



REVISIÓN

Recomendaciones para la determinación de las mutaciones del gen *EGFR* en el carcinoma de pulmón no microcítico[☆]

Jesús García-Foncillas^a, Pilar Garrido^b, Javier Gómez^c, José Palacios^{d,*} y Miquel Tarón^e

^a Servicio de Oncología Médica y Radioterapia, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona, España

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

^c Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España

^d Unidad de Gestión Clínica de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Instituto de Biomedicina de Sevilla-IBIS, Sevilla, España

^e Laboratorio del Servicio de Oncología Médica del ICO, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

Recibido el 28 de enero de 2011; aceptado el 10 de febrero de 2011

Disponible en Internet el 21 de marzo de 2011

PALABRAS CLAVE

Cáncer de pulmón;
Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR);
Determinación de mutaciones;
Inhibidores de la tirosina cinasa

KEYWORDS

Lung cancer;
Epidermal growth factor receptor (EGFR);

Resumen Existen múltiples estudios que han demostrado el importante papel que la vía de señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) posee en el desarrollo del carcinoma pulmonar no microcítico. Este hecho queda reforzado además por el descubrimiento de que las mutaciones en dicho receptor se comportan como elemento predictivo de respuesta a los fármacos inhibidores de la actividad tirosina cinasa.

En España la determinación molecular de las mutaciones de *EGFR* está siendo realizada en muy pocos centros o en el contexto de ensayos clínicos. Sin embargo, la terapéutica del carcinoma pulmonar no microcítico requiere hoy en día la necesidad de realizar el diagnóstico de mutación de manera estandarizada y generalizada, por lo que resulta necesario que los servicios de anatomía patológica ofrezcan dicha determinación dentro de la rutina asistencial.

Esta revisión propone unas recomendaciones generales para estandarizar la determinación de las mutaciones de *EGFR*, exponer los diferentes métodos técnicos con sus características y los aspectos clínicos que tienen interés a la hora de implantar la determinación molecular de *EGFR* en la asistencia diaria.

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

Guidelines for *EGFR* gene mutations testing in non-small cell lung carcinoma

Abstract Multiple biological studies have demonstrated the important role of the signalling pathway mediated by the epidermal growth factor receptor (EGFR) in the pathogenesis of many lung cancers. In the last decade, several molecular, clinical and pathological findings have

[☆] Estas recomendaciones cuentan con el aval científico de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y la Sociedad Española de Oncología Médica.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jose.palacios.sspa@juntadeandalucia.es (J. Palacios).

Determination of mutations; Tyrosine kinase inhibitors

demonstrated the importance of *EGFR* mutations as an activating mechanism for the signalling pathway, their increased incidence in non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and, particularly, their role as a predictor of tyrosine kinase inhibitors response in the treatment of NSCLCs.

EGFR mutations can be identified in different biological samples using different techniques. In recent years in Spain this molecular alteration has been determined basically in a few centres or in the context of clinical trials. However, NSCLC must be treated in a tailor made way. In consequence, in order to an appropriate therapeutic strategy in patients with NSCLC can be established, *EGFR* mutation status should be done in more pathology services.

This paper makes general recommendations for the standardization of *EGFR* mutations identification, we describe the different techniques to perform molecular diagnosis and the clinical aspects directly implied in lung cancer diagnosis and treatment.

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

Mutaciones del gen del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) en el carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM): implicaciones clínicas y terapéuticas

Importancia de la vía *EGFR* en el CPNM

El cáncer de pulmón es un serio problema sanitario. De acuerdo con las estadísticas más recientemente publicadas, sólo en Estados Unidos¹ se diagnostican más de 219.000 casos cada año. En 2010 fue el segundo tumor en incidencia tanto en varones como en mujeres (por detrás del cáncer de próstata y del de mama, respectivamente). La incidencia ya es similar en ambos sexos y está en torno al 15% en varones (116.090 casos) y al 14% en mujeres (103.350 casos). Es un tumor cuya letalidad es muy elevada, ya que la tasa de supervivencia relativa a 5 años no supera el 10% en la mayoría de países, y por ello globalmente se considera que las cifras de mortalidad son cercanas a las de incidencia. En Estados Unidos es la primera causa de muerte por cáncer en ambos sexos, con unas cifras del 30% en varones (88.900 pacientes) y del 26% en mujeres (70.490). En cuanto a las cifras en Europa, en el año 2008 se diagnosticaron 3,2 millones de casos nuevos de cáncer y fallecieron 1,7 millones de personas por esta causa. La incidencia del cáncer de pulmón en Europa es del 12% (391.000 casos), y también aquí es la primera causa de muerte por cáncer (19,9%), con 342.000 casos^{2,3}. En España se diagnostican más de 208.000 casos nuevos de cáncer al año, de los cuales en 2012 serán 24.500 los debidos a cáncer de pulmón de acuerdo a la revisión más actualizada⁴. La incidencia en varones es de 19.681 nuevos casos al año, y en mujeres, de 3.498. Al igual que en otros países, es la primera causa de muerte por cáncer en varones (27,5%) y está aumentando en mujeres a un ritmo del 2% por año, aunque aún estamos lejos de la mortalidad de otros países occidentales.

Hoy en día más del 80% de todos los cánceres de pulmón pertenecen a las estirpes histológicas englobadas dentro del término carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), que incluyen el carcinoma epidermoide o de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes. Probablemente como consecuencia de la gran heterogeneidad de este tipo de tumores, sabemos que la eficacia de la quimioterapia (QT) es modesta. Así, para pacientes con enfermedad metastásica, que suponen más del 40% del total

de pacientes, el tratamiento de primera línea utilizando combinaciones de platino y fármacos de tercera generación se traduce en una mediana de supervivencia de alrededor de 12 meses⁵. Los tratamientos de QT de segunda línea pueden también paliar los síntomas de la enfermedad y prolongar algo la supervivencia, pero ha sido el reconocimiento reciente de subgrupos de pacientes con características clínicas y moleculares específicas lo que está modificando este panorama y nos permite plantear estrategias de tratamiento personalizado en subgrupos específicos de pacientes con resultados mucho mejores.

Una importante línea de investigación en oncología es la búsqueda de tratamientos dirigidos contra dianas específicas que actúen de forma selectiva. En este sentido, en el CPNM ha sido crucial la investigación de la vía del *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), que está activada en el 43-83% de los pacientes, sobre todo en los carcinomas escamosos (70%), seguido de los adenocarcinomas (50%) y menos frecuentemente en los carcinomas de células grandes. Es un evento infrecuente en los tumores de células pequeñas.

El *EGFR* es una glucoproteína transmembrana ubicua compuesta por un dominio extracelular amino-terminal para la unión de ligandos, una hélice transmembrana hidrófoba y un dominio citoplasmático que contiene el dominio tirosina quinasa y una región carboxi-terminal que contiene residuos de tirosina y elementos reguladores del receptor. El *EGFR* puede ser activado por diversos ligandos, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor- α transformador de crecimiento (TGF- α). La unión de los ligandos al dominio extracelular da lugar a la oligomerización del receptor que activa la porción tirosina cinasa de la molécula y origina la autofosforilación de ambos dominios del receptor. Estas tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión para diferentes moléculas transductoras de señales citoplasmáticas. Se inicia así la cascada de acontecimientos intracelulares que conduce a la proliferación celular, protección frente a apoptosis, mayor supervivencia y transcripción génica. Tanto las células neoplásicas como las normales dependen de las señales del *EGFR*, pero en las células normales dicha señal se encuentra estrictamente regulada y las células tumorales muestran lo que ha sido llamado una «adicción» a esta ruta^{6,7}.

El *EGFR* ha sido reconocido durante mucho tiempo como un modulador clave de las funciones celulares tumorales, y por ello ha sido objeto de interés como diana para el desarrollo de fármacos. Hasta el momento disponemos de

anticuerpos monoclonales humanizados generados contra la porción extracelular del receptor que impiden la unión de ligandos y también de pequeñas moléculas que compiten con el adenosín trifosfato de la región intracelular con actividad tirosina cinasa, bloqueando así la activación del receptor y la transducción de señales posreceptor^{6,7}. En el CPNM, el desarrollo clínico más importante ha sido con pequeñas moléculas, de las que están comercializadas en la actualidad gefitinib y erlotinib. Ambas actúan inhibiendo la fosforilación de la tirosina del *EGFR* inducida por el ligando mediante interacción física con el dominio intracelular.

Importancia de la determinación de las mutaciones del *EGFR* para la selección del tratamiento en pacientes con CPNM avanzado

Tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa (ITK) del *EGFR* en población no seleccionada

La utilidad clínica de los inhibidores de la actividad de la tirosina cinasa del *EGFR* en el CPNM avanzado ha sido explorada en pacientes pretratados y en primera línea, en monoterapia y en asociación con QT. Los dos estudios iniciales fueron dos ensayos fase II, conocidos como IDEAL I⁸ y II⁹ (Iressa Dose Evaluation in Advanced Lung Cancer) multicéntricos y aleatorizados, que incluyeron 400 pacientes y analizaron la eficacia y la tolerabilidad de gefitinib en dos dosis diferentes (250 y 500 mg/día) en pacientes pretratados con esquemas basados en cisplatino. Las respuestas radiológicas fueron del 18% en el estudio IDEAL I y del 11% en el IDEAL II. También en pacientes pretratados se llevó a cabo un estudio de fase III, conocido como estudio ISEL¹⁰ (IressaTM Survival Evaluation in Lung Cancer), que comparó gefitinib (IressaTM) 250 mg y placebo en 1.692 pacientes que habían fracasado o eran intolerantes al menos a un tratamiento previo basado en platino para la enfermedad avanzada. En este estudio, en población no seleccionada, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia ni en la población general (medianas de 5,6 frente a 5,1 meses; $p=0,087$) ni en el subgrupo de adenocarcinomas (medianas de 6,3 frente a 5,4 meses; $p=0,089$).

Sin embargo, el estudio de fase III, que comparó erlotinib frente a placebo en 731 pacientes con CPNM avanzado y progresión a una o dos líneas de QT, demostró una supervivencia superior para los pacientes que recibieron tratamiento con erlotinib (6,7 meses) comparado con los que recibieron placebo (4,7 meses), a pesar de que la tasa de respuestas objetivas fue baja (8,9%)¹¹. Por este beneficio en supervivencia erlotinib obtuvo la aprobación en este contexto.

Por último, el estudio INTEREST¹² (IRESSA Non-small-cell lung cancer Trial Evaluating REsponse and Survival against Taxotere) es el único de fase III en pacientes pretratados no seleccionados en el que el comparador es QT y no placebo. En él se aleatorizaron 1.466 pacientes que habían recibido ya una primera línea de QT y compararon gefitinib con docetaxel (TaxotereTM) por ser el tratamiento de QT de segunda línea estándar en aquel momento. En este estudio se demostró una supervivencia equivalente entre ambos fármacos (7,6 meses frente a 8,0 meses; $p=NS$), siendo el primer fármaco de esta familia en demostrar supervivencia similar a la QT en pacientes pretratados.

Ambos fármacos (gefitinib y erlotinib) han sido también estudiados en combinación con QT de primera línea en población no seleccionada, pero a pesar de las expectativas inicialmente generadas los resultados fueron negativos. Los estudios realizados con gefitinib, conocidos como INTACT 1¹³ y 2¹⁴, exploraron las combinaciones de paclitaxel/carboplatino (paclitaxel 225 mg/m²/carboplatino AUC 6 mg/min/ml) y cisplatino/gemcitabina (cisplatino 80 mg/m² el día 1 y gemcitabina 1.250 mg/m² los días 1 y 8) asociados a gefitinib oral 500 mg/día, gefitinib 250 mg/día o placebo. Al finalizar la QT, se continuaba con gefitinib o placebo hasta la progresión de la enfermedad. El objetivo principal de ambos estudios fue la supervivencia global (SG), siendo los resultados negativos en 1.037 y 1.093 pacientes respectivamente. Las medianas de supervivencia en el estudio de carboplatino/paclitaxel fueron 8,7, 9,8 y 9,9 meses (para gefitinib 500 mg/día, 250 mg/día y placebo, respectivamente, $p=0,64$) y de 9,9, 9,9 y 10,9 meses (para gefitinib 500 mg/día, gefitinib 250 mg/día y placebo, respectivamente) en el estudio de cisplatino/gemcitabina. Tampoco se encontraron diferencias significativas en otros parámetros, como la tasa de respuestas o el tiempo hasta la progresión. Conclusiones similares se obtuvieron en los estudios TALENT¹⁵ y TRIBUTE¹⁶, que compararon cisplatino/gemcitabina y paclitaxel/carboplatino junto a erlotinib 150 mg o placebo. Las medianas de supervivencia en 1.172 pacientes fueron 43 frente a 44,1 semanas en el estudio TALENT (hazard ratio [HR], 1,06) y 10,6 frente a 10,5 meses en los 1.059 pacientes incluidos en el estudio TRIBUTE (HR, 0,99; IC del 95%, 0,86 a 1,16; $p=0,95$).

Descubrimiento de las mutaciones del *EGFR* y su papel predictivo

A pesar de los desalentadores resultados iniciales de estos fármacos utilizados en combinación con QT de primera línea en pacientes con CPNM avanzado, el reconocimiento de un «patrón clínico» de respuesta a la monoterapia que se acompañaba en ocasiones de unos resultados clínicos espectaculares favoreció el desarrollo de líneas de investigación más dirigidas que se han traducido en importantes beneficios en población seleccionada.

En el año 2004, grupos independientes de investigadores identificaron mutaciones somáticas en el dominio de la tirosina cinasa del gen *EGFR* en pacientes con respuesta clínica a gefitinib¹⁷⁻¹⁹. Estas mutaciones dan lugar a un incremento de la actividad del factor de crecimiento y confieren susceptibilidad al inhibidor porque conllevan cambios conformacionales que incrementan la sensibilidad de las células tumorales a los inhibidores. En otras palabras, estas mutaciones convierten a la célula mutada en «adicta» a las señales del *EGFR*. Cuando se administra un inhibidor, la activación del *EGFR*, necesaria para la supervivencia celular, se interrumpe, lo que provoca la muerte celular. Las mutaciones más frecuentes son deleciones *in-frame* de los nucleótidos 9, 12, 15, 18, o 24 en el exón 19 y mutaciones puntuales CTG/CGG en el exón 21(L858R) (tabla 1).

Múltiples estudios han analizado de forma retrospectiva el valor de las mutaciones del gen *EGFR* en pacientes con CPNM avanzado tratados con gefitinib o erlotinib. En estos estudios se encontró que los pacientes de raza asiática, sexo

Tabla 1 Mutaciones más frecuentes de dominio tirosina cinasa del gen *EGFR*^{6,17,18,20,21}

Localización	Asociadas a sensibilidad al tratamiento	Frecuencia	Asociadas a resistencia al tratamiento	Frecuencia
EXÓN 18 ^a	G719C G719S G719A V689M N700D E709K/Q S720P	5%		
Exón 19	Del E746_A750 Del E746_T751 Del E746_T750 (ins R/P) Del E746_T751 (ins A/I) Del E746_T751 (ins VA) Del E746_S752 (ins A/V) Del L747_E749 (A750P) Del L747_A750 (ins P) Del L747_T751 Del L747_T751 (ins P/S) Del L747_S752 Del L747_752 (E746V) Del L747_752 (P753S) Del L747_S752 (Ins Q) Del L747_P753 Del L747_P753 (ins S) Del S752_L759	~45%	D761Y	< 1%
Exón 20	V765A ^a T783A ^a	< 1%	T790M (50%) D770_N771 ^a (ins NPG) D770_N771 ^a (ins SVQ) D770_N771 ^a (insG) V769L ^a S768I ^a	~5%
Exón 21	L858R L861Q ^a	~45%		

^a La evidencia clínica de la sensibilidad o de la resistencia que confieren estas mutaciones es limitada.

femenino, histología de adenocarcinoma y no fumadores o fumadores de menos de 100 cigarrillos en total, obtenían mejores tasas de respuesta al utilizar un inhibidor de la tirosina cinasa del *EGFR*. De forma retrospectiva, parecía que este perfil clínico se correspondía con la presencia de mutaciones activadoras. Así, por ejemplo, en un estudio con gefitinib²² la tasa de respuestas parciales fue del 64,7% en pacientes con mutación del *EGFR* comparada con sólo el 13,7% en pacientes sin mutación. También la supervivencia libre de progresión (SLP) y la SG fueron superiores en los mutados (21,7 frente a 1,8 meses de SLP y 30,5 frente a 6,6 meses de SG). Todo ello generó un gran volumen de información, que, como siempre, debía confirmarse en ensayos prospectivos, como así ha sido.

En la misma línea, la conclusión del análisis conjunto de diferentes estudios de fase II demuestran que gefitinib y erlotinib inducen respuestas en alrededor del 70% de los pacientes portadores de mutaciones, lo que se traslada a medianas de SLP de 9 a 13 meses y medianas de supervivencia de alrededor de 23 meses²³.

Es preciso añadir que se están describiendo mutaciones que se relacionan con resistencia al tratamiento con inhibidores de la tirosina cinasa. Estas mutaciones se dan fundamentalmente en el exón 20 y consisten en una sustitución de metionina por treonina en la posición 790 (T790M) y está discutida su presencia desde el inicio del desarrollo tumoral o si se trata de una mutación adquirida. Por otro lado, también se ha descrito como factor de resistencia una amplificación del oncogen *MET*²⁴.

Tratamiento con ITK en pacientes portadores de mutaciones activadoras del gen *EGFR*

Uno de los ensayos clínicos más importantes con gefitinib es el estudio IPASS²⁵ (IRESSA Pan-Asia Study), que reclutó 1.217 pacientes no tratados previamente con las características clínicas habituales en pacientes portadores de mutaciones del *EGFR*. Así, incluyeron pacientes de raza asiática, adenocarcinomas y población escasamente fumadora (definida como consumidora de menos de 10 paquetes/año) o no fumadora. El objetivo del estudio era evaluar la SLP,

siendo los pacientes aleatorizados para recibir gefitinib o un tratamiento estándar de QT de primera línea (carboplatino/paclitaxel). El estudio demostró la no inferioridad de gefitinib frente a la QT en población no seleccionada de acuerdo a la presencia o no de mutaciones del *EGFR*, con unas medianas de SLP de 5,7 meses para gefitinib y 5,8 para QT. Sin embargo, el análisis en pacientes cuyos tumores eran portadores de mutaciones del *EGFR* (realizado retrospectivamente sobre 437 casos; 35,9%) demostró la superioridad de gefitinib en este contexto, con un aumento estadísticamente significativo de la SLP (HR 0,74 en población general; HR 0,48 en población mutada; $p < 0,0001$), así como una tasa de respuestas superior frente a la QT (71,2% frente a 47,3%, $p = 0,0001$). Todo ello con una toxicidad muy manejable. Los datos finales de supervivencia han sido presentados recientemente²⁶, y no hay diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (HR, 0,90; $p = 0,10$). Tampoco hay diferencias en SG cuando se analizan los subgrupos del *EGFR* mutado (HR, 1,002) o *EGFR* no mutado (HR, 1,18). Globalmente, el 49% de los pacientes del brazo de gefitinib recibieron después QT y el 51% de los incluidos en el brazo de QT recibieron al progresar un inhibidor de la tirosina cinasa del *EGFR*.

Otro estudio de fase III llevado a cabo también en población enriquecida es conocido como First-SIGNAL²⁷ (First-line Treatment for Never-smokers with Advanced or Metastatic Adenocarcinoma of the Lung). En él 309 pacientes coreanos, no fumadores, con adenocarcinomas en estadio avanzado y no tratados previamente fueron aleatorizados para recibir gefitinib o QT (en este caso, cisplatino y gemcitabina). El objetivo del estudio fue demostrar un incremento del 40% en la SG. La edad media fue de 57 años, y el 89% de los reclutados eran mujeres. La tasa de respuesta fue superior con gefitinib (53% frente a 45%), pero al analizar la población completa no hubo diferencias en la SG (21,3 frente a 23,3 meses para gefitinib y QT, respectivamente) o SLP (6,1 frente a 6,6 meses). Al igual que en el IPASS, sólo un tercio (31%) de los pacientes tenían tejido disponible para el estudio de la mutación, siendo la incidencia de pacientes mutados en este estudio del 44%. Los resultados en esta población son similares a los del estudio IPASS, con una tasa de respuesta objetiva del 85% en mutados frente a 26% sin mutación, una mediana de SLP favorable a QT en pacientes sin mutación (6,4 frente a 2,1 meses) y una tendencia favorable a gefitinib en pacientes con mutación del *EGFR* (8,5 frente a 6,7 meses). Sin embargo, los ambiciosos resultados de SG no se cumplieron, probablemente debido a que el 80% de los pacientes asignados a QT recibió a la progresión un inhibidor del *EGFR*.

Por último, disponemos de dos estudios de fase III en los que se compara gefitinib con QT de primera línea exclusivamente en pacientes portadores de mutación del *EGFR* (tablas 2 y 3). El estudio WJTOG3405²⁸ aleatorizó a 177 pacientes japoneses con CPNM avanzado no tratado y portadores de la mutación del *EGFR* a recibir gefitinib (250 mg/día, $n = 88$) o cisplatino y docetaxel (80 mg/m² y 60 mg/m², respectivamente, $n = 89$). El objetivo principal del estudio fue la SLP, demostrándose una vez más una supervivencia significativamente más larga para el grupo de gefitinib, con una mediana de SLP de 9,2 meses frente a 6,3 meses con QT ($p \text{ log-rank} < 0,0001$).

El estudio NEJ002²⁹, llevado a cabo también en Japón, comparó en 230 pacientes gefitinib con carboplatino/paclitaxel como tratamiento de primera línea en pacientes con CPNM avanzado con mutación positiva del *EGFR*. El objetivo principal también fue la SLP, demostrándose una reducción del 70% en el riesgo de progresión para los pacientes que recibieron gefitinib frente a los que recibieron carboplatino/paclitaxel (HR 0,30; $p < 0,001$). El 73,7% de los pacientes en el grupo de gefitinib alcanzó una respuesta objetiva frente a un 30,7% en el grupo de QT ($p < 0,001$). La SG, objetivo secundario del estudio, fue numéricamente más prolongada en el grupo de gefitinib aunque no estadísticamente significativa (mediana de SG, 30,5 meses para gefitinib frente a 23,6 meses para carboplatino/paclitaxel [$p = 0,31$]).

Existen también dos estudios llevados a cabo en pacientes portadores de mutación activadora del *EGFR* en los que se comparó el otro inhibidor de la tirosina cinasa del *EGFR* actualmente disponible (erlotinib) con QT en pacientes con CPNM avanzado no tratados previamente. El primero de ellos (OPTIMAL), realizado en China, ha presentado resultados en la reunión de la European Society of Medical Oncology (ESMO) 2010³⁰. En este estudio se aleatorizó a 154 pacientes para recibir erlotinib o carboplatino/gemcitabina. El objetivo principal del estudio fue la SLP. Con un seguimiento mediano de 15,6 meses, el estudio alcanzó su objetivo con un HR de 0,16 para SLP y una mediana de 13,1 meses para erlotinib, frente a 4,6 meses para QT ($p < 0,0001$). La tasa de respuestas objetivas también fue superior (83% frente a 36%). Por último, el estudio EURTAC, que recluta a pacientes españoles, italianos y franceses, comparando erlotinib frente a un doblete de QT basado en platino, está aún en fase de reclutamiento.

Estudio de mutaciones del *EGFR* en CPNM en población española

Los datos iniciales publicados corresponden a un estudio en el que se incluyeron 83 pacientes españoles tratados con gefitinib a la progresión con QT y en los que de forma retrospectiva se analizó la tasa de mutaciones, que resultó ser del 12% (10 de 83 pacientes)³¹. Todas las mutaciones aparecieron en adenocarcinomas, y fueron más frecuentes en mujeres ($p = 0,007$) y en no fumadores ($p = 0,01$). La tasa de respuestas objetivas a gefitinib fue del 60% en los pacientes con mutaciones y del 8% en los pacientes *wild type EGFR* ($p = 0,001$). La mediana de supervivencia fue 13 meses frente a 4,9 meses ($p = 0,02$).

En cualquier caso, la información más importante disponible en la actualidad sobre la frecuencia de mutaciones en nuestro entorno proviene de la base de datos del Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) publicada en 2009 por R. Rosell³². Así, se encontraron 350 pacientes portadores de mutación sobre un total analizado de 2.105 pacientes registrados entre abril 2005 y noviembre de 2008, lo que supone un 16,6% del total en una población enriquecida. De nuevo, las mutaciones del *EGFR* fueron más frecuentes en mujeres (69,7%), no fumadores (66,6%) y adenocarcinomas (80,9%) ($p < 0,001$ para todas las comparaciones). Las mutaciones fueron en el exón 19 (62,2%) y L858R (37,8%). La mediana de SLP y de SG para los 217

Tabla 2 Carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado. Estudios fase III con gefitinib^{25,27}. Población clínicamente seleccionada

	IPASS ²⁵	First-SIGNAL ²⁷
Comparador	Carboplatino/paclitaxel	Cisplatino/gemcitabina
Número de pacientes total	1.217	313
Número de pacientes evaluados para mutación EGFR	437	96
Número de pacientes EGFR Mut+	261	42
Objetivo principal	SLP	SG
Resultados		
Total	HR = 0,741 p < 0,0001	HR = 1,003 p = 0,428
Mut+	HR = 0,48 p < 0,0001	HR = 0,823 p = 0,648

SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global; Mut+: presencia de mutaciones en el gen *EGFR*; HR: hazard ratio.

Tabla 3 Estudios fase III en carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado en primera línea en pacientes con mutación *EGFR*²⁸⁻³⁰

	NEJ002 ²⁹	WJTOG3405 ²⁸	OPTIMAL ³⁰	EURTAC
Diseño	Gefitinib vs. carboplatino/paclitaxel	Gefitinib vs. cisplatino/docetaxel	Erlotinib vs. carboplatino/gemcitabina	Erlotinib vs. doblete QT basado en platino
Área geográfica	Japón	Japón	China	Europa
Número de pacientes	198	177	154	174
Objetivo principal	SLP	SLP	SLP	SLP
Resultados	HR = 0,357 p < 0,001	HR = 0,489 p < 0,001	HR = 0,16 p < 0,0001	

SLP: supervivencia libre de progresión; HR: hazard ratio.

pacientes que recibieron erlotinib fueron 14 y 27 meses, respectivamente.

Papel predictivo de la detección de sobreexpresión o amplificación del gen *EGFR* en CPNM

En la actualidad, la única alteración molecular considerada como factor predictivo de respuesta a gefitinib en CPNM es la mutación del *EGFR*. No obstante, los CPNM pueden presentar otras alteraciones relacionadas con el *EGFR*, tales como la amplificación génica y la sobreexpresión proteica. El análisis de estas alteraciones puede ser de interés para profundizar en el conocimiento de las características biológicas de este grupo de neoplasias. Por tanto, se recomienda que el estudio de estas alteraciones se estandarice de acuerdo a las recomendaciones recientemente publicadas^{33,34}.

Existe discrepancia en la literatura acerca de la frecuencia de amplificación y sobreexpresión del *EGFR* en el CPNM, y esto es debido a diferentes circunstancias, tales como distintos métodos de detección y de evaluación, el origen étnico de los pacientes y los criterios de inclusión de las series estudiadas. Respecto a los estudios de amplificación génica, la técnica más frecuentemente utilizada hasta el momento es la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), aunque recientemente se está incorporando la hibridación

in situ cromogénica (CISH). Una de las dificultades más importantes del uso de la FISH es la interpretación de los resultados. En la actualidad se tiende a incluir como resultados positivos no sólo los casos con verdadera amplificación, sino también aquellos con alta polisomía³³. Utilizando este criterio, aproximadamente el 40% de los adenocarcinomas de pulmón presentan un resultado de FISH positivo.

En relación con los estudios inmunohistoquímicos, se estima que entre el 45 y el 60% de los adenocarcinomas de pulmón pueden presentar grados diversos de expresión del *EGFR*. Diferentes series han demostrado una mayor sensibilidad y mejor correlación con la amplificación cuando la expresión del *EGFR* se analiza utilizando los kits Zymed *EGFR* kit (clona 31G7) y Dako *EGFR* pharmDx kit (clona 2-18C9) que con otros anticuerpos^{35,36}.

En los últimos años se han desarrollado anticuerpos específicos que reconocen las proteínas codificadas por las formas más frecuentemente mutadas del *EGFR* (L858R y DEL E746-A750). Series recientes han demostrado una sensibilidad aceptable 47-83% y una alta especificidad, cercana al 100%³⁷⁻⁴⁰. Estos estudios parecen indicar una mayor sensibilidad y especificidad para el anticuerpo específico para la mutación L858R (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE. UU.). Estos datos sugieren que en el futuro próximo estos anticuerpos podrían utilizarse como cribado previo en la selección de pacientes candidatos a tratamiento específico.

La determinación de mutaciones del *EGFR* en las guías de tratamiento del CPNM avanzado

Existen guías disponibles de las sociedades españolas, europeas y americanas de oncología médica para el tratamiento del CPNM donde se realizan recomendaciones para la determinación de mutaciones del *EGFR*.

En la guía sobre tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)⁴¹, recientemente actualizada, se describe que puede recomendarse el tratamiento de primera línea o sucesivas con gefitinib para pacientes portadores de mutaciones activadoras del *EGFR*, apareciendo además de forma diferenciada en el algoritmo.

En la misma línea, para la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO)⁴² la presencia de mutaciones del *EGFR* en el exón 19 o en el 21 es predictiva de respuesta y SLP cuando se utiliza tratamiento con un inhibidor oral como gefitinib o erlotinib. Esta guía informa también que la incidencia de mutaciones en población caucásica es de alrededor del 10% y que utilizar gefitinib o erlotinib como primera línea en pacientes con CPNM avanzado portadores de mutaciones es una opción con un nivel de evidencia IIIB.

Por último, la Sociedad Americana de Oncología Médica (ASCO)⁴³ publicó la primera guía sobre CPNM irreseccable y avanzado en 1997, siendo la última actualización de diciembre 2009. Para ello se analizó la bibliografía disponible desde 2002 hasta julio de 2008. Entre las distintas preguntas que se plantean en esta guía hay una que hace referencia a los resultados con terapias dirigidas. La respuesta en relación a los inhibidores orales de la tirosina cinasa es que en pacientes no seleccionados no debería utilizarse erlotinib o gefitinib en combinación con QT. Asimismo, esta guía informa que también en pacientes no seleccionados la evidencia es insuficiente para recomendar monoterapia como primer tratamiento. Sin embargo, puede recomendarse gefitinib para pacientes portadores de mutación del *EGFR*, mientras que si el estatus de la mutación es desconocido o ausente, la QT sería el tratamiento de elección, con nivel de evidencia A2.

Selección de pacientes

En el momento actual no hay acuerdo sobre si la determinación del *EGFR* debe ser realizada en todos los pacientes diagnosticados de CPNM avanzado o bien sólo en población seleccionada. Factores como la escasa evidencia actual sobre la presencia de mutaciones en pacientes con carcinoma escamoso, la necesidad de utilizar de forma racional los recursos tanto humanos como económicos y la dificultad de obtener muestras en algunos pacientes hace que no haya un acuerdo general sobre este tema, recomendándose una decisión consensuada de cada grupo de trabajo multidisciplinar, atendiendo a la mejor evidencia disponible en cada momento y a la situación concreta de cada centro. La Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), conscientes de esta situación, han designado un comité formado por 10 expertos que están elaborando un documento de consenso sobre biomarcadores en cáncer de pulmón en el que se abordará en profundidad este tema.

Obtención y procesamiento de muestras para la determinación de mutaciones del *EGFR* en CPNM

Necesidad del trabajo multidisciplinar

La determinación de mutaciones del *EGFR* en pacientes con CPNM debe ser encuadrada en la valoración global del paciente con esta patología, y el tiempo de realización de la determinación no debería retrasarse más allá del estudio de extensión de la enfermedad. Por tanto, es necesario el trabajo multidisciplinar conjunto, considerando el papel del oncólogo médico y radioterápico, patólogo, neumólogo, cirujano, biólogo molecular, técnico de laboratorio y resto del personal implicado.

Los comités de tumores son los órganos intrahospitalarios donde se discute la actitud que debe adoptarse con cada paciente. Es fundamental que en ellos esté representado el responsable de los análisis moleculares. La inclusión de los miembros de los laboratorios de biología molecular permite mejorar la selección de la muestra más adecuada por parte del broncoscopista, optimizar la identificación de la mejor área dentro del estudio anatomopatológico de cara al análisis de mutaciones e interactuar con los oncólogos para poder correlacionar los resultados biológicos con la realidad clínica del paciente.

Es también de gran importancia establecer los tiempos óptimos para la entrega de resultados, teniendo en cuenta el tiempo desde la petición de la muestra hasta la obtención de la misma, el tiempo de envío al laboratorio donde se realizan las pruebas, y el tiempo desde la recepción de la muestra hasta el informe final al médico peticionario.

Por tanto, dada la relativa complejidad de los procedimientos y la participación de los diferentes profesionales implicados, es necesario establecer un flujo de trabajo en cada centro que permita la optimización del tiempo de diagnóstico.

Según se ha publicado recientemente en el consenso de Viena, el tiempo recomendable desde que se recibe la muestra en el servicio responsable hasta que se emite el informe con el resultado del análisis molecular de la mutación en el *EGFR* es de 8-9 días, tiempo que asumimos asimismo como razonable en estas recomendaciones²¹.

Procesamiento de las muestras

En este apartado se exponen los aspectos directamente relacionados con la calidad y características de las muestras sobre las que se va a realizar el análisis molecular, por lo que se debe hacer hincapié en la obligatoriedad de la participación de un especialista en anatomía patológica en el proceso (tabla 4).

Localización preferente de la muestra (tumor primario o metástasis)

A pesar de la heterogeneidad de los tumores de pulmón, no hay evidencia ni información suficiente sobre la potencial disparidad entre el estado mutacional en el tumor primario y en las metástasis o recidivas, existiendo publicaciones que apoyan la

Tabla 4 Procesamiento de las muestras

	Posibilidades	Recomendación
Localización de la muestra	Tumor primario Tumor metastásico	Cualquiera (no rebiopsiar para análisis molecular en caso de recidiva excepto casos de evolución inesperada o discrepancias)
Material biológico	Citología (PAAF o extensión) Biopsia Pieza quirúrgica	Cualquiera que contenga adecuada representación de células tumorales (>150 células)
Procesamiento inicial	Fresco y congelación rápida Formol 10% 24 h Otros fijadores Tampón específico (RNAlater)	Congelación, formol o tampones que preserven ácidos nucleicos Evitar fijadores alternativos
Enriquecimiento de la muestra en células tumorales	Cortes directos a partir del bloque Macrodissección Microdissección	Macro o microdissección (incluso en extensiones citológicas) ^a
Técnica que realizar	Inmunohistoquímica Amplificación FISH/CISH/SISH Técnicas moleculares para detección de mutaciones IHQ específica de mutaciones ^b	Técnicas que detecten mutaciones. No recomendable IHQ ni FISH/CISH/SISH
Extracción de ADN	Robotizada Manual	Cualquiera que proporcione concentraciones >15 ng/μl Preferible manual
Calidad de ADN	No cuantificar Cuantificar concentración y pureza	Cuantificar por espectrofotómetro, nanodrop o similar
Tiempo total hasta emisión de informe		No mayor de 10 días laborables

PAAF: punción-aspiración con aguja fina; IHQ: inmunohistoquímica; FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia; CISH: hibridación *in situ* cromogénica; SISH: hibridación *in situ* con plata.

^a Puede variar según la sensibilidad de la técnica molecular que se vaya a utilizar.

^b Sin datos definitivos.

concordancia entre las características moleculares de ambas localizaciones y viceversa.

Utilizando la FISH, existen estudios que proporcionan un porcentaje de discordancia entre lesión primaria y metastásica de hasta un 32%, si bien estos estudios han sido realizados a partir de citologías de las lesiones metastásicas, por lo que no se puede asegurar que el número de células analizadas haya sido representativo^{44,45}. Por otro lado, parece que las discordancias podrían corresponder a polisomías tumorales, por lo que en principio no tendrían que ocurrir en el caso de que la alteración que estemos analizando sea la mutación y no la sobreexpresión⁴⁶. De hecho, cuando se han utilizado técnicas moleculares destinadas a la detección de mutaciones la correlación es mayor⁴⁷, si bien dista de ser perfecta⁴⁸.

Por tanto, a pesar de no existir un acuerdo, la recomendación sería la de utilizar el material del que disponemos, sin preferencia sobre lesiones primarias o metastásicas, pero destacando en el informe la localización tumoral (primaria o metastásica, e incluso el órgano de donde se ha tomado la muestra) y la cantidad de células que se han podido analizar. Hay que destacar asimismo que no es necesaria una nueva toma de biopsia para obtener material en el caso de recidivas tumorales para un nuevo análisis molecular, debiéndose asumir el resultado de la primera determinación, con la

excepción lógica de casos de evolución no esperada o discordancias clínico-patológico-moleculares.

Tipo de muestras

Existen múltiples fuentes de células tumorales sobre las que se puede realizar el análisis de mutaciones. Entre ellas se encuentran la citología exfoliativa, el broncoaspirado, el lavado broncoalveolar, la punción-aspiración con aguja fina (tanto en lesiones primarias como en el mediastino o en localizaciones metastásicas guiada por endoscopia, EBUS o similar), la biopsia bronquial y transbronquial, la biopsia con aguja gruesa (lesiones primarias y metastásicas) y las piezas quirúrgicas.

En primer lugar, es preciso destacar que cualquier fuente de células tumorales que haya sido procesada de manera adecuada es susceptible de análisis y puede proporcionar resultados satisfactorios, si bien las técnicas citológicas, al tener la limitación propia de la cantidad de células presente en la muestra, corren el riesgo de proporcionar resultados falsos negativos. Sin embargo, en la literatura se encuentran comunicaciones donde se realiza este tipo de análisis molecular en muestras exiguas procedentes de citologías con buenos resultados⁴⁹⁻⁵³.

La utilización de agujas de diferentes calibres ha sido evaluada en la literatura, y los resultados muestran que se

logra mayor cantidad de ADN con las agujas de calibre 18 que con las de calibre 20, si bien la calidad del ADN parece ser mejor con el calibre 20⁵⁴. En este punto, por tanto, no resulta prudente recomendar ningún calibre, ya que será la condición del paciente y las circunstancias quirúrgicas las que indiquen uno u otro, pudiéndose obtener ADN de buena calidad en ambas circunstancias.

Un material que es fácilmente obtenible cuando se realiza una punción-aspiración con aguja fina es el lavado de la aguja residual tras el análisis morfológico. Proporciona un material celular extremadamente útil para realizar determinaciones moleculares⁵⁵ con rangos de concentración de ADN excelentes.

Es extremadamente importante contar con la colaboración de neumólogos broncoscopistas, radiólogos y cirujanos en cuanto a evitar problemas ocasionados por una mala fijación, preservación inicial, transporte y tiempo máximo asumible, antes de que sean procesadas por el patólogo responsable.

Todos los aspectos relacionados con estos problemas serán tratados en el siguiente apartado.

Requerimientos para la preparación de la muestra

Muestras tisulares. El tipo más frecuente de muestra que se utiliza para la determinación de mutaciones del *EGFR* en la práctica clínica es la biopsia fijada en formol e incluida en parafina. A pesar de que existen artículos donde se habla de un elevado porcentaje de falsos negativos de los tejidos fijados en formol e incluidos en parafina frente a su contrapartida congelada⁵⁶, no es nuestra experiencia ni la de otros grupos, obteniendo material perfectamente válido a partir del tejido fijado e incluido en parafina. Parece que el problema podría encontrarse en el tamaño del fragmento que se amplifica en la PCR, fallando la correlación cuando se intenta amplificar fragmentos mayores de 300 pb en tejidos fijados⁵⁷. Se recomienda evitar el uso de fijadores alternativos no habituales (fijadores mercuriales o alcohólicos).

Es necesario un tiempo de fijación menor de 24 h y la utilización de formol tamponado al 10%. La proporción de fijador adecuada debe ser de 10:1 con el tejido a fijar, todo esto siempre y cuando la fijación se realice a temperatura ambiente, debiendo aumentar el tiempo de fijación con temperaturas más bajas. La inclusión en parafina debe realizarse con procedimientos automáticos y estandarizados, existiendo en la actualidad métodos de procesado rápido basados en microondas que también resultan válidos para el análisis de mutaciones.

En el caso concreto de las piezas quirúrgicas procedentes de lobectomías, neumonectomías o resecciones pulmonares atípicas, se debe seleccionar un fragmento de tumor que debe fijarse en las condiciones idóneas de temperatura, tiempo y concentración y que será reservado para el análisis molecular. El resto será fijado por insuflación de la manera habitual, pudiendo utilizarse este tejido en el caso que no se disponga del bloque especial.

Adicionalmente a las muestras fijadas, la posibilidad de disponer de material tisular congelado y preservado a -80°C es la opción que preserva mejor el tejido de cara a los análisis moleculares. Si es posible obtener material en fresco, la congelación se puede llevar a cabo en seco en criotubos, incluida en medios como OCT o en tampones como el

PBS o RNAlater. Es preciso que la congelación se realice en el menor tiempo posible tras la resección o la biopsia (recomendable < 20 min).

Una vez obtenido el bloque de parafina o de congelación, se realizará una correlación con un corte histológico de control teñido con hematoxilina y eosina. Se destaca la necesidad de evitar áreas necróticas, confirmar morfológicamente que el tejido analizado corresponde con células neoplásicas y estimar el porcentaje de células tumorales incluidas en la muestra, algo necesario para analizar los resultados moleculares, ya que no todas las técnicas aseguran resultados fiables con porcentajes bajos de células tumorales.

En este momento, si se dispone de técnicas de microdissección por láser, se realizarán cortes que se montarán sobre la plataforma adecuada para cada microdisector (portas especiales con membrana o portas habituales según el modelo). Se seleccionarán áreas de tejido tumoral y se recogerán para realizar la extracción de ADN y el análisis molecular posterior. Otra opción es realizar técnicas de macrodissección mediante marcado y selección de la región de interés del bloque. En el caso de no disponer de sistemas de micro o macrodissección, se seleccionará el bloque que disponga de mayor componente neoplásico respecto a tejido no tumoral, siempre estimando la proporción de tejido tumoral y recogiendo dicho dato en el informe.

En el caso de los adenocarcinomas, son preferentes a la hora de seleccionar para el análisis las zonas de crecimiento bronquioloalveolar o micropapilar, así como las que están formadas por células en tachuela (*hobnail cells*)⁵⁸, si bien pueden aparecer mutaciones asociadas con cualquier patrón morfológico⁵⁹.

Muestras citológicas. Existe la posibilidad de almacenar material celular congelado bien a partir del lavado de la aguja, como ya se ha comentado⁵⁵, o de material celular directamente obtenido. En el caso de los derrames pleurales, el tampón para preservar las células puede ser tampón fosfato (PBS) u otros medios más específicos que respetan la integridad de los ácidos nucleicos como RNAlater. Por otro lado, también puede obtenerse material adecuado para el análisis a partir de extensiones celulares en portaobjetos, secas sin teñir o fijadas en etanol o incluso ya teñidas. En estos casos se pueden aplicar las técnicas de microdissección para enriquecer la muestra en células tumorales.

Calidad de la muestra. Muestra mínima necesaria

En cuanto al número necesario de células tumorales para realizar el estudio, se han publicado artículos en los que con un número de 150 se alcanzan resultados valorables⁵², si bien parece razonable que cuando exista disponibilidad se recoja un mayor número de células.

En cualquier caso, se debe insistir en que en diferentes foros se acepta que la cantidad mínima de muestra es la que hay, y lo que debe hacerse es analizarla, pero también describir muy claramente en los informes a partir de qué material se ha realizado la determinación y las potenciales limitaciones en caso de que las haya, como por ejemplo si se ha realizado sobre escaso componente celular en el caso de una citología y el resultado ha sido negativo.

Extracción de ADN

Existen múltiples métodos de extracción de ADN en el mercado que son aplicables a muestras fijadas en formol e incluidas en parafina, todos ellos válidos siempre y cuando proporcionen un ADN de calidad y concentración adecuada (por encima de 15 ng/ μ l). En nuestra experiencia los métodos robotizados (Qiacube o Magpure, entre otros) proporcionan un ADN de menor concentración que los métodos *in house*, quizá debido a la pérdida de fragmentos de pequeño tamaño en las soluciones finales. Para muestras sólidas incluidas en parafina recomendamos una extracción manual basada en proteinasa K a una concentración de 20 ng/ μ l y solución detergente tipo Tween20 al 50% en estufa o baño a 55°C durante 24 h, seguido de hervido a 100°C y centrifugación a 12.000 rpm, tras lo cual se extrae fácilmente la fase líquida con el ADN en suspensión. Sin embargo, es preciso resaltar de nuevo que cualquier método que proporcione un ADN medido en espectrofotómetro, nanodrop o similar por encima de 15 ng/ μ l es susceptible de ser aceptado y, por tanto, de análisis molecular de calidad.

Determinación de mutaciones del *EGFR* en CPNM

Técnicas

En la actualidad existen diversas técnicas de laboratorio que permiten el análisis de mutaciones en el gen *EGFR*, si bien la mayoría de ellas se centran en procesos basados en la amplificación del ADN utilizando PCR.

En la mayoría de laboratorios donde actualmente se realizan las determinaciones del *EGFR*, las técnicas utilizadas son las siguientes: secuenciación automática, Scorpion Amplification Refractory Mutation System (SARMS), PNA-LNA clamp y pirosecuenciación (tabla 5).

Existen otras formas de llevar a cabo estos análisis, como son plataformas Sequenom® basadas en tecnología «MassArray», e incluso otras plataformas más sofisticadas, pero la realidad actual es que la gran mayoría del mercado mundial utiliza las cuatro técnicas enumeradas anteriormente.

Como regla fundamental, antes de tomar la decisión de qué técnica/plataforma se va a utilizar en el laboratorio para el análisis de mutaciones se debe plantear de qué material y recursos técnicos y de personal se dispone. A partir de esta decisión, se establecerá y diseñará un protocolo adecuado y se validará dentro del programa de aseguramiento de la calidad del laboratorio, estableciéndose los criterios para elaborar un informe de validación, tal como se comenta más adelante, en el apartado «Requerimientos de los laboratorios clínicos que realizan la determinación».

A continuación detallaremos algunos aspectos de cada una de las cuatro técnicas, destacando los puntos más importantes que considerar.

Secuenciación automática¹⁷

De todas las técnicas, ésta es la que tiene menor sensibilidad, pero al mismo tiempo presenta varias ventajas sobre las demás, a destacar:

- Es de fácil acceso en muchos de los laboratorios y el personal de laboratorio suele tener experiencia en este tipo de análisis.
- Permite conocer con exactitud todas las mutaciones que existen en el gen, ya que se dispone de las secuencias completas de cada zona amplificada.

Para aumentar al máximo la sensibilidad, es necesario macro o microdisecar las muestras sujeto de análisis, de forma que al menos el 80% de las células deben ser de origen tumoral. De esta forma, nos aseguramos que el ADN sea mayoritariamente tumoral, disminuyendo el porcentaje de falsos negativos.

Es altamente recomendable utilizar *doble secuenciación*, es decir, hacer la reacción de secuenciación tanto de forma directa como invertida (lo que se conoce como secuenciación en *forward* y *reverse*), para lo que es necesario disponer de un secuenciador automático.

Para la lectura de las secuencias pueden utilizarse programas informáticos que detectan automáticamente cualquier cambio en la pauta de lectura a partir de una secuencia consenso o *wild type*, aunque debido a la sensibilidad de esta técnica se recomienda hacer un análisis manual de las secuencias. De esta forma se podrán detectar algunas mutaciones que de forma automática no se detectarían, y más si tomamos como límite de heterocigosidad el 30%, como suele hacerse de forma estándar para la secuenciación automática.

Scorpion Amplification Refractory Mutation System (SARMS)⁶⁰

Se basa en la combinación de dos técnicas: las sondas Scorpions y una amplificación refractaria para la detección de mutaciones. El procedimiento de laboratorio requiere un equipo de PCR capaz de detectar en tiempo real la reacción con PCR en función de la fluorescencia que se va generando en cada ciclo con el uso de sondas fluorescentes. Esta técnica tiene la ventaja de su alta sensibilidad (2-5% según las series y las mutaciones que detectar). Precisa un equipo de PCR en tiempo real. Esta técnica permite solamente detectar las mutaciones específicas para las que está diseñado el ensayo. Actualmente, existe un kit comercial de la compañía DxS (Qiagen) para la detección de las mutaciones más frecuentes.

PNA-LNA clamp⁶¹

Esta técnica se basa en una reacción de PCR junto a un oligotipo PNA (ácido nucleico peptídico) o LNA (ácido nucleico bloqueado) diseñado sobre la secuencia nativa, lo cual favorece la detección de las secuencias no bloqueadas o inhibidas por este tipo de cebador, incrementando la sensibilidad en la detección de las mutaciones para las cuales está diseñado el ensayo. La ventaja clara es el incremento en la sensibilidad de la técnica. Sin embargo, como contrapartida, es una técnica dirigida a mutaciones concretas y requiere experiencia en el procedimiento. Es necesario disponer de un equipo de PCR en tiempo real.

Pirosecuenciación⁵²

Constituye un método de secuenciación de ADN basado en el principio de la secuenciación por síntesis. A diferencia del

Tabla 5 Técnicas de biología molecular empleadas para la determinación de mutaciones en el gen *EGFR*^{17,52,60,61}

Técnicas	Sensibilidad (porcentaje de ADN mutado)	Características
Secuenciación directa	25	Requiere mayor cantidad de ADN mutado para su detección
Método de Sanger		Detecta cualquier mutación Barato
Pirosecuenciación	5-10	Requiere equipamiento especial (pirosecuenciador) Kit comercial disponible
PCR cuantitativa en tiempo real		
TaqMan PCR	10	No hay kit comercial Requiere termociclador de tiempo real Sólo detecta mutaciones específicas
<i>Scorpions</i> ARMS	1	Kit comercial disponible con las sondas Requiere termociclador de tiempo real Sólo detecta mutaciones específicas
Técnicas de enriquecimiento del alelo mutado		
PNA-LNA PCR clamp	1-0,1	Se precisan sondas LNA para hacer clamp que no son comerciales Requiere amplia experiencia en biología molecular Sólo detecta mutaciones específicas
COLD-PCR (<i>CO-amplification at Lower Denaturation temperature</i>)	1-0,1	Requiere amplia experiencia en biología molecular Se puede asociar con técnicas de secuenciación y pirosecuenciación
PCR-RFLP (análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción)	5	Sólo detecta mutaciones que generan lugar de restricción
dHPLC (<i>Denaturing High-Performance Liquid Chromatography</i>)	1	Requiere equipamiento especial Precisa experiencia en HPLC Detecta cualquier mutación
HRM (<i>High Resolution Melting</i>)	1	Detecta cualquier mutación Precisa equipamiento específico Requiere experiencia en biología molecular

procedimiento de Sanger, donde la terminación de la cadena se lleva a cabo con la incorporación de dideoxinucleótidos, en la pirosecuenciación la detección se basa en la liberación del pirofosfato cuando se produce la incorporación de un nucleótido mediante la ADN polimerasa. El pirofosfato liberado es convertido en ATP por la ATP sulfúrilasa en presencia de adenosina-5' fosfosulfato. El ATP formado permite la conversión de luciferina en oxiluciferina, produciéndose luz que es proporcional a la cantidad de ATP generado. La ventaja que presenta es que permite detectar cualquier cambio de secuencia igual que la secuenciación genómica estándar pero con una mayor sensibilidad. Requiere un equipamiento especial, un software dedicado y experiencia en la técnica. Recientemente se ha comercializado un *EGFR* pyro kit (Qiagen).

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 inhibidores de las tirosina

cinasas del *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. La secuenciación directa mostrará la secuencia nativa o la mutación detectada. La PCR en tiempo real con sondas específicas informará sobre la presencia o ausencia de mutaciones específicas al no evaluarse todas las posibles y debe tenerse en cuenta la limitación de no ofrecer la garantía absoluta de secuencia nativa. Estas limitaciones, fundamentalmente en relación con los cambios de secuencia analizados y con la sensibilidad de la técnica, conviene reflejarlas en el informe de manera que el clínico conozca el alcance real del resultado que está valorando.

Un resultado de secuencia nativa no significa que no pueda existir una mutación no evaluada por la técnica utilizada o una mutación en unos niveles inferiores al límite de detección de la técnica utilizada. Por otra parte, se desconoce el impacto clínico que puede tener la detección de mutaciones por técnicas muy sensibles (COLD-PCR, COLD-pirosecuenciación, etc.), desaconsejándose en el momento actual su uso en el ámbito asistencial.

Tabla 6 Informe de resultados de determinación de la mutación del *EGFR*

Identificación del paciente y médico solicitante (o persona autorizada en su defecto)
Diagnóstico anatomopatológico
Muestra que se remite (con fecha de toma de muestra a ser posible), con el debido informe anatomopatológico
Origen de la muestra (origen anatómico)
Fecha de solicitud, recepción de la muestra y emisión de resultados
Identificación de la técnica realizada para la determinación de las mutaciones EGFR
<i>Especificando mutaciones detectables</i>
Calidad de la muestra
<i>Porcentaje de células tumorales</i>
<i>Enriquecimiento de la muestra</i>
Microdissección
Macrodissección
Otros.
<i>Concentración ADN y pureza</i>
<i>Muestra adecuada o inadecuada (especificar en comentarios)</i>
Resultado
<i>No mutado/Mutado</i>
<i>Localización y tipo de mutación</i>
Identificación de la persona responsable de la determinación
Información o comentarios adicionales que sean interés para el médico petionario
Acreditación o participación en programas de calidad

Datos requeridos para la solicitud e informe de resultados

En todo laboratorio que realice la determinación de la mutación del *EGFR* debe existir una hoja de solicitud e informe de resultados, previamente consensuada entre todos los especialistas que intervienen en el proceso de diagnóstico. Esta parte del proceso debe quedar claramente documentada en todo el sistema y en el control de calidad, ya que forma parte del proceso de análisis de las muestras.

La hoja de solicitud de la determinación que se remite al laboratorio debe contener la información suficiente para identificar al paciente y al solicitante autorizado, así como proporcionar los datos clínicos pertinentes. La solicitud debe incluir, al menos, los siguientes datos siempre que la muestra se remita a otro centro: identificación del paciente y médico solicitante (o persona autorizada en su defecto), diagnóstico anatomopatológico, muestra que se remite (con fecha de toma de muestra a ser posible), con el debido informe anatomopatológico, origen de la muestra (origen anatómico) y fecha de petición.

Los resultados deben proporcionarse en un informe que debe contener como datos mínimos los referidos en la [tabla 6](#). Siempre que el laboratorio participe en algún programa de calidad o esté acreditado, se recomienda indicarlo en el informe.

Requerimientos de los laboratorios clínicos que realizan la determinación⁶²⁻⁶⁷

El test genético para la determinación de las mutaciones de sensibilidad y/o resistencia en el gen *EGFR* para la toma de decisiones en cuanto al tratamiento del paciente con

inhibidores de la tirosina cinasa debe realizarse en laboratorios que cumplan con los estándares de calidad para el diagnóstico clínico y que tengan un nivel de actividad suficiente (recomendable un mínimo anual de 80 determinaciones moleculares con la misma técnica; [tabla 7](#)).

El test de determinación de las mutaciones en el *EGFR* es una prueba diagnóstica molecular, y por ello debe incluirse como tal dentro del sistema de calidad de los laboratorios clínicos. Los centros donde se realice deben tener implantado un programa de calidad interno y participar en alguno de los externos (SEAP EMQN, UK NEQAS, etc.)^{68,69}, obteniendo resultados óptimos en el 90% de las determinaciones evaluadas.

Existen algunos requisitos mínimos de calidad que enumeramos a continuación y que deben ser de obligado cumplimiento, tanto en referencia al test como a las condiciones de los laboratorios y del personal que participe para asegurar un control de la calidad para la prueba de diagnóstico molecular como es el análisis de mutaciones en el gen *EGFR*:

1. Formación adecuada de todo el personal y supervisión apropiada a su experiencia y grado de responsabilidad con personas competentes familiarizadas con el propósito del análisis de las mutaciones.
2. Control interno de calidad de las técnicas de determinación y fases del proceso. Además, es aconsejable que el laboratorio evalúe anualmente el porcentaje de mutaciones y las compare con los estándares de su entorno.
3. Control estricto de toda la documentación del laboratorio (registros, mantenimiento y archivo). Es imprescindible que exista una total trazabilidad del proceso, desde la recepción de la muestra hasta el informe final.

Tabla 7 Criterios de calidad para la determinación de mutaciones del gen *EGFR*

Adecuada dotación de recursos humanos e infraestructura
Estandarización de los procedimientos para el procesamiento de muestras y realización de la técnica específica de determinación de mutaciones
Si se usan kits, estos deben estar aprobados para uso diagnóstico por agencias reguladoras y se utilizarán sin modificación del protocolo recomendado
Validación inicial del método de determinación mediante el análisis de, al menos, 20 casos (el 50% deben ser positivos) y obteniendo un 95% de concordancia con un laboratorio de referencia
Validación tras cualquier modificación del método de determinación
Número mínimo de 80 determinaciones moleculares anuales con la misma técnica empleada para la detección de mutaciones de <i>EGFR</i> , para garantizar la suficiencia técnica
Uso de controles apropiados en cada ronda de determinación
Capacitación inicial y formación periódica del personal técnico y facultativo
Participación en programas de garantía de calidad externa (SEAP, UK NEQAS) con resultados óptimos en el 90% de las determinaciones evaluadas
Se recomienda que los laboratorios emprendan procesos de certificación y acreditación de sus actividades

- Gestión apropiada de los equipos, material fungible, etc., así como de las instalaciones y entorno de trabajo, manteniendo espacios asignados que cumplan con las buenas prácticas de laboratorio. Debe existir además un estricto programa de calibración y mantenimiento de todos los instrumentos y equipos.
- Debe existir un protocolo detallado de trabajo para los procedimientos analíticos referentes a la determinación de las mutaciones. Es imprescindible incluir los controles especificados para cada técnica.
- Ha de realizarse un proceso de validación del procedimiento que se vaya a utilizar para la determinación de las mutaciones, así como una validación de los resultados. Este informe de validación se generará de forma previa al inicio de cualquier actividad diagnóstica e incluirá al menos 20 muestras (con un porcentaje aproximado de muestras mutadas del 50%). El nivel de concordancia con el laboratorio o técnica de referencia debe ser de al menos el 95%.

Conflicto de intereses

Para la realización de este artículo se ha contado con el apoyo logístico de la compañía AstraZeneca para la celebración de las reuniones sin que ello haya supuesto ninguna influencia en el desarrollo de los contenidos del mismo.

Agradecimientos

A AstraZeneca, por el apoyo logístico prestado para las reuniones del grupo de expertos.

Bibliografía

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 2010;60:277–300.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer.* 2010;46:765–81.
- La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, Bertuccio P, Negri E, Boyle P, et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol.* 2010;21:1323–60.
- Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larrañaga N, Capocaccia R, Martínez C. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 3:iii30–36.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355:2542–50.
- Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007;7:169–81.
- Gazdar AF. Activating and resistance mutations of *EGFR* in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to *EGFR* tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene.* 2009;28 Suppl1:S24–31.
- Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial). *J Clin Oncol.* 2003;21:2237–46.
- Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch Jr TJ, Prager D, Belani CP, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2003;290:2149–58.
- Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet.* 2005;366:1527–37.
- Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005;353:123–32.
- Kim ES, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, Wu YL, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet.* 2008;372:1809–18.
- Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol.* 2004;22:777–84.
- Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. *J Clin Oncol.* 2004;22:785–94.
- Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, Kaukel E, Roubec J, De Rosa F, et al. Phase III study of erlotinib in combination with

- cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: The Tarceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol.* 2007;25:1545–52.
16. Herbst RS, Prager D, Hermann R, Fehrenbacher L, Johnson BE, Sandler A, et al. TRIBUTE: a phase III trial of erlotinib hydrochloride (OSI-774) combined with carboplatin and paclitaxel chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23:5892–9.
 17. 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.
 18. 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.
 19. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor mutations are common in lung cancer from «never smokers» and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:13306–11.
 20. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.* 2004;64:8919–23.
 21. 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.
 22. Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol.* 2005;23:2493–501.
 23. Rosell R, Viteri S, Molina MA, Benlloch S, Taron M. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as first-line treatment in advanced non small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2010;22:112–20.
 24. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in *EGFR* mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104:20932–7.
 25. 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.
 26. Yang CH, Fukuoka M, Mok T, Wu YL, Thongprasert S, Saijo N, et al. Final overall survival results from a phase III randomized, open-label first-line study of gefitinib versus carboplatin-paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small cell lung cancer in Asia (IPASS). *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 8:viii1.
 27. Lee JS, Park K, Kim SW, Lee DH, Kim HT, Han JY, et al. 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. *J Thorac Oncol.* 2009;4 Suppl 1. Abstract PRS 4.
 28. 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 III trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:121–8.
 29. 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.
 30. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu X, Wang C, et al. Efficacy results from the randomized phase III optimal study comparing first-line erlotinib versus carboplatin plus gemcitabine in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients with *EGFR* activating mutations. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 8:viii122.
 31. Cortes-Funes H, Gomez C, Rosell R, Valero P, Garcia-Giron C, Velasco A, et al. Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol.* 2005;16:1081–6.
 32. 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.
 33. Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, Geenen K, Hirschmann A, Kockx M, et al. *EGFR* fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2009;62:970–7.
 34. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE, Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group. Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol.* 2008;26:983–94.
 35. Lee HJ, Xu X, Choe G, Chung DH, Seo JW, Lee JH, et al. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in non-small cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer.* 2010;68:375–82.
 36. Mathieu A, Weynand B, Verbeken E, Da Silva S, Decaestecker C, Salmon I, et al. Comparison of four antibodies for immunohistochemical evaluation of epidermal growth factor receptor expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2010;69:46–50.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Kitamura A, Hosoda W, Sasaki E, Mitsudomi T, Yatabe Y. Immunohistochemical detection of *EGFR* mutation using mutation-specific antibodies in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16:3349–55.
 40. 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.
 41. Trigo JM, Garrido P, Felip E, Isla D. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small-cell lung cancer (NSCLC): an updated edition. *Clin Transl Oncol.* 2010;12:735–41.
 42. D'Addario G, Früh M, Reck M, Baumann P, Klepetko W, Felip E. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010;21 Suppl 5:v116–9.
 43. Azzoli CG, Baker Jr S, Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer – ASCO. *J Clin Oncol.* 2009;27:6251–66.
 44. Bozzetti C, Tiseo M, Lagrasta C, Nizzoli R, Guazzi A, Leonardi F, et al. Comparison between epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene expression in primary non-small cell lung cancer (NSCLC) and in fine-needle aspirates from distant metastatic sites. *J Thorac Oncol.* 2008;3:18–22.
 45. Italiano A, Vandenbos FB, Otto J, Mouroux J, Fontaine D, Marcy PY, et al. Comparison of the epidermal growth factor receptor gene and protein in primary non-small-cell-lung cancer

- and metastatic sites: implications for treatment with EGFR-inhibitors. *Ann Oncol.* 2006;17:981–5.
46. Daniele L, Cassoni P, Bacillo E, Cappia S, Righi L, Volante M, et al. Epidermal growth factor receptor gene in primary tumor and metastatic sites from non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4:684–8.
 47. Savic S, Tapia C, Grilli B, Ruffe A, Bihl MP, de Vito Barascud A, et al. Comprehensive epidermal growth factor receptor gene analysis from cytological specimens of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer.* 2008;98:154–60.
 48. Gomez-Roca C, Raynaud CM, Penault-Llorca F, Mercier O, Commo F, Morat L, et al. Differential expression of biomarkers in primary non-small cell lung cancer and metastatic sites. *J Thorac Oncol.* 2009;4:1212–20.
 49. Nishimura H, Nakajima T, Itakura M, Shingyoji M, Iizasa T, Kimura H. Successful treatment of lung cancer with gefitinib and *EGFR* mutation status determination using EBUS-TBNA samples in an extremely old patient. *Intern Med.* 2009;48:1905–7.
 50. Solomon SB, Zakowski MF, Pao W, Thornton RH, Ladanyi M, Kris MG, et al. Core needle lung biopsy specimens: adequacy for *EGFR* and *KRAS* mutational analysis. *AJR Am J Roentgenol.* 2010;194:266–9.
 51. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P, Pynegar MJ, Deshmukh M, Rice A, et al. Refining the diagnosis and *EGFR* status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6, and P63, and *EGFR* mutation analysis. *J Thorac Oncol.* 2010;5:436–41.
 52. Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Reguart N, Taron M, Castellà E, Llatjós M, et al. A sensitive method for detecting *EGFR* mutations in non-small cell lung cancer samples with few tumor cells. *J Thorac Oncol.* 2008;3:1224–35.
 53. Zudaire I, Lozano MD, Vazquez MF, Pajares MJ, Agorreta J, Pio R, et al. Molecular characterization of small peripheral lung tumors based on the analysis of fine needle aspirates. *Histol Histopathol.* 2008;23:33–40.
 54. Cheung YC, Chang JW, Hsieh JJ, Lin G, Tsai YH. Adequacy and complications of computed tomography-guided core needle biopsy on non-small cell lung cancers for epidermal growth factor receptor mutations demonstration: 18-gauge or 20-gauge biopsy needle. *Lung Cancer.* 2010;67:166–9.
 55. Otani H, Toyooka S, Soh J, Yamamoto H, Suehisa H, Kobayashi N, et al. Date H Detection of *EGFR* gene mutations using the wash fluid of CT-guided biopsy needle in NSCLC patients. *J Thorac Oncol.* 2008;3:472–6.
 56. Gallegos Ruiz MI, Floor K, Rijmen F, Grünberg K, Rodriguez JA, Giaccone G. *EGFR* and *K-ras* mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded versus frozen specimens. *Cell Oncol.* 2007;29:257–64.
 57. Miyamae Y, Shimizu K, Mitani Y, Araki T, Kawai Y, Baba M, et al. Mutation detection of epidermal growth factor receptor and *KRAS* genes using the smart amplification process version 2 from formalin-fixed, paraffin-embedded lung cancer tissue. *J Mol Diagn.* 2010;12:257–64.
 58. Inamura K, Ninomiya H, Ishikawa Y, Matsubara O. Is the epidermal growth factor receptor status in lung cancers reflected in clinicopathologic features? *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:66–72.
 59. Donati V, Lupi C, Ali G, Corsi V, Viti A, Lucchi M, et al. Laser capture microdissection: a tool for the molecular characterization of histologic subtypes of lung adenocarcinoma. *Int J Mol Med.* 2009;24:473–9.
 60. Whitcomb D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol.* 1999;17:804–7.
 61. Nagai Y, Miyazawa H, Huqun, Tanaka T, Udagawa K, Kato M, et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res.* 2005;65:7276–82.
 62. Laboratorios Clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia. (ISO 15189:2007).
 63. Isler JA, Vesterqvist OE, Burczynski ME. Analytical validation of genotyping assays in the biomarker laboratory. *Pharmacogenetics.* 2007;8:353–68.
 64. Ley 14/2007 de 3 de Julio de 2007, de Investigación Biomédica. BOE número 159. (miércoles 4 de julio de 2007).
 65. Medical Laboratories-Guidance on laboratory implementation of ISO 15189:2003. First edition 2005-02-15.
 66. MM1-A2 Vol. 26 N.º 27. Molecular Diagnostic Methods for Genetic Diseases; Approved Guideline – Second Edition. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute.
 67. Guía Práctica para la utilización de muestras biológicas en investigación biomédica. Instituto Roche 2006. Drug Farma S.L.
 68. Sociedad Española de Anatomía Patológica. <http://www.seap.es>.
 69. United Kingdom National External Quality Assessment Service. <http://www.ukneqas.org.uk>.