Lozano MD, Labiano T, Zudaire MI, et al. Usefulness of cytological samples (CS) for the assessment of ALK rearrangements in non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2012;30:Abstract e18008
10. MD Lozano, T Labiano, I Zudaire, JC Subtil, A Gúrpide, JI Echeveste, JJ Zulueta, S Martín-Algarra, JL Pérez-Gracia. Variations in molecular profile in NSCLC can be analyzed using cytological samples: development of EGFR resistance mutations and coexistence of ALK-EML4 translocation in an EGFR sensitive patient. *Int J Surg Pathol* 2014. In press.
11. Lozano MD, Labiano T, Echeveste J, Gúrpide A, Martín-Algarra S, Zhang G, Sharma A, Palma JF. Assessment of EGFR and KRAS mutation status from FNAs and core-needle biopsies of nonsmall cell lung cancer. *Cancer Cytopathol.* 2014 Dec 19. In press

Protocolo para el estudio macroscópico de piezas quirúrgicas tumorales de pulmón:

1. Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A. *AJCC Cancer staging handbook*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010: 111-122

Consideraciones prácticas para el manejo de la biopsia intraoperatoria:

1. Allen TC, Cagle PT. *Frozen section library: lung*. Springer. 2009
2. Gordon IO, Suzue K, Husain AN. Lung, mediastinum and pleura in *Biopsy interpretation: the frozen section*. Lippincot Williams & Wilkins. 2010.
3. Gupta R, Dastane A, McKenna RJ Jr, Marchevsky AM. What can we learn from the errors in the frozen section diagnosis of pulmonary carcinoid tumors? An evidence-based approach. *Hum Pathol.* 2009 Jan;40(1):1-9.
4. Koike T, Togashi K, Shirato T et al. Limited resection for noninvasive bronchioloalveolar carcinoma diagnosed by intraoperative pathologic examination. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1106 – 11.
5. Lardinois D. Pre- and intra-operative mediastinal staging in non-small-cell lung cancer. *Swiss Med Wkly.* 2011 Mar 8;141-47.
6. Marchevsky AM, Changsri C, Gupta I et al. Frozen section diagnoses of small pulmonary nodules: Accuracy and Clinical Implications. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1755– 60.
7. Owen RM, Force SD, Gal AA et al. Routine intraoperative frozen section analysis of bronchial margins is of limited utility in lung cancer resection. *Ann Thorac Surg.* 2013 Jun;95(6):1859-65.
8. Sienko A, Allen TC, Zander DS, Cagle PT. Frozen sections of lung specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 2005; 129(12):1602-1609.

9. Van Schil PE, Asamura H, Rusch VW et al. Surgical implications of the new IASLC/ATS/ERS adenocarcinoma classification. *Eur Respir J.* 2012 Feb;39(2):478-86.
10. Walts AE, Marchevsky AM. Root Cause analysis of problems in the frozen section diagnosis of in situ, minimally invasive, and invasive adenocarcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136:1515-1521.
11. Xu X, Chung JH, Jheon S et al. The accuracy of frozen section diagnosis of pulmonary nodules: evaluation of inflation method during intraoperative pathology consultation with cryosection. *J Thorac Oncol.* 2010 Jan;5(1):39-44.
12. Guías de los colegios de patólogos americanos, ingleses y de Australasia. (Referencias incluidas en los apartados de macro y de micro)

Marcadores inmunohistoquímicos de mayor utilidad:

1. Travis, W.D, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/ European Respiratory Society classification. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2013; 137, 668–84.
2. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimen: utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK 5-6. *Am J Surg Pathol* 2011; 25: 15-25.
3. Bishop, J. a et al. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod. Pathol.* 2012; 25, 405–15.
4. Whithaus K, Fukoaka J, Prihoda TJ, Jagirdar J. Evaluation of napsin A, cytokeratin 5/6, p63, and thyroid transcription factor 1 in adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 155-62.
5. Zhang, K., Deng, H. & Cagle, P.T. Utility of immunohistochemistry in the diagnosis of pleuropulmonary and mediastinal cancers: a review and update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2014; 138, 1611–28.
6. Tacha D, Yu C, Bremer R, et al. A 6-antibody panel for the classification of lung adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20: 201-7.
7. López-Ríos F, de Castro J, Concha A, Garrido P, Gómez-Román J, Isla D, et al. Actualización de las recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el carcinoma de pulmón avanzado de célula no pequeña. *Rev Esp Patol* 2015 (en prensa).
8. Monica, V, Ceppi P, Righi L, et al.. Desmocollin-3: a new marker of squamous differentiation in undifferentiated large-cell carcinoma of the lung. *Mod. Pathol* 2009; 22, 709–17.
9. Sugano M, Nagasak T, Sasaki E, et al. HNF4 α as a marker for invasive mucinous adenocarcinoma of lung. *A, J Surg Pathol* 2013; 27: 211-8.
10. Brown AF, Sirohi D, Fukoaka J, et al. Tissue-preserving antibody cocktails to differentiate primary squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and small cell carcinoma of lung. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 1274-81.

11. Hwang DH, Szeto DP, Perry AS, et al. Pulmonary large cell carcinoma lacking squamous differentiation is clinicopathologically indistinguishable form solid-subtype adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 138: 626-35.
12. 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* 9(9): e107200. doi:10.1371/journal.pone.0107200
13. Selinger CI, Rogers TM., Russel PA, et al. Testing of ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicentre comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2013; 26: 1545-53.
14. Yoshida, A. et al. Immunohistochemical detection of ROS1 is useful for identifying ROS1 rearrangements in lung cancers. *Mod. Pathol* 2014; 27, 711–20.

Estudio de las piezas de resección tras la neoadyuvancia:

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29
2. Junker K, Thomas M, Schulmann K, Klinker V, Bosse U, Müller KM. Regression grading of neoadjuvant non-small-cell lung carcinoma treatment. *Pathologe*. 1997 Mar; 18(2):131-40.
3. Junker K, Langner K, Klinker F, Bosse U, Thomas M. Grading of tumor regression in non-small cell lung cancer: morphology and prognosis. *Chest*. 2001 Nov; 120(5):1584-91.
4. Junker K. Therapy-induced tumor regression and regression grading in lung cancer. *Pathologe*. 2014 Nov; 35(6):574-7.
5. Pataer A1, Kalhor N, Correa AM, Raso MG, Erasmus JJ, Kim ES, Behrens C, Lee JJ, Roth JA, Stewart DJ, Vaporciyan AA, Wistuba II, Swisher SG; University of Texas M. D. Anderson Lung Cancer Collaborative Research Group. Histopathologic response criteria predict survival of patients with resected lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Thorac Oncol*. 2012 May; 7(5):825-32.
6. William WN Jr, Pataer A, Kalhor N, Correa AM, Rice DC, Wistuba II, Heymach J, et al. University of Texas M.D. Anderson Lung Cancer Collaborative Research Group. Computed tomography RECIST assessment of histopathologic response and prediction of survival in patients with resectable non-small-cell lung cancer after neoadjuvant chemotherapy. *J Thorac Oncol*. 2013 Feb; 8(2):222-8
7. Junker K. Histopathologic evaluation of mediastinal lymph nodes in lung cancer. *Lung Cancer*. 2004 Aug; 45 Suppl 2:S79-83. Review.

Informe anatomopatológico de la pieza quirúrgica:

1. Jones KD, Churg A, Henderson DW, Hwang DM, Ma Wyatt J, Nicholson AG, Rice AJ, Washington MK, Butnor KJ. Data set for reporting of lung carcinomas: recommendations from International Collaboration on Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Aug; 137(8):1054-62.
2. Martini M, Melamed MR. Multiple primary lung cancers. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1975;70(4):606-612.

3. Girard N, Deshpande C, Lau C, Finley D, Rusch V, Pao W, Travis WD. Comprehensive histologic assessment helps to differentiate multiple lung primary nonsmall cell carcinomas from metastases. *Am J Surg Pathol*. 2009 Dec;33(12):1752-64.
4. Edge, S., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A. *AJCC Cancer staging handbook*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010: 111-122
5. Travis WT, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC: *World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics. Tumors of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon, France: IARC Press; 2004
6. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011 Feb; 6(2):244-85.
7. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 May; 137(5):685-705.
8. Cagle PT, Allen TC, Dacic S. et al.- Revolution in lung cancer: new challenges for the surgical pathologist. *Arch Pathol Lab Med*. 2011 Jan;135(1):110-6.
9. Kadota K, Villena-Vargas J, Yoshizawa A, Motoi N, Sima CS, Riely GJ, Rusch VW, Adusumilli PS, Travis WD. Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol*. 2014 Apr;38(4):448-60.
10. Solis LM, Behrens C, Raso MG, Lin HY, Kadara H, Yuan P, Galindo H, Tang X, Lee JJ, Kalhor N, Wistuba II, Moran CA. Histologic patterns and molecular characteristics of lung adenocarcinoma associated with clinical outcome. *Cancer*. 2012 Jun 1;118(11):2889-99.
11. Cha MJ, Lee HY, Lee KS, Jeong JY, Han J, Shim YM, Hwang HS. Micropapillary and solid subtypes of invasive lung adenocarcinoma: clinical predictors of histopathology and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Mar;147(3):921-928.
12. Hwang I, Park KU, Kwon KY. Modified histologic classification as a prognostic factor in pulmonary adenocarcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2014 May;22(3):212-20.
13. Moreira AL, Joubert P, Downey RJ, Rekhtman N. Cribriform and fused glands are patterns of high-grade pulmonary adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2014 Feb;45(2):213-20.
14. Wang C, Durra HY, Huang Y, Manucha V. Interobserver reproducibility study of the histological patterns of primary lung adenocarcinoma with emphasis on a more complex glandular pattern distinct from the typical acinar pattern. *Int J Surg Pathol*. 2014 Apr;22(2):149-55.
15. Sica G, Yoshizawa A, Sima C: A Grading System of Lung Adenocarcinomas Based on Histologic Pattern is Predictive of Disease Recurrence in Stage I Tumors. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1155–1162
16. Xu L, Tavora F, Burke A. Histologic features associated with metastatic potential in invasive adenocarcinomas of the lung. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jul;37(7):1100-8.

17. Rossi G, Mengoli MC, Cavazza A, Nicoli D, Barbareschi M, Cantaloni C, Papotti M, Tironi A, Graziano P, Paci M, Stefani A, Migaldi M, Sartori G, Pelosi G. Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch.* 2014 Jan;464(1):61-8.
18. Kerr KM. Pulmonary Pathology: SY22-1 Update on large cell carcinomas of the lung. *Pathology.* 2014 Oct;46 Suppl 2:S39
19. Pelosi G, Barbareschi M, Cavazza A, Graziano P, Rossi G, Papotti M. Large cell carcinoma of the lung: A tumor in search of an author. A clinically oriented critical reappraisal. *Lung Cancer.* 2015 Jan 17. pii: S0169-5002(15)00066-5.
20. Hwang DH, Szeto DP, Perry AS, Bruce JL, Sholl LM. Pulmonary large cell carcinoma lacking squamous differentiation is clinicopathologically indistinguishable from solid-subtype adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 May;138(5):626-35.
21. Pelosi G, Papotti M, Rindi G, Scarpa A. Unraveling tumor grading and genomic landscape in lung neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol.* 2014 Jun;25(2):151-64.
22. Rindi G, Klersy C, Inzani F, Fellegara G, Ampollini L, Ardizzoni A, Campanini N, Carbognani P, De Pas TM, Galetta D, Granone PL, Righi L, Rusca M, Spaggiari L, Tiseo M, Viale G, Volante M, Papotti M, Pelosi G. Grading the neuroendocrine tumors of the lung: an evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer.* 2013 Dec 16;21(1):1-16.
23. Pelosi G, Rindi G, Travis WD, Papotti M. Ki-67 antigen in lung neuroendocrine tumors: unraveling a role in clinical practice. *J Thorac Oncol.* 2014 Mar;9(3):273-84.
24. Vallières E, Van Houtte P, Travis WD, Rami-Porta R, Goldstraw P; International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) International Staging Committee. Carcinoma in situ at the bronchial resection margin: a review. *J Thorac Oncol.* 2011 Oct;6(10):1617-23
25. Shimizu K, Yoshida J, Nagai K, et al. Visceral pleural invasion classification in non-small cell lung cancer: a proposal on the basis of outcome assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(6):1574-1578.
26. Travis WD, Brambilla E, Rami-Porta R, et al. Visceral pleural invasion: pathologic criteria and use of elastic stains: proposal for the 7th edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008;3(12):1384-1390.
27. Dacic S. Dilemmas in lung cancer staging. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Oct;136(10):1194-7.
28. Gkogkou C, Frangia K, Saif MW, Trigidou R, Syrigos K. Necrosis and apoptotic index as prognostic factors in non-small cell lung carcinoma: a review. *Springerplus.* 2014 Mar 1;3:120.

Biomarcadores con interés predictivo en el carcinoma de pulmón:

1. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011; 12:175-80.
2. Oxnard GR, Binder A, Jänne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:1097-104.

3. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511:543-50.
4. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, Varella-Garcia M, Franklin WA, Aronson SL, Su PF, Shyr Y, Camidge DR, Sequist LV, Glisson BS, Khuri FR, Garon EB, Pao W, Rudin C, Schiller J, Haura EB, Socinski M, Shirai K, Chen H, Giaccone G, Ladanyi M, Kugler K, Minna JD, Bunn PA. Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs. *JAMA* 2014;311:1998-2006.
5. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101:13306-11.
6. 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.
7. Paez JG, Jänne 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.
8. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, Mano H. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
9. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:828-60.
10. Felip E, Concha A, de Castro J, Gómez-Román J, Garrido P, Ramírez J, Isla D, Sanz J, Paz-Ares L, López-Ríos F. Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* 2015 Feb;17(2):103-12. DOI: 10.1007/s12094-014-1248-9.
11. Vidal J, Clavé S, de Muga S, González I, Pijuan L, Gimeno J, Remón J, Reguart N, Viñolas N, Gironés R, Bernet L, Majem M, Bosch-Barrera J, Porta R, Alonso N, Palmero R, Taus A, Albanell J, Espinet B, Salido M, Arriola E. Assessment of ALK status by FISH on 1000 Spanish non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2014;9:1816-20.
12. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, O'Byrne K, Stahel R, Peters S, Felip E; Panel Members; Panel Members. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014;25:1681-90.
13. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Paz-Ares L, Belda-Iniesta C, Hidalgo M, et al. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clin Transl Oncol* 2013;15:503-8.
14. Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, López-Encuentra A, et al. Molecular context of the epidermal growth factor receptor mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 710-17.

15. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 633-39.
16. Motoi N, Szoke J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW, et al. Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 810-27.
17. Angulo B, Conde E, Suárez-Gauthier A, Plaza C, Martínez R, et al. A comparison of EGFR mutation testing methods in lung carcinoma: direct sequencing, real-time PCR and immunohistochemistry. *PLoS One* 2012; 7: e43842.
18. EGFR-TK mutation testing in adults with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. NICE diagnostics guidance 9. Available at: <http://guidance.nice.org.uk/nicemedia/live/14251/64893/64893.pdf> (Accessed May 2014).
19. 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.
20. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Muñoz L, Suárez-Gauthier A, Plaza C, et al. The ALK Translocation in Advanced NSCLCs: Pre-approval Testing Experience at a Single Cancer Center. *Histopathology* 2013;62:609-16.
21. Fan L, Feng Y, Wan H, Shi G, Niu W. Clinicopathological and demographical characteristics of non-small cell lung cancer patients with ALK rearrangements: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e100866.
22. FDA clears BioView Duet™ system for automated ALK FISH scanning of lung cancer tissue specimens. Available at: http://www.bioview.co.il/htmls/page_70.aspx?c0=12677&bsp=12624 (Accessed June 2014).
23. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, ElMBERGER G, Kerr K, Lopez-Rios F, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations. *Virchows Arch* 2012;461:245-57.
24. Conde E, Suárez-Gauthier A, Benito A, Garrido P, García-Campelo R, Biscuola M, Paz-Ares L, Hardison D, de Castro J, Camacho MC, Rodriguez-Abreu D, Abdulkader I, Ramirez J, Reguart N, Salido M, Pijuán L, Arriola E, Sanz J, Folgueras V, Villanueva N, Gómez-Román J, Hidalgo M, López-Ríos F. 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:e107200.
25. Wynes MW, Sholl LM, Dietel M, SchuurinG E, Tsao MS, Yatabe Y, et al. An international interpretation study using the ALK IHC antibody D5F3 and a sensitive detection kit demonstrates high concordance between ALK IHC and ALK FISH and between evaluators. *J Thorac Oncol* 2014;9:631-8.
26. Zwaenepoel K, Van Dongen A, Lambin S, Weyn C, Pauwels P. Detection of ALK expression in NSCLC with ALK-gene rearrangements - comparison of multiple IHC methods. *Histopathology* 2014;65:539-48.
27. Conde E, Taniere P, Lopez-Rios F. The anaplastic lymphoma kinase testing conundrum. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15:161-3.

28. Drilon A, Rekhtman N, Ladanyi M, Paik P. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *Lancet Oncol* 2012;13:e418-26.
29. Forde PM, Kelly RJ, Brahmer JR. New strategies in lung cancer: translating immunotherapy into clinical practice. *Clin Cancer Res* 2014;20:1067-73.
30. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515:563-7.

Tabla 1. Marcadores inmunohistoquímicos habitualmente utilizados en el diagnóstico de adenocarcinoma (ACA) y del carcinoma de células escamosas (CCE) pulmonar.

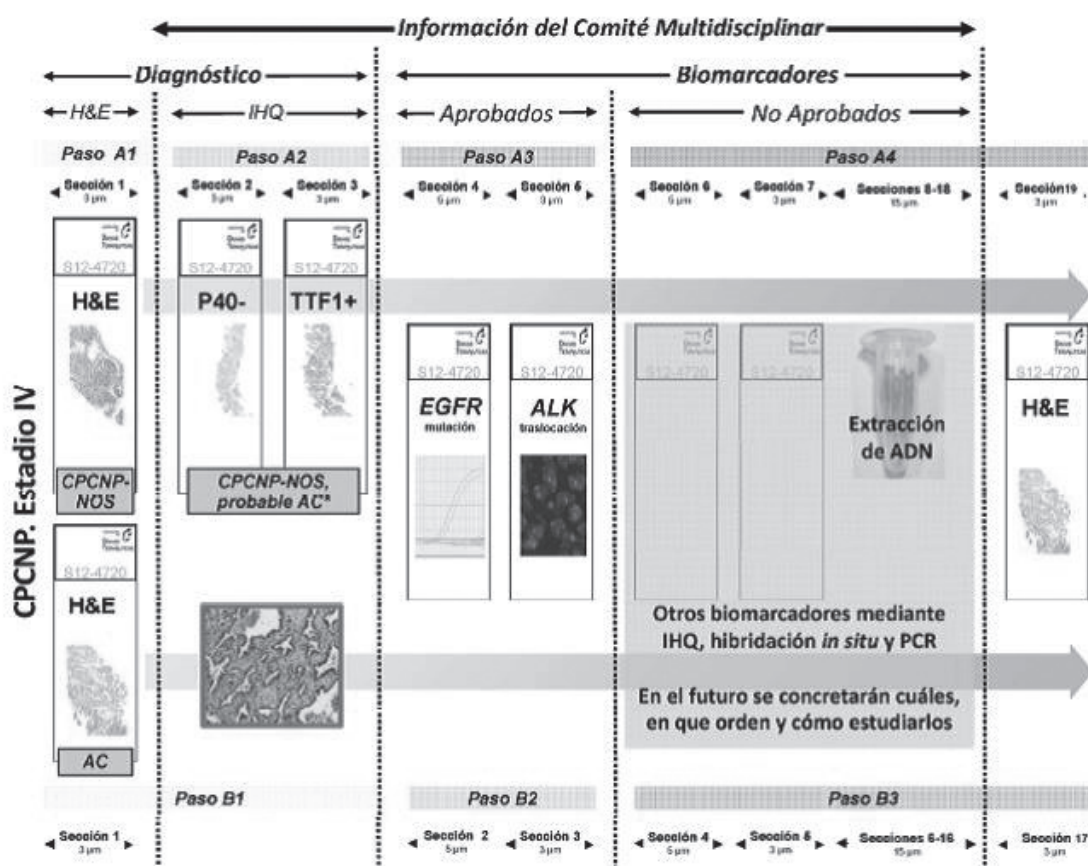
Anticuerpo	Tipo histológico	% positividad	Observaciones
TTF-1	ACA	80	Negativo en mucinosos Positivo carcinomas extrapulmonares
Napsina	ACA	80-85	Negativo en mucinosos Positivo carcinomas extrapulmonares
CK-7	ACA	95-100	Positiva en 10-15% CCE
P63	CCE	>90	Positiva en 20% de ACA
P40	CCE	99-100	Positiva en 7-8% de ACA
CK 5-6	CCE	80	Positiva en 5% de ACA

Tabla 2. Sistema de clasificación de la regresión tumoral

Grado 1	No hay respuesta, o sólo espontánea
Grado 2 A	Más del 10% del tumor viable
Grado 2 B	Menos del 10% del tumor viable
Grado 3	Respuesta completa

* El porcentaje de la necrosis inducida por el tratamiento se debe estimar microscópicamente

Figura 1. Protocolo para el estudio de biomarcadores en muestras de pacientes con CPCNP avanzado (Tomada de Clin Transl Oncol 2014, a su vez modificada de Clin Transl Oncol 2013;15: 503-508).



La ruta superior (A) es para casos que requieran IHQ clasificatoria. La ruta inferior (B) se aplicaría en muestras en donde no es necesario este paso, al objetivarse claramente diferenciación glandular con la H&E.

AC: adenocarcinoma; ADN: ácido desoxirribonucleico; ALK: kinasa del linfoma anaplásico; CPCNP: carcinoma de pulmón de célula no pequeña; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; H&E: hematoxilina-eosina; IHQ: inmunohistoquímica; NOS: (de tipo) no especificado; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.