



REVISIÓN

Nueva actualización de las recomendaciones para la determinación de biomarcadores predictivos en el carcinoma de pulmón no célula pequeña: Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica[☆]



Dolores Isla^a, María D. Lozano^b, Luis Paz-Ares^c, Clara Salas^d, Javier de Castro^e, Esther Conde^f, Enriqueta Felip^g, Javier Gómez-Román^h, Pilar Garridoⁱ y Ana Belén Enguita^{j,*}

^a Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, IIS Aragón, Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Zaragoza, España

^b Clínica Universidad de Navarra, Sociedad Española de Citología (SEC), Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), Pamplona, España

^c Hospital Universitario 12 de Octubre, Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Madrid, España

^d Hospital Universitario Puerta de Hierro, Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), Madrid, España

^e Hospital Universitario La Paz, Instituto de Investigación Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ), Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Madrid, España

^f Hospital Universitario 12 de Octubre, Instituto de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre (i+12), Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), Madrid, España

^g Hospital Universitario Vall d'Hebron, Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Barcelona, España

^h Universidad de Cantabria, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), Santander, España

ⁱ Hospital Universitario Ramón y Cajal, Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Madrid, España

^j Hospital Universitario 12 de Octubre, Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), Madrid, España

Recibido el 2 de febrero de 2023; aceptado el 8 de febrero de 2023

Disponible en Internet el 28 de marzo de 2023

PALABRAS CLAVE

ALK;
Biomarcadores;
BRAF;
EGFR;

Resumen El carcinoma de pulmón de no célula pequeña (CPNCP) presenta el mayor número de dianas terapéuticas identificadas, algunas de ellas con utilidad terapéutica. En la actualidad se considera imprescindible en estos pacientes determinar las mutaciones de *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* y *MET*, las traslocaciones de *ALK*, *ROS1*, *NTRK* y *RET* y la expresión de PD-L1. El uso de la secuenciación masiva (*next-generation sequencing* [NGS]) facilita el diagnóstico molecular de forma precisa y permite determinar otras mutaciones emergentes, como la mutación de *HER2* y los biomarcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia.

[☆] Traducido de: Clinical and Translational Oncology. Isla D, Lozano MD, Paz-Ares L, Salas C, de Castro J, Conde E, Felip E, Gómez-Román J, Garrido P, Enguita AB. New update to the guidelines on testing predictive biomarkers in non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. Clin Transl Oncol. 2022 Dec 26. doi: 10.1007/s12094-022-03046-9.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: abenguita@hotmail.com (A. Belén Enguita).

<https://doi.org/10.1016/j.patol.2023.02.002>

1699-8855/© 2023 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Anatomía Patológica. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Carcinomas de pulmón no célula pequeña; PD-L1; ROS1

KEYWORDS

ALK;
Biomarkers;
BRAF;
EGFR;
Non-small cell lung cancer;
PD-L1;
ROS1

En este consenso, un grupo de expertos en el diagnóstico y tratamiento del CPNPC seleccionado por la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) ha evaluado la información actualmente disponible y propone una serie de recomendaciones para optimizar la determinación y utilización en la práctica clínica diaria de los biomarcadores.

© 2023 Los Autores. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Anatomía Patológica. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

New update to the guidelines on testing predictive biomarkers in non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology

Abstract Non-small cell lung cancer (NSCLC) presents the greatest number of identified therapeutic targets, some of which have therapeutic utility. Currently, detecting *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* and *MET* mutations, *ALK*, *ROS1*, *NTRK* and *RET* translocations, and PD-L1 expression in these patients is considered essential. The use of next-generation sequencing (NGS) facilitates precise molecular diagnosis and allows the detection of other emerging mutations, such as the *HER2* mutation and predictive biomarkers for immunotherapy responses.

In this consensus, a group of experts in the diagnosis and treatment of NSCLC selected by the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM) have evaluated currently available information and propose a series of recommendations to optimize the detection and use of biomarkers in daily clinical practice.

© 2023 The Authors. Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Anatomía Patológica. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introducción

Los carcinomas de pulmón no célula pequeña (CPNPC) son el grupo de tumores con mayor número de dianas terapéuticas identificadas, algunas de las cuales tienen utilidad clínica desde los estadios más precoces. Sin duda, el diagnóstico molecular correcto es una obligación para ofrecer la mejor opción terapéutica a cada paciente, y debe aplicarse lo más ampliamente posible. Afortunadamente, en los últimos años se han logrado avances importantes tanto en técnicas diagnósticas moleculares como en terapias personalizadas. Este documento pretende ofrecer nuevas recomendaciones para la determinación de biomarcadores predictivos en CPNPC, y será una actualización de las ya publicadas en 2012, 2015 y 2020, fruto de este consenso entre la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP)¹.

Requisitos para el análisis de una muestra biológica óptima

Existen varios tipos de muestras que pueden resultar útiles para el estudio de biomarcadores: biopsias, piezas quirúrgicas o citologías, siempre que tengan una cantidad suficiente de células tumorales y hayan sido correctamente procesadas^{2,3}. La decisión acerca de cuál considerar dependerá de la experiencia y de las tecnologías disponibles en cada laboratorio. Se recomienda en general usar la muestra

más reciente, sobre todo en los pacientes previamente tratados⁴.

Una muestra debe conservarse en formol neutro tampinado al 10% de seis a 48 h en función de su tamaño (6-12 h en muestras pequeñas y 24-48 h en resecciones quirúrgicas), con la presencia de un mínimo de 50-100 células viables para los estudios de inmunohistoquímica (IHQ) y de hibridación fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* [FISH]). Se recomienda evitar el uso de fijadores alternativos, como fijadores mercuriales o alcohólicos. En el caso de las muestras citológicas, el bloque celular se procesa exactamente igual que la biopsia. Las extensiones se fijan en alcohol de 96° y se recomienda teñirlas con Papanicolaou. A partir de esos materiales también se pueden realizar la mayoría de los estudios de biomarcadores⁵. Para las técnicas basadas en la extracción de ácidos nucleicos, se debe conocer el umbral del límite de detección (LDD) del método utilizado. Cada tipo de técnica tiene unos requisitos mínimos diferentes, oscilando entre 30% de células tumorales para la secuenciación directa, 5% para la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* [PCR]) en tiempo real o 20% para la secuenciación de nueva generación (*next-generation sequencing* [NGS])⁶. Además, el tipo de mutaciones puede cambiar el umbral de sensibilidad. Así, se requiere un rango de contenido de ácido nucleico de entre 5 y 10% para detectar mutaciones puntuales y pequeñas inserciones o deleciones, y hasta 30% para analizar correctamente alteraciones en el número de copias⁶. Se recomienda disponer de dos métodos alternativos para

Tabla 1 Biomarcadores esenciales en pacientes con CPNCP

Gen/proteína	Alteración predictiva	Metodología
<i>EGFR</i>	Mutación	PCR: secuenciación de sanger, PCR en tiempo real y NGS
<i>ALK</i>	Reordenamiento	IHQ, FISH, PCR en tiempo real y NGS
<i>ROS1</i>	Reordenamiento	IHQ (cribado), FISH, PCR en tiempo real y NGS
<i>BRAF V600</i>	Mutación	PCR en tiempo real y NGS
<i>PD-L1</i>	Sobreexpresión	IHQ
<i>NTRK</i>	Reordenamiento	IHQ (cribado), PCR en tiempo real y NGS
<i>RET</i>	Reordenamiento	FISH, PCR en tiempo real y NGS
<i>KRAS</i>	Mutación	PCR: secuenciación de sanger, PCR en tiempo real y NGS
<i>MET</i>	Mutación	NGS
	Amplificación	FISH, PCR en tiempo real y NGS

ALK: *anaplastic lymphoma kinase*; *BRAF*: *B-Raf proto-oncogene*; CPNCP: carcinoma de pulmón de células no pequeñas; *EGFR*: *epidermal growth factor receptor*; FISH: hibridación fluorescente *in situ*; IHQ: inmunohistoquímica; *KRAS*: *kirsten rat sarcoma virus*; *MET*: *mesenchymal epithelial transition factor*; NGS: *next-generation sequencing*; *NTRK*: *neurotrophic tyrosine receptor kinase*; PCR: *polymerase chain reaction*; *PD-L1*: *programmed death ligand-1*; *RET*: *rearranged during transfection*; *ROS1*: *c-ros oncogene 1*.

Tabla 2 Otros biomarcadores de interés en pacientes con CPNCP

Gen/proteína	Alteración predictiva	Metodología
<i>HER2</i>	Mutación	NGS
	Amplificación	FISH, PCR en tiempo real, NGS
TMB	Mutaciones	NGS
<i>STK11</i>	Mutación	NGS
<i>KEAP1</i>	Mutación	NGS
MSI	Patrón de hipermutación	IHQ, PCR, NGS

FISH: hibridación fluorescente *in situ*; *HER2*: *human epidermal growth factor receptor 2*; IHQ: inmunohistoquímica; *KEAP1*: *Kelch-like ECH-associated protein 1*; MSI: *microsatellite instability-high*; NGS: *next-generation sequencing*; PCR: *polymerase chain reaction*; *STK11*: *serine/threonine kinase 11*; TMB: *tumour mutation burden*.

realizar una determinación molecular redundante, si fuera necesario.

Respecto al manejo de todo tipo de muestras biológicas, es preciso utilizar protocolos de aprovechamiento que permitan tanto el diagnóstico anatomopatológico como la detección de biomarcadores.

¿Qué biomarcadores deberían analizarse en el CPNCP?

En la [tabla 1](#) se describen los biomarcadores que se deben determinar de forma obligada en pacientes con CPNCP y en la [tabla 2](#) se describen otros biomarcadores de interés en estos pacientes.

EGFR

Las mutaciones en el gen del receptor del crecimiento epidermico (*epidermal growth factor receptor [EGFR]*) se identifican en aproximadamente 10-16% de los CPNCP, siendo más frecuentes en adenocarcinomas y en pacientes no fumadores⁷. Las mutaciones más frecuentes y que se relacionan directamente con la sensibilidad a inhibidores de tirosina-quinasa (*tyrosine kinase inhibitor [TKI]*) anti-*EGFR* afectan al exón 19, y consisten en deleciones que conservan el marco de lectura (*in-frame deletions*) entre los codones 746 y 759 (aminoácidos leucina, arginina, glutamato y

alanina, LREA) (45-50%), seguidas de mutaciones puntuales tipo «cambio de sentido» (*missense point mutations*) en el exón 21 al sustituir el aminoácido leucina por arginina en la posición 858 (L858R) (35-45%). Hay varios *EGFR*-TKI aprobados para el tratamiento de primera línea de pacientes con enfermedad metastásica y mutaciones activadoras de *EGFR* (delección exón 19, L858R)⁸, entre ellos, osimertinib (opción preferida en la mayoría de las guías), gefitinib, erlotinib, afatinib y dacomitinib. Osimertinib está también aprobado como tratamiento adyuvante tras una resección quirúrgica completa en pacientes adultos con mutación activadora de *EGFR*.

Otras mutaciones, como las inserciones en el exón 20, deben ser detectadas debido a sus diferentes efectos y requisitos de tratamiento⁹.

En relación con 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 1% en los CPNCP *EGFR* mutados. Se recomienda utilizar métodos de alta sensibilidad. En cuanto a los informes de resultados, se deben especificar las mutaciones que han sido detectadas y la sensibilidad de los métodos de detección utilizados, entre otros datos³.

Las recomendaciones iniciales de diagnóstico de mutaciones en *EGFR* han sufrido algunos cambios, entre los que destaca el hecho de que cualquier muestra citológica con celularidad y preservación adecuada puede ser utilizada, la

necesidad de utilizar técnicas con elevada sensibilidad en comparación con la secuenciación tipo Sanger como método de referencia y la falta de sensibilidad de la IHQ para el diagnóstico de mutaciones en la práctica clínica⁷.

La mayoría de los pacientes con mutaciones de *EGFR* sensibilizadoras (deleción exón 19 y mutaciones exón 21, L858R) reciben un TKI anti-*EGFR*, siendo el mecanismo molecular de resistencia adquirida más frecuente la mutación *EGFR* T790M en pacientes que reciben un TKI anti-*EGFR* de primera o segunda generación (50-60% de los casos). Para la determinación de esta mutación, se deben utilizar técnicas que sean capaces de detectarla en al menos 5% de células viables, incluyendo los nuevos métodos de PCR digital¹⁰.

Los mecanismos que conducen a la resistencia adquirida contra los TKI varían e incluyen mutaciones intragénicas, amplificación o fusión génica y adaptación funcional con transformación histológica. Por consiguiente, los mecanismos de resistencia adquirida deben monitorizarse mediante biopsia tumoral o biopsia líquida (BL)¹¹.

ALK

Los reordenamientos de la quinasa del linfoma anaplásico (*anaplastic lymphoma kinase* [ALK]) están presentes en 2-5% de los CPNPC avanzados⁹. Estos tumores surgen con mayor frecuencia en pacientes jóvenes y en mujeres con o sin una mínima exposición previa al tabaquismo. La enfermedad suele ser agresiva en su curso clínico y se presenta con eventos tromboembólicos, siendo comunes las metástasis en el hígado, las superficies serosas y el cerebro¹². Los resultados, incluyendo la supervivencia, mejoran notablemente con los TKI específicos de ALK y, en la actualidad, la mediana de supervivencia global de los pacientes en estadio IV suele superar los cinco años. Crizotinib fue el primer fármaco aprobado en este contexto y, desde entonces, los TKI de segunda (ceritinib, alectinib y brigatinib) y tercera generación (lorlatinib) están disponibles en la Unión Europea para el tratamiento de pacientes no tratados y para aquellos que siguen una progresión con inhibidores previos¹³. El beneficio de los fármacos individuales en estos pacientes pretratados depende del mecanismo de resistencia, que con frecuencia implica mutaciones adquiridas en la quinasa ALK¹⁴.

Los tipos de histología elegibles para las pruebas de reordenamiento de *ALK* deben incluir todos los adenocarcinomas, carcinomas con evidencia histológica no escamosa y tumores escamosos en pacientes menores de 50 años o con poca o ninguna exposición al tabaco (es decir, < 10 paquetes al año)¹⁵. Los métodos clave para detectar el reordenamiento del gen *ALK* son IHQ, FISH y NGS. En la actualidad, la IHQ representa un método rápido, fiable y rentable para detectar fusiones *ALK*¹⁶. Su uso en frotis citológico es bastante controvertido, aunque estudios recientes han demostrado la idoneidad del método⁵. Los anticuerpos más utilizados para la detección de reordenamientos son D5F3 (Ventana® *ALK* [D5F3] CDx Assay, Tucson, Arizona, EE. UU.) y 5A4 (Novocastra®, Leica Biosystems®, Buffalo Grove, Illinois, EE. UU.), aunque este último no está incluido en *kit* de diagnóstico¹⁷. El apéndice cecal es adecuado tanto como control positivo como negativo. Debe fijarse y procesarse en las mismas condiciones que la muestra del paciente. Un caso de tumor positivo también se puede utilizar como control.

El papel de la FISH como metodología estándar óptima es actualmente controvertido, aunque existen algoritmos de lectura automatizados aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) que aumentan considerablemente su fiabilidad¹⁸. Cuando hay un resultado positivo de IHQ por una fuerte tinción citoplásmica granular con cualquiera de los anticuerpos 5A4 o D5F3, la confirmación por una segunda técnica no es obligatoria¹⁵. Sin embargo, es muy recomendable en casos que no son concluyentes. Esta redundancia diagnóstica también es útil si se encuentra una tinción FISH inusual¹⁹.

Por último, los métodos basados en NGS y ensayos de ARN son muy específicos y existen numerosos estudios que demuestran su valor para detectar fusiones en pacientes que muestran resultados negativos con otras técnicas¹⁹. Las pruebas de variantes para reordenamientos específicos en *ALK*, que pueden proporcionar información útil en términos de predicción de la respuesta a inhibidores específicos, aún no tienen datos suficientes para su recomendación, aunque podrían ser útiles en el futuro^{9,14,19}. En algunas circunstancias, la biopsia líquida puede reemplazar el análisis de biomarcadores tumorales tisulares, y el perfil *ALK* en el ADN tumoral circulante (ctADN) puede servir como una herramienta de orientación del tratamiento^{20,21}.

Las mutaciones de *ALK* están emergiendo como importantes mecanismos de resistencia a los TKI de *ALK*, y las pruebas de mutación de *ALK* en este escenario pueden proporcionar información crucial para guiar el tratamiento, ya que los TKI de *ALK* de nueva generación muestran diferentes eficacias contra diferentes mutaciones de *ALK*²².

ROS1

El oncogén *c-ros 1* (*c-ros oncogene 1* [*ROS1*]) codifica un receptor con actividad de tirosina quinasa. Los reordenamientos de genes activadores con varios genes asociados se encuentran en aproximadamente 1% de los CPNPC, en particular los que surgen en pacientes jóvenes no fumadores²³. Estos tumores se asocian frecuentemente con eventos trombóticos y tienen propensión a desarrollar metástasis en el sistema nervioso central (SNC)²⁴. Las fusiones de *ROS1* ocurren casi exclusivamente en adenocarcinomas, frecuentemente en aquellos con un componente sólido y células en anillo de sello²⁵. Este perfil histológico también es típico de los tumores que albergan una translocación de *ALK*. De hecho, ambos receptores tienen una similitud de 77% en su dominio de unión al ATP.

Crizotinib fue el TKI inicial aprobado para el tratamiento de primera o segunda línea de pacientes con cáncer de pulmón en estadio IV con reordenamiento de *ROS1*²⁶. Más recientemente se están estudiando TKI como lorlatinib, entrectinib y repotrectinib, pero aún no están aprobados para esta indicación²⁷.

Actualmente se recomienda realizar pruebas de *ROS1* en pacientes con adenocarcinoma de pulmón en estadio avanzado, independientemente de las características clínicas. Las pruebas de *ROS1* no se recomiendan en el carcinoma de células escamosas, excepto en fumadores de grado bajo o leve²⁷. Se utilizan tres técnicas para detectar reordenamientos de *ROS1*: IHQ, técnicas citogenéticas, particularmente FISH⁹, y técnicas moleculares como PCR con transcripción

inversa (*reverse transcription PCR* [RT-PCR]) y particularmente NGS^{15,19}. Generalmente se recomienda IHQ como método de detección y los casos positivos deben confirmarse con otro método ortogonal (por ejemplo, FISH o NGS), debido a la especificidad variable de los dos anticuerpos disponibles comercialmente (D4D6, Cell Signaling Technology y SP384, Ventana Medical Systems®)^{3,15,28}. La muestra para analizar debe incluir al menos 20 células tumorales y cada laboratorio debe validar su propio rango de interpretación^{15,19,28}. Debe disponerse de un control externo, distinto del apéndice cecal, y es recomendable tener también un control tumoral positivo. También se ha considerado como control la existencia de neumocitos reactivos peritumorales positivos. Cabe destacar que la expresión de *ROS1*, típicamente focal, se puede encontrar en hasta un tercio de los tumores sin reordenamientos subyacentes de *ROS1*, pero con otras alteraciones genómicas (por ejemplo, mutaciones de *EGFR*, virus del sarcoma de rata Kirsten (*kirsten rat sarcoma virus* [*KRAS*]), *BRAF* o receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (*human epidermal growth factor receptor 2* [*HER2*]) y reordenamientos de *ALK*^{28,29}. Además, también se ha observado inmunotinción no específica en el subtipo histológico de adenocarcinoma mucinoso infiltrante y en tejido no tumoral³⁰.

FISH es una de las técnicas de referencia. Utiliza sondas separables de dos colores y recomienda un recuento de al menos 50 células tumorales^{15,28,30,31}. Un tumor debe considerarse positivo cuando al menos 50% de las células tumorales tienen señales de rotura (separadas por ≥ 1 diámetro de señal) o señales aisladas de 3' (frecuentemente marcadas con fluorocromo verde)³⁰. Se han descrito falsos positivos y falsos negativos, atribuibles tanto a causas metodológicas como biológicas^{30,32}. Por último, las tecnologías NGS (basadas en ADN o ARN) han mostrado una alta sensibilidad y especificidad en muestras tumorales y también en ctADN^{20,21}.

BRAF

Las mutaciones del protooncogén B-Raf (*B-Raf proto-oncogene* [*BRAF*]) se observan en 2% de los carcinomas de pulmón, son excluyentes con otras y aparecen en su mayoría en adenocarcinomas, sobre todo de tipo papilar (80%)³³. La mutación más frecuente es la *BRAF*^{V600E} (Val600Glu) (50%), predomina en mujeres y puede implicar una mayor agresividad tumoral, mientras que el resto son más habituales en varones o pacientes con hábito tabáquico³⁴. La Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la FDA han aprobado dabrafenib y trametinib tras la eficacia demostrada en los ensayos clínicos fase 2 en pacientes con mutación *BRAF* V600⁹. En el caso de la FDA, la aprobación incluye la necesidad de determinar la mutación con el panel de NGS Oncomine Dx Target Test®³⁵.

Actualmente, se permite cualquier método de PCR con sensibilidad y calidad adecuadas para identificar mutaciones *BRAF*. Sin embargo, no se recomienda llevar a cabo la determinación de esta mutación de forma individual, por lo que se suele estudiar en paneles de NGS, que incluyan como mínimo el análisis de los exones 11 y 15 de ese gen.

PD-L1

Los inhibidores del punto de control inmunitario (ICI), los inhibidores del receptor de la proteína programada-1/ligando 1 de muerte celular programada (*programmed cell death protein-1/ligand-1* [PD-1/PD-L1]) y, en menor medida, los bloqueadores de la proteína 4 asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), han demostrado ser una estrategia eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón, CPNPC y cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), en los últimos 15 años³⁶. En la actualidad, los datos de ensayos clínicos aleatorizados los respaldan como el tratamiento estándar para pacientes con CPNPC localmente avanzado o metastásico, ya sea en monoterapia o en combinación con quimioterapia³⁷. Más recientemente, el bloqueo de PD-1/PD-L1 también ha demostrado ser eficaz en el contexto adyuvante y neoadyuvante en pacientes con enfermedad temprana^{38,39}. Aunque PD-L1 está lejos de ser un biomarcador ideal, la magnitud del beneficio de los bloqueadores de PD-1/PD-L1 en monoterapia está relacionada con la expresión tumoral de PD-L1³⁸. Por el contrario, la expresión de PD-L1 no predice la eficacia de los regímenes combinados de quimioterapia con inhibidores de PD-1/PD-L1, PD-1 con bloqueadores de CTLA-4 o quimioterapia con PD-1 y bloqueadores de CTLA-4³⁷.

La prueba de PD-L1 se basa en IHQ, actualmente es la única prueba predictiva validada. La diversidad de ensayos IHQ y puntos de corte que definen un resultado positivo ha sido una fuente de confusión y ha impulsado una serie de esfuerzos de armonización por parte de la comunidad científica^{40,41}. Las guías actuales para la determinación del biomarcador PD-L1 recomiendan las condiciones preanalíticas habituales de las pruebas IHQ. La expresión de PD-L1 se evalúa determinando el porcentaje de células tumorales con tinción parcial o total de la membrana de cualquier intensidad.

Hay varios clones de PD-L1 disponibles para pruebas IHQ. Los cuatro más utilizados en los laboratorios de patología son 22C3 y 28-8 de Agilent (que comparten la plataforma de diagnóstico Autostainer LINK 48® de Agilent®), SP263 de MedImmune®/Ventana® y SP142 de Spring®/Bioscience®/Ventana® (que comparten la plataforma de diagnóstico Ventana® BenchMark®)¹. Las características de rendimiento de los ensayos 22C3 y 28-8 parecen ser similares según la evaluación en paralelo en cohortes retrospectivas. SP263 y E1L3N, utilizados en la práctica habitual pero no aprobados como pruebas de diagnóstico complementarias, pueden mostrar patrones de tinción comparables a los de los ensayos aprobados cuando se validan correctamente. El único valor atípico consistente ha sido el ensayo SP142, que muestra una menor tinción de células tumorales, a pesar de que el anticuerpo SP142 reconoce epítomos idénticos o casi idénticos como SP263 y E1L3N⁴². El ensayo SP142 se optimizó tanto para la puntuación de células tumorales como de células inmunitarias. Sin embargo, su desempeño como marcador de células inmunitarias se confunde aún más por el escaso acuerdo entre observadores en la interpretación de la expresión de células inmunitarias⁴³.

En cuanto a la selección de muestras, si hay más de un bloque de tejido disponible para un tumor determinado, se debe analizar la muestra más representativa. Se puede ana-

lizar más de un bloque cuando el patólogo determina que se necesitan pruebas adicionales para establecer el estado de PD-L1 del tumor. Si se analizan bloques adicionales de la misma muestra, los resultados de todos los bloques analizados deben combinarse como si estuvieran presentes en un solo bloque de parafina⁴⁴.

No es raro que el único material disponible provenga de muestras citológicas. En estos casos, se debe tener en cuenta que el uso de *kits* IHQ PD-L1 que estén validados para muestras de biopsia fijadas en formalina e incluidas en parafina (*formalin-fixed paraffin-embedded* [FFPE]), y no específicamente para muestras citológicas, pueden ser usados si las muestras citológicas se procesaron de acuerdo con las mismas condiciones preanalíticas que requieren los *kits*⁴⁵.

NTRK

Las fusiones del receptor tirosin-quinasa neurotrófico (*neurotrophic tyrosine receptor kinase* [NTRK]) pueden estar presentes en una gran variedad de tumores, tanto en adultos como en pacientes de edad pediátrica, siendo la frecuencia estimada en CPNPC menor de 1%. La mayoría se encuentran en adenocarcinomas y el gen más frecuentemente implicado es *NTRK1*⁹.

No existen datos clínicos o patológicos característicos de estos pacientes, pero es crucial identificarlos puesto que se dispone de inhibidores del receptor de tropomiosina quinasa (*iTRK*) como larotrectinib y entrectinib, que han sido aprobados por la EMA y la FDA para el tratamiento de tumores con fusión de *NTRK*⁴⁶. A pesar de la marcada eficacia, el desarrollo de resistencias es frecuente, existiendo ya resultados clínicos con *iTRK* de segunda generación⁴⁷.

Para la detección de estas alteraciones se recomiendan dos estrategias: mediante NGS con un panel que incluya el estudio de los tres genes (es decir, *NTRK1*, 2 y 3) y un adecuado número de parejas de reordenamiento o un cribado mediante IHQ con confirmación posterior obligatoria de todos los resultados positivos obtenidos mediante NGS^{48,49}.

RET

Las fusiones del gen reorganizado durante la transfección (*rearranged during transfection* [RET]) se observan en distintos tipos de tumores, siendo su frecuencia en CPNPC de 1-2%, principalmente en adenocarcinomas de pacientes no fumadores. *KIF5B* es la pareja de reordenamiento más frecuente⁵⁰. La presencia de calcificaciones en forma de cuerpos de psamoma debe sugerir fusiones *RET*⁵¹.

Actualmente se dispone de inhibidores selectivos, como selpercatinib y pralsetinib con tasas de respuesta elevadas, aunque su aprobación por las agencias reguladoras para el tratamiento de primera línea en pacientes con enfermedad avanzada está condicionada a los resultados que se obtengan en los estudios fase III en marcha^{52,53}.

El método de detección óptimo de la fusión *RET* es la NGS, pero también se pueden utilizar FISH o PCR⁵⁴. Para diseñar un algoritmo eficiente de búsqueda de fusiones en *RET*, es importante considerar que: i) la NGS basada en el estudio del

ARN es más sensible que si solo se investiga el ADN, y ii) los resultados del FISH pueden ser difíciles de interpretar^{55,56}.

KRAS

Las mutaciones en *KRAS* se identifican en 25% de los pacientes con CPNPC. Se encuentran en todos los subtipos histológicos de adenocarcinoma, aunque son más habituales en la variante mucinosa invasiva. También se detectan en 5% de los tumores escamosos⁵⁷. Su presencia confiere heterogeneidad biológica y clínica, y puede no tener valor pronóstico⁵⁸.

Las mutaciones en *KRAS* se suelen localizar en los codones 12, 13 y 61. Las del codón 12 suponen 80% de casos, y generalmente son transversiones de glicina por cisteína (*KRAS*^{G12C}), valina (*KRAS*^{G12V}), o aspártico (*KRAS*^{G12D}), siendo su frecuencia de 10-13, 5 y 4%, respectivamente⁵⁹. Las mutaciones *KRAS*^{G12C} y *KRAS*^{G12V} se suelen relacionar con el tabaquismo y activan la vía RalGDS/Ral/FLIP, mientras que la mutación *KRAS*^{G12D} es más típica de pacientes no fumadores y parece activar las vías PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK. Además, *KRAS*^{G12C} muestra mayor fosforilación de ERK1/2.

Más de 50% de CPNPC con mutaciones *KRAS* presentan otra mutación, y se pueden establecer tres subgrupos: el subgrupo KP tiene mutaciones en la proteína tumoral 53 (*tumour protein 53* [TP53]) y supone 40% de los casos; el subgrupo KL donde se identifican serina/treonina quinasa 11 (*serine/threonine kinase 11* [STK11]), proteína asociada a ECH de tipo Kelch 1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1* [KEAP1]) o quinasa hepática B1 (*liver kinase B1* [LKB1]) y suele asociarse con bajos porcentajes de PD-L1; y el subgrupo KC caracterizado por la inactivación de CDK2A/B y se asocia con histología mucinosa^{60,61}. Por el contrario, es muy raro encontrar mutaciones de *EGFR*, por lo que las mutaciones de *KRAS* y *EGFR* se consideran mutuamente excluyentes.

La técnica utilizada para identificar mutaciones *KRAS* suele ser la PCR. Hasta el momento, no se recomienda su determinación de forma aislada, pero debería incluirse en los paneles de NGS⁶².

Tras años sin terapias eficaces, se han desarrollado varios inhibidores que han demostrado actividad en ensayos fase II frente a la mutación *KRAS*^{G12C}, como sotorasib y adagrasib^{63,64}; por lo que han sido aprobados por la FDA, aunque el beneficio de estos agentes en monoterapia o en combinación, y a qué pacientes se les debe administrar, se están estudiando en ensayos de fase III.

MET

La activación oncogénica del gen del factor de transición epitelial mesenquimal (*mesenchymal epithelial transition factor* [MET]) en el CPNPC puede ocurrir principalmente por amplificación (1-5%) o por la presencia de mutaciones en el exón 14 (3-4%) que reducen la degradación de la proteína *MET*⁹. En los CPNPC de morfología sarcomatoide, la frecuencia de mutaciones en el exón 14 puede llegar a ser de 22%⁶⁵. Entre 5-20% de los pacientes con mutaciones en *EGFR* adquieren resistencia a *EGFR*-TKI a través de la amplificación de *MET*⁹.

Actualmente, los resultados de varios ensayos clínicos demuestran la actividad y tolerabilidad de los fármacos ora-

les como capmatinib, tepotinib y savolitinb en pacientes con mutaciones en el exón 14 de los cuales capmatinib y tepotinib ya han sido aprobados por la EMA⁹. También se están estudiando anticuerpos conjugados, como telisotuzumab vedotin, anticuerpos biespecíficos como amivantamab y otros en pacientes con amplificación de *MET*.

La técnica de elección para estudiar la amplificación de *MET* es FISH, ya que permite estimar con más precisión el aumento en el número de copias y la amplificación clonal. Debido a la heterogeneidad de las mutaciones en el exón 14, el método de detección óptimo en este caso es la NGS. Se debe utilizar un panel de NGS con suficiente cobertura. Para evitar falsos negativos, se recomienda utilizar un panel de ARN⁹. Se puede detectar la sobreexpresión de *MET* por la amplificación o las mutaciones del gen, pero el valor predictivo de la IHQ de *MET* es todavía controvertido^{7,9}.

HER2

En los CPNCP se puede encontrar sobreexpresión, amplificación y mutaciones de *HER2*, identificándose en 3-38, 3 y 1-4%, respectivamente⁶⁶. Las mutaciones más frecuentes son inserciones del exón 20 (dominio tirosina quinasa), con la inserción/duplicación de los cuatro aminoácidos tirosina, valina, metionina y alanina (YVMA) en el codón 776 (YVMA 776-779 ins) la más frecuente (80-90%)^{66,67}. Estas mutaciones se asocian sobre todo con adenocarcinomas, pacientes no fumadores y mujeres⁶⁸. Los datos más recientes apuntan a que estas mutaciones son los mejores predictores de beneficio clínico a terapias anti-*HER2* (por ejemplo, trastuzumab deruxtecan), independientemente del tipo de mutación y de la presencia de sobreexpresión y amplificación⁶⁷.

En relación con las metodologías para evaluar el estado de *HER2*, la NGS basada en ADN o ARN es el método más apropiado para seleccionar a los pacientes, frente a la IHQ y el FISH⁶⁷. La amplificación se ha descrito como un mecanismo de resistencia tras los tratamientos dirigidos⁶⁶.

Biomarcadores inmunitarios con valor potencial

La carga mutacional tumoral (*tumour mutation burden* [TMB]) se refiere al número de mutaciones somáticas presentes en el tumor, excluyendo polimorfismos y mutaciones germinales de todas las variantes expresadas por megabase en el exoma estudiado. Las mutaciones adquiridas por las células tumorales pueden conducir a una estructura proteica anormal y, en consecuencia, a la expresión de neoantígenos que pueden provocar una respuesta inmune. Curiosamente, no existe una correlación clara entre la expresión de PD-L1 y TMB⁶⁹. Muchos estudios han demostrado que la TMB alta en tumores da como resultado un mejor efecto terapéutico con la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1, incluso en algunos cánceres de pulmón⁶⁹, pero no existe una validación definitiva para el uso de esta inmunoterapia en la práctica clínica. Sin embargo, el análisis exploratorio del ensayo Keynote 042 sugiere que entre los pacientes con tumores que expresan PD-L1 en $\geq 50\%$ de las células, solo aquellos cuyo TMB fue superior a la mediana exhibieron algún beneficio terapéutico con los inhibidores de PD-1/PD-L1 en comparación a la quimioterapia⁷⁰. De hecho, la TMB no es un

predictor confiable del resultado para CPNCP o CPCP tratados con quimioterapia con bloqueo de ICI o regímenes de inmunooncología dual.

Con respecto a las pruebas de TMB, la NGS dirigida se considera una buena alternativa a la secuenciación masiva más compleja, y algunos datos recientes han validado el uso de paneles grandes^{71,72}. Todavía se requieren estudios de armonización para validar la interconectividad entre diferentes estudios de NGS, la heterogeneidad del número de genes incluidos, la cobertura horizontal, la profundidad óptima requerida, el tipo de secuenciación química y los algoritmos bioinformáticos utilizados⁷¹. Si finalmente se aprueban medicamentos basados en los puntos de corte de TMB, los esfuerzos de armonización en curso podrían ser muy útiles. La detección de TMB en la sangre (*blood TMB* [bTMB]) es factible, pero aún faltan datos sólidos sobre su utilidad clínica.

Inestabilidad de microsatélites alta/deficiente reparación de MisMatch (*microsatellite instability-high/deficient MisMatch repair* [MSI-H/dMMR]) predice la eficacia de las ICI en el cáncer gástrico y el cáncer de colon. Sin embargo, la incidencia de MSI-H/dMMR en el cáncer de pulmón es baja⁷³, y se necesita más investigación para determinar si MSI-H/dMMR se puede utilizar como biomarcador predictivo en este contexto. En la actualidad, la medida estándar comúnmente utilizada para valorar MSI-H es el método Bethesda⁷⁴. Es de destacar que los pacientes con MSI-H tienen una mayor probabilidad de tener TMB alta, pero no al revés⁷⁵.

También se ha investigado el papel predictivo de las aberraciones genómicas subyacentes al cáncer de pulmón⁷⁶. Las alteraciones genéticas típicamente percibidas como asociadas a la respuesta inmune incluyen aquellas en *TP53* o *KRAS* y, por el contrario, las aberraciones que afectan a *EGFR*, *ALK*, *ROS*, *RET*, *KEAP1* o *LKB1* tienen menos probabilidades de estar asociadas con el beneficio del bloqueo del punto de control^{61,76}. En cualquier caso, en la actualidad, los datos disponibles no respaldan recomendaciones de tratamiento basadas únicamente en dichas determinaciones genómicas.

Los biomarcadores inflamatorios tumorales, como las firmas genéticas relacionadas o el contenido de células tisulares (subtipos de células T, células mieloides, etc.) están en fase de investigación en la actualidad, ya que son inmunoterapia relacionada con la sangre periférica y biomarcadores de eficacia del microbioma.

Priorizar el uso de muestras biológicas para lograr un diagnóstico preciso

Un porcentaje alto de pacientes con CPNCP se diagnostica en estadios avanzados. Estos pacientes no son subsidiarios de cirugía, por lo que el diagnóstico se realiza mediante biopsias pequeñas y muestras citológicas. El desarrollo de técnicas de imagen que guían la punción de aspiración con aguja fina (PAAF) y la biopsia por aspiración con aguja fina (PAAF-B) permite la obtención de muestras en la cantidad y calidad necesarias para realizar un diagnóstico completo, tanto morfológico como de biomarcadores (fig. 1)⁵.

Las guías internacionales recomiendan, independientemente del tipo de muestra⁷⁷: i) realizar un diagnóstico morfológico preciso (es decir, subtipificar el CPNCP); ii) el

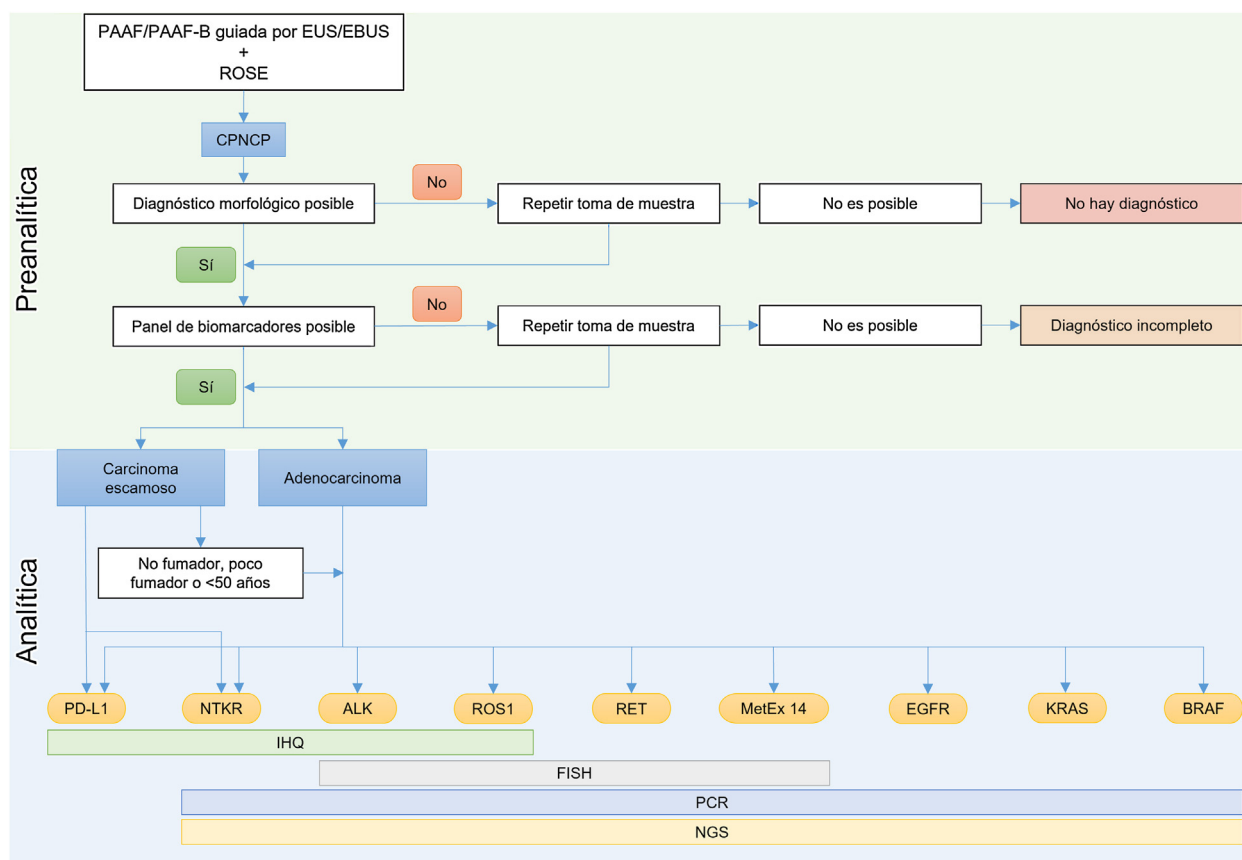


Figura 1 Actualización del algoritmo diagnóstico con muestra pequeña en pacientes con CPNCP. ALK: *anaplastic lymphoma kinase*; BRAF: *B-Raf proto-oncogene*; CPNCP: carcinoma de pulmón de células no pequeñas; EBUS: endobronchial ultrasound; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; EUS: *endoscopic ultrasound*; FISH: hibridación fluorescente *in situ*; IHQ: inmunohistoquímica; KRAS: *kirsten rat sarcoma virus*; MetEx 14: *mesenchymal epithelial transition factor exon 14*; NGS: *next-generation sequencing*; NTRK: *neurotrophic tyrosine receptor kinase*; PAAF: punción por aspiración con aguja fina; PAAF-B: biopsia por aspiración con aguja fina; PCR: *polymerase chain reaction*; PD-L1: *programmed death ligand-1*; ROS1: *c-ros oncogene 1*; RET: *rearranged during transfection*; ROSE: *rapid on site evaluation*.

diagnóstico de CPNCP subtipo no especificado (CPNCP-NE) debe ser menor a 10% de los diagnósticos con muestra pequeña/citología; iii) hacer un uso juicioso de la IHQ/inmunocitoquímica (*immunocytochemistry* [ICC]); y iv) reservar muestra para estudio de biomarcadores.

En el caso de la punción PAAF/PAAF-B guiada por técnicas de imagen, se recomienda el uso de la evaluación rápida *in situ* (*rapid on-site evaluation* [ROSE]). Además de evaluar si una muestra es suficientemente adecuada para facilitar una aproximación diagnóstica, ROSE también permite controlar toda la fase preanalítica y la preparación *in situ* de la muestra para el análisis de los biomarcadores necesarios según la impresión diagnóstica preliminar^{5,78}.

En el caso de las muestras citológicas, se recomienda manejar la muestra *in situ* para procesarla de forma adecuada mediante: i) extensiones con fijación en alcohol de 96° inmediata; ii) extensiones secadas al aire y teñidas con Giemsa®/Diff-Quik®; iii) bloque celular; iv) lavado de aguja en fijador de citología líquida (lo que proporciona buena conservación de ARN).

Cualquiera de estos tipos de muestra citológica es útil para la realización de biomarcadores mediante IHQ/ICC, FISH y técnicas basadas en PCR^{5,79-81}.

La IHQ/ICC ofrece resultados excelentes, que son comparables a los obtenidos mediante biopsia en bloque celular y en extensiones previamente teñidas con Papanicolaou. Las extensiones citológicas no teñidas y teñidas con Giemsa®/Diff-Quik® y Papanicolaou son un sustrato excelente para FISH. Se analizan núcleos enteros, evitando los problemas relacionados con el corte en el material de parafina (es decir, los núcleos no se truncan al cortar los bloques de parafina con el micrótomos, no se pierde la tridimensionalidad). El ADN y ARN es de mejor calidad en muestras no fijadas en formol.

El estudio molecular supone menor problema habitualmente en las piezas quirúrgicas, ya que se cuenta con mayor cantidad de tejido. No por esto está exenta de dificultades, debiendo realizarse una adecuada fijación de las piezas quirúrgicas, no menos de 24-48 h. Deben evitarse áreas de necrosis y realizar las determinaciones sobre muestras que cuenten con, al menos, con 30% de celularidad tumoral viable. Además, debe realizarse un tallado adecuado de las piezas, según protocolos macroscópicos (por ejemplo, *Libro blanco de anatomía patológica*), incluyendo un número suficiente de secciones del tumor. Los tumores de tamaño no mayor a 3 cm deben incluirse en su totalidad. Un

buen estudio histológico es el primer biomarcador, ya que determinará el subtipo histológico y orientará las determinaciones moleculares a realizar (superponible a lo indicado anteriormente para biopsia pequeña y citología). Algunos subtipos histológicos están asociados a distintas alteraciones moleculares, si bien, no debe considerarse excluyente para la determinación de biomarcadores en cáncer de pulmón ninguna variable clínica ni histológica. Otro debate se plantea acerca de la determinación molecular en tumores con diferentes subtipos histológicos (hecho muy frecuente en adenocarcinomas). En estos casos sería conveniente testar en la muestra correspondiente al subtipo más frecuente, añadiendo además la determinación en subtipos secundarios, sobre todo si presentan diferenciación mucinosa, en células claras, anillo de sello o presencia de psammomas.

Para todos los métodos de análisis de biomarcadores citados anteriormente, en la [figura 2](#) se expone una actualización del protocolo a seguir para analizar una muestra biológica de CPNCP.

El papel de la NGS en el CPNCP

En los últimos años se ha incrementado la necesidad de realizar pruebas multigénicas en pacientes con cáncer de pulmón, incluyendo alteraciones de factores oncogénicos, mutaciones o mecanismos de resistencia⁸². La NGS permite secuenciar genes largos y complejos y múltiples genes en una muestra del paciente, con el fin de identificar alteraciones de factores y dianas, minimizando el uso de tejidos en un corto periodo de tiempo, y su uso en la práctica clínica diaria.

La Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) ha establecido recomendaciones sobre si la NGS multigénica tumoral puede utilizarse y cómo para perfilar los cánceres metastásicos siguiendo la clasificación de la Escala de Capacidad de actuación Clínica de Objetivos Moleculares (*Scale for Clinical Actionability of Molecular Targets* [ESCAT])⁸³. La ESCAT es un marco que clasifica la correspondencia entre el fármaco y las alteraciones genómicas, según su capacidad de actuación a tres niveles⁸⁴: i) desde la perspectiva de la salud pública; ii) desde la perspectiva de los centros académicos de investigación clínica; y iii) a nivel de cada paciente individual.

En lo que respecta al cáncer de pulmón, las recomendaciones generales para la práctica diaria consideran que una muestra de tumor o plasma de un paciente con NSCLC no escamoso avanzado se perfila mediante tecnología NGS, con el fin de detectar las alteraciones ESCAT de nivel I (el emparejamiento alteración-fármaco se asocia con un mejor resultado en los ensayos clínicos, listos para uso rutinario). Las pruebas deben incluir *EGFR*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET*, *HER2*, *NTRK*, *KRAS* y *MET*. Además, para los centros de investigación clínica, es muy recomendable realizar la secuenciación multigénica para acceder a fármacos innovadores y ensayos clínicos, a diferencia del uso en pacientes individuales, para los que se esperan pocos hallazgos clínicamente significativos con la NGS⁸³.

La elección del tamaño del panel de NGS dependerá del tipo de alteraciones que se quieran estudiar, del tiempo de respuesta que se requiera y de los costes que se puedan esperar^{85,86}. Se recomienda que cada servicio implemente

el panel que mejor cubra sus necesidades y que se esté muy familiarizado con su cobertura para poder ampliar los estudios moleculares si los resultados iniciales son completamente negativos. En este sentido, para identificar fusiones tratables se recomienda el uso de paneles de ARN debido a que son más sensibles que los que usan exclusivamente ADN⁸⁷.

Los ácidos nucleicos de partida se obtienen principalmente de muestras fijadas en formol e incluidas en parafina (englobando tanto las muestras tisulares como los bloques celulares procedentes de muestras citológicas) o de los ácidos nucleicos presentes en el plasma. En la primera etapa de preparación de la muestra, es fundamental la revisión exhaustiva de todo el material de cada paciente para la selección del bloque parafinado más adecuado, teniendo en cuenta las variables preanalíticas (hay que evitar la fijación insuficiente y todos los fijadores que no sean formol neutro tamponado a 10%) y el porcentaje de celularidad tumoral (punto de corte óptimo: igual o mayor a 30%)⁸⁸.

Las dos aproximaciones metodológicas de NGS más implementadas en la práctica clínica son la amplificación en puente (Illumina®, San Diego, CA, EE. UU.) y la PCR en emulsión (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, MA, EE. UU.), habiéndose descrito fortalezas y debilidades para cada una de ellas. Entre las ventajas de la amplificación por puente de Illumina® se destaca que permite identificar alteraciones «desconocidas» y trabajar con paneles de genes más grandes, mientras que la PCR en emulsión de Thermo Fisher Scientific® requiere menor cantidad de material de partida y emite resultados moleculares con tiempos de respuesta más cortos^{54,89}.

Los hallazgos moleculares obtenidos se deben reflejar en el informe de resultados de la NGS, junto con las conclusiones relevantes en el contexto del tumor de cada paciente. Es muy importante la discusión de los resultados en un comité multidisciplinar, ya que existen cada vez más evidencias de que esta práctica mejora los resultados clínicos⁹⁰.

El papel de la biopsia líquida en el CPNCP

El concepto de biopsia líquida define aquellas pruebas realizadas sobre una muestra de sangre periférica u otro fluido biológico con el objetivo de detectar en ellos células tumorales circulantes (CTC) o fragmentos de ácidos nucleicos procedentes de un tumor como ADN libre circulante (cfADN), ctADN, exosomas circulantes, ARN plaquetario y ARN circulante tumoral (ctARN), aislados en sangre (plasma) o en orina, líquidos pleurales, ascíticos, líquido cefalorraquídeo (LCR) y saliva. La biopsia líquida alcanza una especificidad elevada (de 96%) pero su sensibilidad baja hasta 66%⁹¹, por lo que un resultado negativo no es definitivo y precisa una confirmación sobre el tejido.

Por tanto, su papel es complementario a la biopsia y sus recomendaciones actuales se basan en dos contextos clínicos cuando el tejido sea limitado o insuficiente: a) la determinación de alteraciones moleculares que afectan a la sensibilidad al tratamiento, y b) la determinación de los mecanismos de resistencia tras progresión con un TKI^{21,92}. Un tercer contexto sería la monitorización de la eficacia del tratamiento basada en carga de ctADN para enfermedad mínima residual (EMR), aproximación atractiva pero todavía

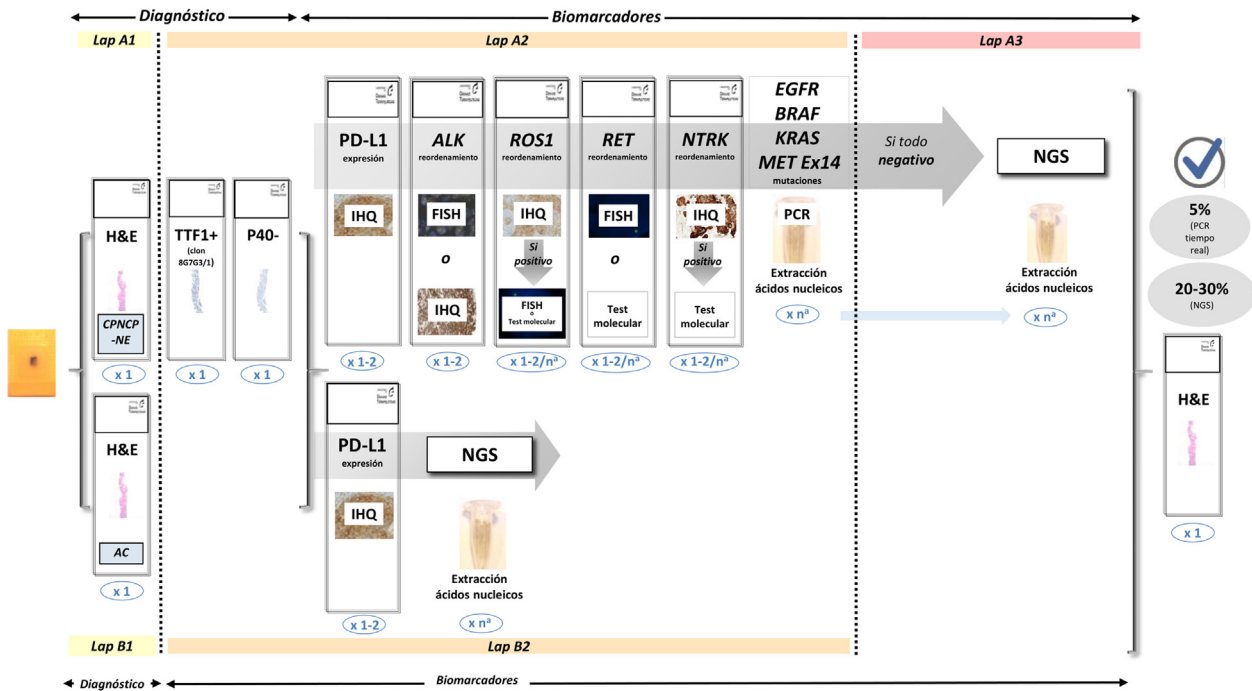


Figura 2 Actualización del protocolo para el análisis de múltiples biomarcadores en una muestra biológica de CPNCP. El número de secciones de cada prueba se muestra en azul. ^aLos requisitos para la extracción de ácido nucleico en pruebas moleculares individuales o paneles genéticos (NGS) son variables. Figura modificada de Conde E, et al. (confidencial, enviado). AC: adenocarcinoma; ALK: *anaplastic lymphoma kinase*; BRAF: *B-Raf proto-oncogene*; CPNCP: carcinoma de pulmón de células no pequeñas; CPNCP-NE: CPNCP subtipo no especificado; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; FISH: hibridación fluorescente *in situ*; H&E: *haematoxylin and eosin*; IHQ: inmunohistoquímica; KRAS: *kirsten rat sarcoma virus*; MET: *mesenchymal epithelial transition factor*; NGS: *next-generation sequencing*; NTRK: *neurotrophic tyrosine receptor kinase*; PCR: *polymerase chain reaction*; PD-L1: *programmed death ligand-1*; RET: *rearranged during transfection*; ROS1: *c-ros oncogene 1*.

no bien establecida desde el punto de vista técnico (es necesario establecer las unidades de cuantificación), pero donde los niveles fluctuantes de ADN circulante no tumoral pueden afectar los resultados⁹². Su uso en diagnóstico precoz presenta dificultades por la baja sensibilidad en enfermedad localizada. Básicamente, el mayor desarrollo se ha hecho en mutaciones de *EGFR*, pero actualmente se está incorporando en otras alteraciones moleculares, aunque la detección de reordenamientos génicos a partir de ARN circulante continúa siendo un reto técnico en vías de resolución²¹.

Algunos requerimientos técnicos de la biopsia líquida son la necesidad de volúmenes de sangre mayores de lo habitual (dos tubos de 10 mL). Es preferible utilizar plasma mejor que suero para la extracción de ácidos nucleicos. El tiempo máximo de espera hasta la extracción del plasma es de dos horas para tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y tres días para tubos con agentes preservadores especiales (Streck®). No se debe congelar la sangre antes de la extracción del plasma. La extracción del ADN debe realizarse con protocolos diseñados para ADN de pequeño tamaño y fragmentado⁹². También recordar que hasta 10% de mayores de 65 años presentan fenómenos de hematopoyesis clonal que podría ser malinterpretada como falsos positivos⁹³.

Se recomienda el uso de técnicas con elevada sensibilidad, como la PCR digital. En el caso de la NGS hay una buena concordancia con los resultados en tejido, excepto para las variantes que se encuentran con una frecuencia alélica menor de 1%⁹⁴, si bien existen herramientas como el

identificador molecular único (*unique molecular identifier* [UMI]) para optimizar la detección. Dos plataformas comerciales de NGS (Guardant360® y FoundationOne Liquid CDx) tienen la aprobación de la FDA para el análisis de tumores sólidos incluyendo carcinomas de pulmón²¹.

En definitiva, la biopsia líquida se irá progresivamente incorporando al diagnóstico molecular, al seguimiento del tratamiento, a la detección de EMR y al diagnóstico precoz en cuanto los estudios prospectivos confirmen su utilidad clínica.

Principales requisitos para implementar un buen control de calidad

Las pruebas moleculares se están convirtiendo en una herramienta de diagnóstico esencial y en una parte del tratamiento estándar en pacientes con cáncer. Tanto los laboratorios como los patólogos se enfrentan a nuevos retos para poder cumplir con este novedoso requisito en la atención al paciente. Los laboratorios de patología deben incorporar métodos fiables para garantizar una calidad y un procesamiento óptimos de las muestras a fin de reducir el riesgo de errores en las pruebas de biología molecular⁹⁵. Además, los patólogos que ejercen deben ir más allá del diagnóstico y la clasificación para producir la información necesaria para guiar el tratamiento de manera precisa y oportuna⁹⁶.

Tabla 3 Ejemplos de esquemas europeos de garantía de calidad

Proveedor	Nombre	Material de partida	Objetivo	Formato
EMQN	Prueba molecular de cfADN en plasma para el gen <i>EGFR</i> (piloto)	Plasma que contiene cfADN	Mutaciones en el gen <i>EGFR</i>	5 casos clínicos simulados con muestras coincidentes
	Prueba molecular en cáncer de pulmón	Mezcla de tejido real y materiales FFPE	Mutaciones en los genes <i>EGFR</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>KRAS</i> y <i>BRAF</i>	10 casos clínicos simulados con muestras coincidentes
	Secuenciación de ADN – NGS	Muestra de ADN derivada de material FFPE	Se puede utilizar cualquier estrategia NGS	1 caso clínico simulado con muestras coincidentes
	Pruebas de panel de oncogenes	Secciones laminadas de materiales FFPE	Mutaciones en los genes <i>EGFR</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>KRAS</i> , <i>HRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>KIT</i> , <i>TP53</i> y <i>BRAF</i>	3 casos clínicos simulados con muestras coincidentes
ESP	<i>ALK</i> FISH	Portaobjetos	Reordenamientos de <i>ALK</i>	5 resecciones, 5 casos digitalizados
	<i>ALK</i> IHQ	Portaobjetos	Reordenamientos de <i>ALK</i>	5 resecciones
	<i>EGFR</i> , <i>KRAS</i> (opcional), <i>BRAF</i> (opcional)	Portaobjetos/secciones laminadas	Mutaciones	10 especímenes de resección, posible línea celular
	<i>ROS1</i> FISH	Portaobjetos	Reordenamientos de <i>ROS1</i>	5 resecciones o posibles líneas celulares, 5 casos digitalizados
	<i>ROS1</i> IHQ	Portaobjetos	Reordenamientos de <i>ROS1</i>	5 resecciones o posibles líneas celulares
	PD-L1	Portaobjetos	Sobreexpresión de PD-L1	8 resecciones (TMAs) y 4 casos digitalizados
	Esquema MET EQA (salto ex 14) para ADN y ARN	Portaobjetos/secciones laminadas	<i>MET</i> exon 14 mutaciones	5 resecciones
NordiQC	PD-L1	Portaobjetos	Sobreexpresión de PD-L1	1 preparación con varios casos y un caso interno
SEAP	ALKanza MODULE	Portaobjetos	Reordenamientos de <i>ALK</i>	1 preparación con varios casos y un caso interno
	<i>EGFR</i>	Portaobjetos/secciones laminadas	Mutaciones de <i>EGFR</i>	4 portaobjetos consecutivos
UKNQEQAS	CPNCP <i>ALK</i> IHQ	Portaobjetos	Reordenamientos de <i>ALK</i> y <i>ROS1</i>	1 portaobjetos con varios casos y uno interno
	CPNCP <i>ALK/ROS1</i> FISH (piloto)	Portaobjetos	Reordenamientos de <i>ALK</i> y <i>ROS1</i>	1 portaobjetos con varios casos y uno interno
	CPNCP PD-L1 IHQ (piloto)	Portaobjetos/secciones laminadas	Sobreexpresión de PD-L1	1 portaobjetos con varios casos y uno interno
Gen QA	Cáncer de pulmón	Portaobjetos/secciones laminadas	<i>EGFR</i> , <i>ALK</i> (opcional), <i>KRAS</i> (opcional), <i>BRAF</i> (opcional)	5-4 casos
	ctADN (piloto) Biomarcadores adicionales del cáncer de pulmón	Plasma Portaobjetos/secciones laminadas	Mutaciones de <i>EGFR</i> <i>ROS1</i> , <i>RET</i> y <i>MET</i> (amplificación)	5 casos 4 casos

ALK: anaplastic lymphoma kinase; *BRAF*: B-Raf proto-oncogene; cfADN: ADN libre circulante; CPNCP: carcinoma de pulmón no célula pequeña; ctADN: ADN tumoral circulante; *EGFR*: epidermal growth factor receptor; FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded; FISH: hibridación fluorescente *in situ*; *HRAS*: Harvey Rat sarcoma virus; IHQ: inmunohistoquímica; *KIT*: proto-oncogene receptor tyrosine kinase; *KRAS*: kirsten rat sarcoma virus; *MET*: mesenchymal epithelial transition factor; NGS: next-generation sequencing; *NRAS*: neuroblastoma ras viral oncogene homolog; PD-L1: programmed death ligand-1; *PIK3CA*: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha; *RET*: rearranged during transfection; *ROS1*: c-ros oncogene 1; TMAs: tissue microarrays; *TP53*: tumour protein 53.

Tabla 4 Propuesta de informe de resultados patológicos

Identificación del paciente y del médico que solicitó la prueba (o, en su defecto, de la persona autorizada)
Diagnóstico patológico
Tipo de muestra presentada
Tratamiento previo (Sí/No)
Momento de la biopsia (inicial/recaída/progresión)
Fecha de recogida de la muestra
El código externo en el caso de los centros de referencia
El medio en el que se recibió la muestra (fresca, congelada, embebida en parafina, etc.)
El origen anatómico de la muestra
La fecha del envío, la fecha de recepción de las muestras y la fecha de emisión de los resultados
El método de prueba de biomarcadores utilizado, especificando las mutaciones detectables u otras anomalías. En el caso de los kits comerciales, deberá indicarse el nombre comercial, el número de lote y si se trata de un producto autorizado para «diagnóstico <i>in vitro</i> »
Nombre de la plataforma utilizada y fecha de caducidad del producto
La calidad de la muestra, especificando el porcentaje de células cancerosas y si la muestra se enriqueció mediante microdissección o macrodissección, así como la concentración y pureza del ADN
Comentarios sobre el carácter adecuado o inadecuado de la muestra
El resultado de la prueba, que define el tipo de anomalía molecular detectada o la ausencia de anomalías moleculares
Identificación del profesional responsable de la prueba (en todas las fases)
Identificación del supervisor del laboratorio (opcional)
Cualquier información adicional o comentario de interés para el médico que solicitó la muestra
Acreditación o participación en programas de calidad

Los resultados de los biomarcadores predictivos a menudo determinan qué terapia (por ejemplo, quimioterapia, inmunoterapia o terapia dirigida) reciben los pacientes. Por lo tanto, los errores de laboratorio pueden derivar en decisiones de tratamiento incorrectas o subóptimas y, en consecuencia, dañar al paciente. Para garantizar pruebas de alta calidad, los laboratorios deben contar con un sistema de garantía de calidad y cumplir con los estándares internacionales relevantes de organizaciones certificadas como la Organización Internacional para la Estandarización (*International Organization for Standardization* [ISO]), el Colegio de Patólogos Estadounidenses (*College of American Pathologists* [CAP]) o el programa de las Enmiendas para el Mejoramiento de Laboratorios Clínicos (*Clinical Laboratory Improvement Amendments* [CLIA]) (tabla 3)⁹⁶⁻¹⁰⁰.

El progreso de la medicina personalizada se ve limitado, en parte, por la falta de documentación europea e internacional normalizada y la insuficiencia de guías para los flujos de trabajo preanalíticos. El proceso preanalítico ha sido examinado recientemente con cierto detalle por el proyecto SPIDIA® (<http://www.spidia.eu>). Los siguientes datos se consideraron necesarios para emitir un informe conforme a las guías de buenas prácticas (tabla 4)⁹⁶: i) identificación del paciente: el paciente debe estar correctamente identificado –los laboratorios exigen un mínimo de dos identificadores únicos del paciente más un identificador único de la muestra en el formulario de solicitud y en el informe–; ii) estilo y contenido de los informes: los informes largos rara vez se leen en su totalidad, y la longitud importa; informes de una página o, mejor aún, de una sola cara, siempre que sean legibles. Debe incluirse una presentación clara de los resultados, la(s) prueba(s) realizada(s) y cualquier limitación de las pruebas (por ejemplo, ¿se analizaron todas las mutaciones posibles o solo una selección de las más comunes?); iii) interpretación: debe describirse el resultado de la prueba y proporcionarse una interpretación adecuada,

sobre todo cuando se trate de una decisión terapéutica; iv) informes integrados: la necesidad de integrar los resultados de los pacientes está ampliamente reconocida. A medida que se generalice el uso de paneles genéticos, los resultados de las distintas pruebas genéticas deberán fusionarse en un único informe. Además, los resultados de varias especialidades patológicas sobre pacientes individuales deben integrarse en el mismo informe.

Los servicios de patología quirúrgica deberían obtener una acreditación en material de garantía de calidad. Todos los laboratorios que prestan servicios de patología molecular deberían tener una acreditación de laboratorio según la normativa ISO 15189 o su equivalente nacional. La acreditación proporciona a los pacientes, al personal, a los usuarios de los servicios y a los comisionados pruebas de la competencia del laboratorio.

Conclusiones

En la actualidad, en pacientes con CPNCP es preciso definir una estrategia diagnóstica genómica clara que permita establecer indicaciones terapéuticas óptimas en cada uno.

Con este objetivo, en el nuevo consenso de la SEOM y la SEAP se proponen las siguientes recomendaciones: i) es mandatorio determinar las mutaciones *EGFR*, *BRAF*, *KRAS* y *MET*, las traslocaciones *ALK*, *ROS1*, *RET* y *NTRK*, y la expresión de PD-L1 en CPNCP; ii) otras determinaciones emergentes como la mutación *HER2* y los biomarcadores inmunes como TMB, MSI, *STK11* y *KEAP1* son recomendables, especialmente si se dispone de NGS; iii) estas determinaciones moleculares se pueden realizar en cualquier estadio de CPNCP o pacientes clínicamente seleccionados y, de forma progresiva, se pueden establecer nuevas indicaciones terapéuticas que precisen de esta información; iv) la disponibilidad de NGS facilita en gran medida el diagnóstico molecular de

forma precisa y eficaz, por lo que su uso debería generalizarse hoy en día; v) la biopsia líquida tiene un papel cada vez mayor en el diagnóstico molecular, especialmente si el tejido es limitado, pero también su papel en el seguimiento del tratamiento es prometedor, tanto en la detección de EMR y diagnóstico precoz; vi) es fundamental analizar de forma óptima la muestra tumoral, realizando una correcta priorización de las determinaciones moleculares que se van a realizar, así como un buen control de calidad en todo el proceso; vii) se necesita que exista una colaboración multidisciplinar adecuada entre los diferentes profesionales implicados para conseguir la máxima calidad en el proceso diagnóstico y en la determinación de la mejor oportunidad terapéutica para cada paciente con CPNCP en cualquier estadio de su enfermedad.

Contribución de los autores

Todos los autores contribuyeron a la elaboración y el diseño del proyecto. Todos los autores participaron en la redacción del primer borrador del manuscrito, comentaron los siguientes borradores y aprobaron la versión final del manuscrito.

Financiación

SEOM y SEAP agradecen el apoyo financiero de este proyecto en forma de colaboración sin restricciones en la logística por parte de AstraZeneca y Roche.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen la asistencia editorial de Beatriz Gil-Alberdi de HealthCo Trials (Madrid, España) en el desarrollo de este manuscrito.

Bibliografía

- Garrido P, Conde E, de Castro J, Gómez-Román JJ, Felip E, Pijuan L, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2020;22:989–1003, <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-019-02218-4>.
- Canberk S, Engels M. Cytology samples and molecular biomarker testing in lung cancer—advantages and challenges. *Virchows Arch*. 2021;478:45–57, <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-020-02995-2>.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*. 2018;13:323–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2017.12.001>.
- Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer:

- ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29:iv192–237, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdy275>.
- Lozano MD, Echeveste JI, Abengozar M, Mejías LD, Idoate MA, Calvo A, et al. Cytology Smears in the Era of Molecular Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer: Doing More With Less. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:291–8, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2017-0208-RA>.
- Angulo B, Conde E, Suárez-Gauthier A, Plaza C, Martínez R, Redondo P, et al. A comparison of EGFR mutation testing methods in lung carcinoma: direct sequencing, real-time PCR and immunohistochemistry. *PLoS One*. 2012;7:e43842, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043842>.
- IASLC. IASLC Atlas of EGFR Testing in Lung Cancer - Guidebook. 2017; [consultado Abr 2022]. Disponible en: <https://www.iaslc.org/research-education/publications-resources-guidelines/iaslc-atlas-egfr-testing-lung-cancer-guidebook>.
- Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019;21:3–17, <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-018-1978-1>.
- Tan AC, Tan DSW. Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *J Clin Oncol*. 2022;40:611–25, <http://dx.doi.org/10.1200/jco.21.01626>.
- Nizamaddin SK, Mehrotra M, Nadhim ASH, Luthra R, Roy-Chowdhuri S. Detection of EGFR T790M Mutation by Droplet Digital Polymerase Chain Reaction in Lung Carcinoma Cytology Samples. *Arch Pathol Lab Med*. 2020, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2019-0411-OA>.
- Reita D, Pabst L, Pencreach E, Guérin E, Dano L, Rimele V, et al. Molecular Mechanism of EGFR-TKI Resistance in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Application to Biological Diagnostic and Monitoring. *Cancers*. 2021;13:4926, <http://dx.doi.org/10.3390/cancers13194926>.
- Zugazagoitia J, Biosca M, Oliveira J, Olmedo ME, Dómine M, Nadal E, et al. Incidence, predictors and prognostic significance of thromboembolic disease in patients with advanced ALK-rearranged non-small cell lung cancer. *Eur Resp J*. 2018;51:1702431, <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.02431-2017>.
- Peng L, Zhu L, Sun Y, Stebbing J, Selvaggi G, Zhang Y, et al. Targeting ALK Rearrangements in NSCLC: Current State of the Art. *Front Oncol*. 2022;12:863461, <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2022.863461>.
- Lin JJ, Riely GJ, Shaw AT. Targeting ALK: Precision Medicine Takes on Drug Resistance. *Cancer Discov*. 2017;7:137–55, <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-1123>.
- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:321–46, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2017-0388-CP>.
- Thunnissen E, Allen TC, Adam J, Aisner DL, Beasley MB, Borczuk AC, et al. Immunohistochemistry of Pulmonary Biomarkers: A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:408–19, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2017-0106-SA>.
- Conde E, Hernandez S, Prieto M, Martinez R, Lopez-Rios F. Profile of Ventana ALK (D5F3) companion diagnostic assay for non-small-cell lung carcinomas. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16:707–13, <http://dx.doi.org/10.1586/14737159.2016.1172963>.
- Conde E, Suárez-Gauthier A, Benito A, Garrido P, García-Campelo R, Biscuola M, et al. Accurate identification

- of ALK positive lung carcinoma patients: novel FDA-cleared automated fluorescence in situ hybridization scanning system and ultrasensitive immunohistochemistry. *PLoS One*. 2014;9:e107200, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0107200>.
19. Conde E, Rojo F, Gómez J, Enguita AB, Abdulkader I, González A, et al. Molecular diagnosis in non-small-cell lung cancer: expert opinion on ALK and ROS1 testing. *J Clin Pathol*. 2022;75:145–53, <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207490>.
 20. Mack PC, Banks KC, Espenschied CR, Burich RA, Zill OA, Lee CE, et al. Spectrum of driver mutations and clinical impact of circulating tumor DNA analysis in non-small cell lung cancer: Analysis of over 8000 cases. *Cancer*. 2020;126:3219–28, <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.32876>.
 21. Rolfo C, Mack P, Scagliotti GV, Aggarwal C, Arcila ME, Barlesi F, et al. Liquid Biopsy for Advanced NSCLC: A Consensus Statement From the International Association for the Study of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2021;16:1647–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2021.06.017>.
 22. Mondaca S, Lebow ES, Namakydoust A, Razavi P, Reis-Filho JS, Shen R, et al. Clinical utility of next-generation sequencing-based ctDNA testing for common and novel ALK fusions. *Lung Cancer*. 2021;159:66–73, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2021.06.018>.
 23. Drilon A, Jenkins C, Iyer S, Schoenfeld A, Keddy C, Davare MA. ROS1-dependent cancers - biology, diagnostics and therapeutics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18:35–55, <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-020-0408-9>.
 24. Muñoz-Unceta N, Zugazagoitia J, Manzano A, Jiménez-Aguilar E, Olmedo ME, Cacho JD, et al. High risk of thrombosis in patients with advanced lung cancer harboring rearrangements in ROS1. *Eur J Cancer*. 2020;141:193–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2020.10.002>.
 25. Boland JM, Wampfler JA, Jang JS, Wang X, Erickson-Johnson MR, Oliveira AM, et al. Pulmonary adenocarcinoma with signet ring cell features: a comprehensive study from 3 distinct patient cohorts. *Am J Surg Pathol*. 2014;38:1681–8, <http://dx.doi.org/10.1097/pas.0000000000000280>.
 26. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014;371:1963–71, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1406766>.
 27. Remon J, Pignataro D, Novello S, Passiglia F. Current treatment and future challenges in ROS1- and ALK-rearranged advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev*. 2021;95:102178, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102178>.
 28. Conde E, Hernandez S, Martinez R, Angulo B, De Castro J, Collazo-Lorduy A, et al. Assessment of a New ROS1 Immunohistochemistry Clone (SP384) for the Identification of ROS1 Rearrangements in Patients with Non-Small Cell Lung Carcinoma: the ROSING Study. *J Thorac Oncol*. 2019;14:2120–32, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2019.07.005>.
 29. Wiesweg M, Eberhardt WEE, Reis H, Ting S, Savvidou N, Skiba C, et al. High Prevalence of Concomitant Oncogene Mutations in Prospectively Identified Patients with ROS1-Positive Metastatic Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2017;12:54–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.08.137>.
 30. Bubendorf L, Büttner R, Al-Dayel F, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, et al. Testing for ROS1 in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Archiv*. 2016;469:489–503, <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-016-2000-3>.
 31. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36:911–9, <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2017.76.7293>.
 32. Zhao J, Chen X, Zheng J, Kong M, Wang B, Ding W. A genomic and clinicopathological study of non-small-cell lung cancers with discordant ROS1 gene status by fluorescence in-situ hybridisation and immunohistochemical analysis. *Histopathology*. 2018;73:19–28, <http://dx.doi.org/10.1111/his.13492>.
 33. Planchard D, Johnson BE. BRAF Adds an Additional Piece of the Puzzle to Precision Oncology-Based Treatment Strategies in Lung Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:796–7, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2018-0088-ED>.
 34. Nguyen-Ngoc T, Bouchaab H, Adjei AA, Peters S. BRAF Alterations as Therapeutic Targets in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10:1396–403, <http://dx.doi.org/10.1097/jto.0000000000000644>.
 35. Odogwu L, Mathieu L, Blumenthal G, Larkins E, Goldberg KB, Griffin N, et al. FDA Approval Summary: Dabrafenib and Trametinib for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancers Harboring BRAF V600E Mutations. *Oncologist*. 2018;23:740–5, <http://dx.doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0642>.
 36. Doroshow DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjatic S, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18:345–62, <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-021-00473-5>.
 37. Reck M, Remon J, Hellmann MD. First-Line Immunotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2022;40:586–97, <http://dx.doi.org/10.1200/jco.21.01497>.
 38. Felip E, Vallieres E, Zhou C, Wakelee H, Bondarenko I, Sakai H, et al. LBA9 - IMPower010: Sites of relapse and subsequent therapy from a phase III study of atezolizumab vs best supportive care after adjuvant chemotherapy in stage IB-IIIA NSCLC. *Ann Oncol*. 2021;32 suppl.5:S1283–S346, <http://dx.doi.org/10.1016/annonc/annonc741>.
 39. Forde PM, Chaft JE, Smith KN, Agnostou V, Cottrell TR, Hellmann MD, et al. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378:1976–86, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1716078>.
 40. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, Ranger-Moore J, Jansson M, Kulangara K, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project. *J Thorac Oncol*. 2017;12:208–22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.2228>.
 41. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1302–11, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.013>.
 42. Rimm DL, Han G, Taube JM, Yi ES, Bridge JA, Flieder DB, et al. A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA*. 2017;3:1051–8, <http://dx.doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0013>.
 43. Vennapusa B, Baker B, Kowanetz M, Boone J, Menzl I, Bruey JM, et al. Development of a PD-L1 Complementary Diagnostic Immunohistochemistry Assay (SP142) for Atezolizumab. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27:92–100, <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000594>.
 44. Cheung CC, Barnes P, Bigras G, Boerner S, Butany J, Calabrese F, et al. Fit-For-Purpose PD-L1 Biomarker Testing For Patient Selection in Immuno-Oncology: Guidelines For Clinical Laboratories From the Canadian Association of Pathologists-Association Canadienne Des Pathologistes (CAP-ACP). *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27:699–714, <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000800>.
 45. Wang H, Agulnik J, Kasymjanova G, Wang A, Jiménez P, Cohen V, et al. Cytology cell blocks are

- suitable for immunohistochemical testing for PD-L1 in lung cancer. *Ann Oncol.* 2018;29:1417–22, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdy126>.
46. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* 2020;21:271–82, [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(19\)30691-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(19)30691-6).
 47. Garrido P, Hladun R, de Álava E, Álvarez R, Bautista F, López-Ríos F, et al. Multidisciplinary consensus on optimising the detection of NTRK gene alterations in tumours. *Clin Transl Oncol.* 2021;23:1529–41, <http://dx.doi.org/10.1007/s12094-021-02558-0>.
 48. Hechtman JF. NTRK insights: best practices for pathologists. *Mod Pathol.* 2022;35:298–305, <http://dx.doi.org/10.1038/s41379-021-00913-8>.
 49. Rojo F, Colomer R, López-Ríos F, Bautista F, Álvarez R, de Álava E, et al. [Multidisciplinary consensus on optimizing the detection of NTRK gene alterations in tumours]. *Rev Esp Patol.* 2021;54:250–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.patol.2021.05.003>.
 50. Belli C, Anand S, Gainor JF, Penault-Llorca F, Subbiah V, Drilon A, et al. Progresses Toward Precision Medicine in RET-altered Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2020;26:6102–11, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-20-1587>.
 51. Mukhopadhyay S, Pennell NA, Ali SM, Ross JS, Ma PC, Velcheti V. RET-rearranged lung adenocarcinomas with lymphangitic spread, psammoma bodies, and clinical responses to cabozantinib. *J Thorac Oncol.* 2014;9:1714–9, <http://dx.doi.org/10.1097/jto.0000000000000323>.
 52. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383:813–24, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2005653>.
 53. Gainor JF, Curigliano G, Kim DW, Lee DH, Besse B, Baik CS, et al. Pralsetinib for RET fusion-positive non-small-cell lung cancer (ARROW): a multi-cohort, open-label, phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2021;22:959–69, [http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045\(21\)00247-3](http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(21)00247-3).
 54. Belli C, Penault-Llorca F, Ladanyi M, Normanno N, Scoazec JY, Lacroix L, et al. ESMO recommendations on the standard methods to detect RET fusions and mutations in daily practice and clinical research. *Ann Oncol.* 2021;32:337–50, <http://dx.doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.021>.
 55. Conde E, Hernandez S, Sanchez E, Regojo RM, Camacho C, Alonso M, et al. Pan-TRK Immunohistochemistry: An Example-Based Practical Approach to Efficiently Identify Patients With NTRK Fusion Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2021;145:1031–40, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2020-0400-RA>.
 56. Yang SR, Aypar U, Rosen EY, Mata DA, Benayed R, Mullaney K, et al. A Performance Comparison of Commonly Used Assays to Detect RET Fusions. *Clin Cancer Res.* 2021;27:1316–28, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-20-3208>.
 57. Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94:1623–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013>.
 58. Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, John W, Paz-Ares L, Schmid-Bindert G. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung cancer.* 2018;53–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.013>.
 59. Veluswamy R, Mack PC, Houldsworth J, Elkhoully E, Hirsch FR. KRAS G12C-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Biology Developmental Therapeutics, and Molecular Testing. *J Mol Diagn.* 2021;23:507–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.02.002>.
 60. Scheffler M, Ihle MA, Hein R, Merkelbach-Bruse S, Scheel AH, Siemanowski J, et al. K-ras Mutation Subtypes in NSCLC and Associated Co-occurring Mutations in Other Oncogenic Pathways. *J Thorac Oncol.* 2019;14:606–16, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.013>.
 61. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2019;19:495–509, <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0179-8>.
 62. Reck M, Carbone DP, Garassino M, Barlesi F. Targeting KRAS in non-small-cell lung cancer: recent progress and new approaches. *Ann Oncol.* 2021;32:1101–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.001>.
 63. Ou SI, Jänne PA, Leal TA, Rybkin II, Sabari JK, Barve MA, et al. First-in-Human Phase I/IB Dose-Finding Study of Adagrasib (MRTX849) in Patients With Advanced KRAS(G12C) Solid Tumors (CRYSTAL-1). *J Clin Oncol.* 2022;40:2530–8, <http://dx.doi.org/10.1200/jco.21.02752>.
 64. Skoulidis F, Li BT, Dy GK, Price TJ, Falchook GS, Wolf J, et al. Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *N Engl J Med.* 2021;384:2371–81, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2103695>.
 65. Liu X, Jia Y, Stoopler MB, Shen Y, Cheng H, Chen J, et al. Next-Generation Sequencing of Pulmonary Sarcomatoid Carcinoma Reveals High Frequency of Actionable MET Gene Mutations. *J Clin Oncol.* 2016;34:794–802, <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2015.62.0674>.
 66. Zhao J, Xia Y. Targeting HER2 Alterations in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Comprehensive Review. *JCO Prec Oncol.* 2020;4:411–25, <http://dx.doi.org/10.1200/po.19.00333>.
 67. Li BT, Smit EF, Goto Y, Nakagawa K, Udagawa H, Mazières J, et al. Trastuzumab Deruxtecan in HER2-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386:241–51, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa2112431>.
 68. Mazières J, Barlesi F, Filleron T, Besse B, Monnet I, Beau-Faller M, et al. Lung cancer patients with HER2 mutations treated with chemotherapy and HER2-targeted drugs: results from the European EUHER2 cohort. *Ann Oncol.* 2016;27:281–6, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdv573>.
 69. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015;348:124–8, <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa1348>.
 70. Herbst RS, Lopes G, Kowalski DM, Nishio M, Wu YL, de Castro Junior G, et al. LBA79 - Association between tissue TMB (tTMB) and clinical outcomes with pembrolizumab monotherapy (pembro) in PD-L1-positive advanced NSCLC in the KEYNOTE-010 and -042 trials. *Ann Oncol.* 2019;30:v916–7, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdz394.077>.
 71. Büttner R, Longshore JW, López-Ríos F, Merkelbach-Bruse S, Normanno N, Rouleau E, et al. Implementing TMB measurement in clinical practice: considerations on assay requirements. *ESMO open.* 2019;4:e000442, <http://dx.doi.org/10.1136/esmoopen-2018-000442>.
 72. Ramos-Paradas J, Hernández-Prieto S, Lora D, Sanchez E, Rosado A, Caniego-Casas T, et al. Tumor mutational burden assessment in non-small-cell lung cancer samples: results from the TMB(2) harmonization project comparing three NGS panels. *J Immunother Cancer.* 2021;9, <http://dx.doi.org/10.1136/jitc-2020-001904>.
 73. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med.* 2016;22:1342–50, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4191>.
 74. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Nat Cancer Inst.* 2004;96:261–8, <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djh034>.

75. Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao N, Gatalica Z, Marshall J. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med.* 2018;7:746–56, <http://dx.doi.org/10.1002/cam4.1372>.
76. Guaitoli G, Tiseo M, Di Maio M, Friboulet L, Facchinetti F. Immune checkpoint inhibitors in oncogene-addicted non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10:2890–916, <http://dx.doi.org/10.21037/tlcr-20-941>.
77. Ettinger DS, Wood DE, Aggarwal C, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, et al. NCCN Guidelines Insights: Non-Small Cell Lung Cancer, Version 1.2020. *J Natl Compr Canc Netw.* 2019;17:1464–72, <http://dx.doi.org/10.6004/jnccn.2019.0059>.
78. Manzo JL, Cuda J, Pantanowitz L, Xing J, Yu J, Beasley HS, et al. Clinical trial cytology: Use of on-site evaluation of small biopsy and FNA samples for clinical trials and biomarker research studies. *Cancer Cytopathol.* 2018;126, <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.22001>.
79. Malapelle U, Pepe F, Pisapia P, Altamari A, Bellecicine C, Brunnström H, et al. Reference standards for gene fusion molecular assays on cytological samples: an international validation study. *J Clin Pathol.* 2021;76:47–52, <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2021-207825>.
80. Lozano MD, Abengozar-Muela M, Echeveste JI, Subtil JC, Bertó J, Gúrpide A, et al. Programmed death-ligand 1 expression on direct Pap-stained cytology smears from non-small cell lung cancer: Comparison with cell blocks and surgical resection specimens. *Cancer Cytopathol.* 2019;127:470–80, <http://dx.doi.org/10.1002/cncy.22155>.
81. Tejerina E, Garca Tobar L, Echeveste JI, de Andrea CE, Vigliar E, Lozano MD. PD-L1 in Cytological Samples: A Review and a Practical Approach. *Front Med.* 2021;8:668612, <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2021.668612>.
82. Yates LR, Seoane J, Le Tourneau C, Siu LL, Marais R, Michiels S, et al. The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary. *Ann Oncol.* 2018;29:30–5, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx707>.
83. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2020;31:1491–505, <http://dx.doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.014>.
84. Mateo J, Chakravarty D, Dienstmann R, Jezdic S, Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N, et al. A framework to rank genomic alterations as targets for cancer precision medicine: the ESMO Scale for Clinical Actionability of molecular Targets (ESCAT). *Ann Oncol.* 2018;29:1895–902, <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdy263>.
85. SEAP-IAP. Libro Blanco de la Anatomía Patológica en España 2021. 7.^a ed., 2021; ISBN: 978-84-09-30732-6. Disponible en: www.seap.es/libros-blancos.
86. Donoghue MTA, Schram AM, Hyman DM, Taylor BS. Discovery through clinical sequencing in oncology. *Nat Cancer.* 2020;1:774–83, <http://dx.doi.org/10.1038/s43018-020-0100-0>.
87. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Non-Small Cell Lung Cancer Version 3.2022. [consultado 16 Mar 2022]. Disponible en: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf.
88. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin JM, Pfeifer J, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017;19:341–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.011>.
89. Yohe S, Thyagarajan B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2017;141:1544–57, <http://dx.doi.org/10.5858/arpa.2016-0501-RA>.
90. Lamping M, Benary M, Leyvraz S, Messerschmidt C, Blanc E, Kessler T, et al. Support of a molecular tumour board by an evidence-based decision management system for precision oncology. *Eur J Cancer.* 2020;127:41–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2019.12.017>.
91. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *J Clin Oncol.* 2018;36:1631–41, <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2017.76.8671>.
92. Rolfo C, Mack PC, Scagliotti GV, Baas P, Barlesi F, Bivona TG, et al. Liquid Biopsy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Statement Paper from the IASLC. *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer.* 2018;13:1248–68, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.030>.
93. Razavi P, Li BT, Brown DN, Jung B, Hubbell E, Shen R, et al. High-intensity sequencing reveals the sources of plasma circulating cell-free DNA variants. *Nature medicine.* 2019;25:1928–37, <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0652-7>.
94. Schwaederlé MC, Patel SP, Husain H, Ikeda M, Lanman RB, Banks KC, et al. Utility of Genomic Assessment of Blood-Derived Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2017;23:5101–11, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-2497>.
95. Dufraing K, Fenizia F, Tortlakovic E, Wolstenholme N, Deans ZC, Rouleau E, et al. Biomarker testing in oncology - Requirements for organizing external quality assessment programs to improve the performance of laboratory testing: revision of an expert opinion paper on behalf of IQNPath ABSL. *Virchows Arch.* 2021;478:553–65, <http://dx.doi.org/10.1007/s00428-020-02928-z>.
96. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, Normanno N, Edsjö A, Rouleau E, et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol.* 2014;67:923–31, <http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202404>.
97. Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, Francis GD, Fulton R, Gilks CB, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine: Part 4: Tissue Tools for Quality Assurance in Immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25:227–30, <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000469>.
98. Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, Francis GD, Gilks CB, Hall JA, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine: Part 1: Fit-for-Purpose Approach to Classification of Clinical Immunohistochemistry Biomarkers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25:4–11, <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000451>.
99. ISO 15189:2012 Medical laboratories - Requirements for quality and competence (2012).
100. Tortlakovic EE, Cheung CC, D'Arrigo C, Dietel M, Francis GD, Gilks CB, et al. Evolution of Quality Assurance for Clinical Immunohistochemistry in the Era of Precision Medicine - Part 2: Immunohistochemistry Test Performance Characteristics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25:79–85, <http://dx.doi.org/10.1097/pai.0000000000000444>.