

Anatomía patológica y patología molecular del cáncer de pulmón

J. JAVIER GÓMEZ-ROMÁN

Dpto. Anatomía Patológica, Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla" Servicio Cántabro de Salud. Santander

Avda. de Valdecilla s/n
E39008 SANTANDER (Cantabria)

e-mail: apagrj@humv.es

RESUMEN

El manejo de los pacientes con carcinomas de pulmón está variando de manera drástica gracias a la aparición de nuevas técnicas de exploración de estructuras poco accesibles hasta ahora como las adenopatías mediastínicas mediante punciones con aspiración guiadas por ecografía. Este hecho ha provocado que los pacientes sean estratificados de manera mucho más segura y por tanto puedan ser tratados con fármacos previamente a la cirugía. Por otro lado, existen ya actualmente fármacos con mecanismos de acción diferentes a la quimioterapia clásica que son aplicados de manera rutinaria.

Sin embargo este nuevo arsenal terapéutico muestra una novedad respecto a los anteriores como es que su aplicación debe ir precedida de un estudio morfológico y molecular exhaustivo, que estratifique a los pacientes de acuerdo a un diagnóstico histológico preciso y a unas características moleculares predictivas de respuesta. Este es el camino a seguir, la aplicación de tratamientos individualizados, pero este camino debe ir asociado a la creación de equipos de profesionales implicados en el diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón. En este equipo multidisciplinar el patólogo deberá ser consciente del alcance de sus diagnósticos y el neumólogo y el oncólogo deberán conocer las limitaciones del análisis morfológico o molecular. Todos ellos a su vez compartirán inquietudes como la creación y mantenimiento de biobancos. Sólo con un apoyo decidido y mutuo y una integración al mismo nivel de todos podrán ser realidad los tratamientos a la carta.

PALABRAS CLAVE: Carcinoma de pulmón; Histología; EGFR, Angiogénesis; Biobanco.

Introducción

Una de las características fundamentales del cáncer es que se trata de una enfermedad heterogénea en muchos aspectos, entre los cuales está el tipo celular implicado, la mezcla de células neoplásicas y acompañantes; las diferentes alteraciones genéticas que lo provocan que son distintas incluso entre zonas dentro de un mismo tumor o su diferente comportamiento clínico. Esto es así incluso entre casos similares desde el punto de vista morfológico y que son diagnosticados en la misma etapa clínico patológica.

Por tanto uno de los retos principales en el estudio y en el tratamiento del cáncer (no sólo del pulmonar) es la resolución de la heterogeneidad que existe tanto entre diferentes tumores como dentro de un tumor concreto e intentar ofrecer mejores clasificaciones que estratifiquen a los pacientes de acuerdo con parámetros pronósticos, predictivos y terapéuticos, es decir lo que ha sido llamado el tratamiento "a la carta".

El nacimiento y desarrollo de toda la tecnología molecular y de la microinformática ha hecho albergar grandes esperan-



zas en este sentido aunque a pesar de todo ello no deberíamos dejar de lado el sentido común y una aproximación racional y coste-efectiva al problema del diagnóstico y tratamiento del paciente oncológico en la asistencia diaria.

Hoy en día, es el simple examen de microscopía óptica convencional de una muestra obtenida por broncoscopia el que se aplica de forma rutinaria en todos los hospitales del mundo. Este sencillo procedimiento de obtención de imágenes histológicas es similar en gran manera al que se utilizaba a comienzos del siglo XX y permite llegar a un grado de fiabilidad diagnóstica muy elevado a un precio muy asequible, con la dedicación de los especialistas en Anatomía Patológica. Así, con la simple técnica del examen macroscópico, la inclusión en parafina y una tinción de rutina como la hematoxilina eosina, somos capaces de obtener parámetros como el diagnóstico histológico (tipo tumoral), grado de diferenciación, estadio de extensión local de la enfermedad y a distancia mediante el examen de los ganglios linfáticos incluidos en la pieza quirúrgica. Esta es la base sobre la que debemos de construir todo el edificio que poseerá tanta complejidad como deseemos. A partir de aquí será cuando debamos aplicar las nuevas tecnologías a nuestro alcance, disponer de biobancos y un espectro de técnicas moleculares que pueden abarcar desde el análisis más sencillo de inmunohistoquímica o hibridación in situ fluorescente hasta la técnica más compleja basada en microarrays o plataformas de fluídica o proteómica, pero siempre de manera individualizada. Si utilizamos indiscriminadamente estas técnicas sin una clara indicación morfológica y clínica estaremos incrementando exponencialmente el coste por paciente sin obtener un beneficio claro para él ni para el sistema sanitario.

Me atrevería a decir que toda técnica dirigida al diagnóstico del cáncer que no utilice una base morfológica de discriminación inicial tendrá el grave defecto de no disponer de la fiabilidad que éste proporciona. Por poner un único ejemplo, la distinción entre las áreas de neumonía organizada que muchas veces rodean un tumor de las verdaderas zonas neoplásicas es muchas veces imposible con el examen macroscópico. Si el material que obtenemos para diagnóstico no es examinado morfológicamente nos podemos encontrar con que estamos analizando un proceso inflamatorio en lugar de uno tumoral desde el punto de vista molecular y lo

que es más grave, los datos erróneos serán utilizados para tratar pacientes. A veces el querer ahorrar en la base provoca errores incorregibles.

No perdamos de vista por tanto que antes de realizar cualquier tipo de técnica sofisticada molecular en el ámbito asistencial se precisa un enfoque racional que permita primero ofrecer un diagnóstico seguro, rápido y económico para proporcionar posteriormente otros datos pronósticos y predictivos que tendrán grandes implicaciones terapéuticas.

En esta revisión me centraré en el valor del diagnóstico histológico certero como elemento fundamental para el tratamiento, así como en diferentes alteraciones moleculares, sobre todo las que tienen hoy una implicación directa en la terapéutica.

Tipos histológicos del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte oncológica en países occidentales. A efectos terapéuticos, histológicos y de comportamiento biológico, los tumores epiteliales malignos pulmonares han sido clasificados clásicamente en dos grandes grupos. Carcinomas de células pequeñas o microcíticos (15-25%) y carcinomas no microcíticos (75-85% del total), que incluyen principalmente al carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. Es en este último grupo, el de los carcinomas no microcíticos donde a pesar de una franca mejora en los procedimientos diagnósticos y de mejores tratamientos, gran número de ellos son todavía diagnosticados en etapas avanzadas y su supervivencia no ha cambiado de forma significativa en los últimos 20 años.

Hasta hace muy poco tiempo, la subclasificación morfológica del carcinoma no microcítico no había demostrado consecuencias desde el punto de vista pronóstico o terapéutico¹ con lo que era y es práctica habitual de muchos patólogos, neumólogos y oncólogos el clasificar las biopsias como carcinomas no microcíticos sin preocuparse excesivamente por profundizar y buscar estigmas de diferenciación escamosa o glandular.

Este hecho es francamente llamativo porque realmente, parece difícil de comprender que algo que se ha demostrado eficaz en prácticamente toda la economía como es la clasificación histológica de las neoplasias no tuviera su interés en el caso de los carcinomas no microcíticos de pulmón. De hecho, los tipos morfológicos tienen diferentes orígenes embriológicos y nacen en compartimentos anatómicos bien diferenciados. Por tanto, en buena lógica estas características deberían manifestarse en forma de activación o defectos en rutas moleculares, transporte de drogas o metabolismo celular diferentes².

Sin embargo, la situación ha cambiado de manera drástica a la luz de datos actuales que revelan un beneficio de determinados regímenes de quimioterapia sólo cuando son aplicados frente a estirpes histológicas específicas³.

Los tres tipos histológicos del carcinoma no microcítico pulmonar tal y como los describe la OMS son el Carcinoma escamoso o epidermoide, el Adenocarcinoma y el Carcinoma de células grandes⁴.

El Carcinoma epidermoide o de células escamosas, ha sido considerado clásicamente como el más frecuente, aunque esta situación ha cambiado a favor del adenocarcinoma debido a múltiples causas relacionadas con el hábito tabáquico (menor concentración de alquitrán y la aparición de filtro en los cigarrillos entre otros factores). Este cambio epidemiológico no es aparente todavía en toda la geografía e incluso dentro de un mismo país como España se observan regiones donde es patente ya el liderazgo del adenocarcinoma muy cercanas a otras regiones donde se da la situación contraria⁵.

Los dos términos son correctos a la hora de referirse a este tipo tumoral, el de carcinoma epidermoide se correspondería con el remedo de una diferenciación tisular epitelial semejante a la epidermis cutánea, término quizá más genérico que el de escamoso que se refiere a la capa de Malpighi o estrato escamoso de la misma estructura cutánea.

En los casos donde el tumor se encuentra bien diferenciado y aparecen áreas de queratinización, puentes intercelulares y perlas córneas en el análisis histológico⁴ el diagnóstico no

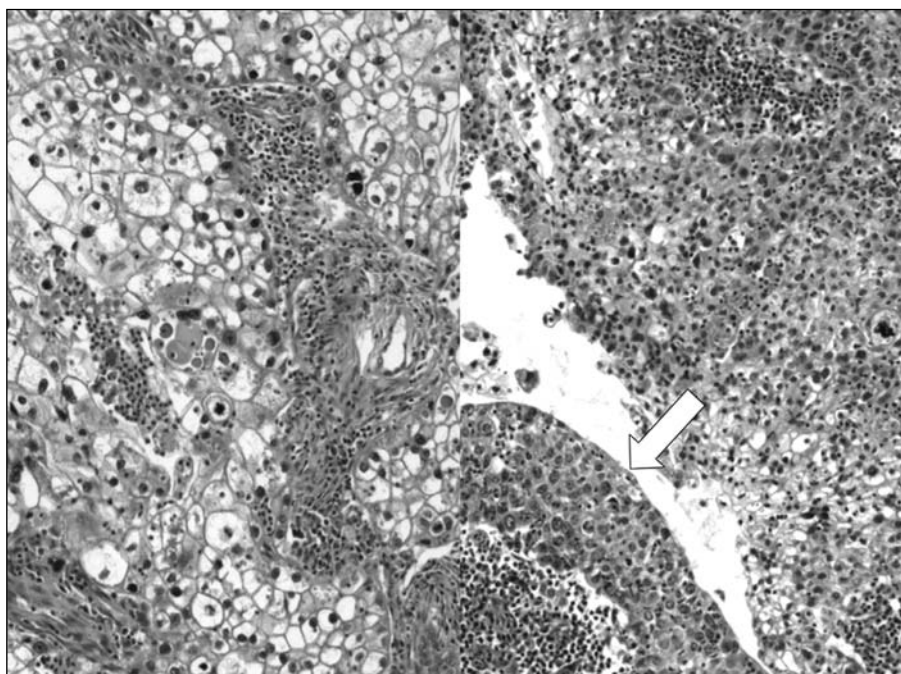


Figura 1: Carcinoma epidermoide de células claras con glóbulos eosinófilos intracitoplasmáticos. (A: H&E Aumentos originales 40x). En la esquina inferior izquierda (flecha) existe una zona de aspecto escamoso que proporciona el diagnóstico de carcinoma epidermoide (B: H&E Aumentos originales 40x)

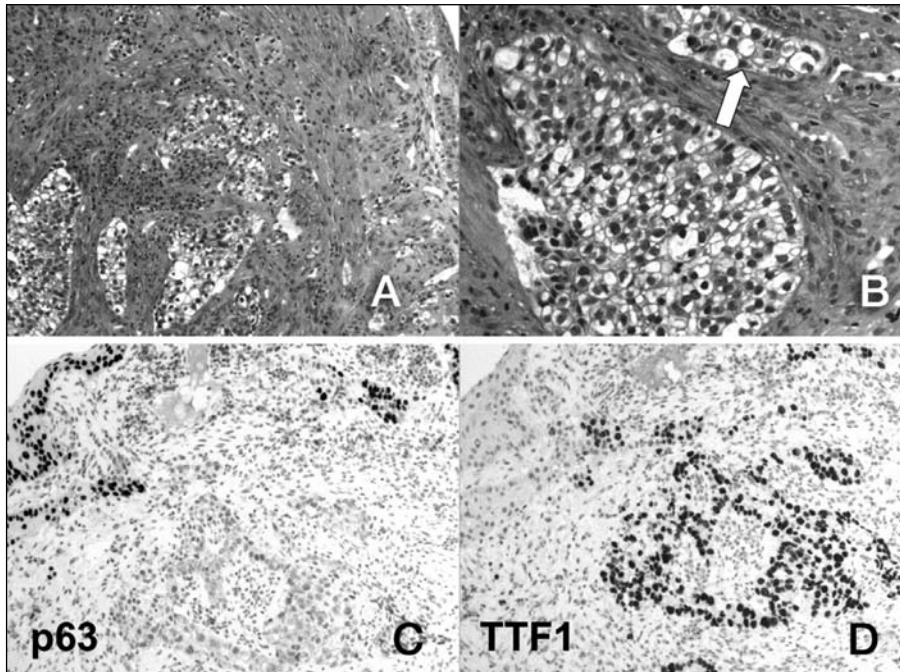


Figura 2: Adenocarcinoma en biopsia bronquial. Nidos celulares cohesivos en la submucosa bronquial formados por células claras que adoptan focalmente un patrón tubular (flecha) (A: H&E Aumentos originales 40x) (B: H&E Aumentos originales 100x). Nótese la negatividad para la proteína p63 por inmunohistoquímica (C: p63 Aumentos originales 40x) y la positividad en los núcleos para TTF1 (D: TTF1 Aumentos originales 40x).

suele presentar problemas. Sin embargo, existen casos donde resulta difícil, si no imposible demostrar fenómenos de queratinización sobre todo en biopsias pequeñas, muchas veces artefactadas, obtenidas por broncoscopia.

El grado de diferenciación tumoral se establece en función del grado de estratificación, la presencia de puentes intercelulares, y queratinización celular aislada con formación de perlas córneas. La diferencia entre el moderado o pobremente diferenciado está en que si el 20% de la muestra presenta queratinización o formación de perlas córneas, el tumor se considera como moderadamente diferenciado. Por tanto, requiere del examen de la pieza quirúrgica no debiéndose aplicar en biopsias diagnósticas.

Por otro lado, es relativamente común el encontrar células secretoras de mucina aisladas en este tipo de carcinoma. Estas células se ven hasta en un 10% de carcinomas de tipo hilar y en un 60% de los de tipo periférico. Es decir, más de un 50% de carcinomas epidermoides periféricos podrían ser clasificados en sentido estricto como carcinomas adenoescamo-

sos aunque es necesaria que la diferenciación glandular sea marcada para diagnosticarlo como tal. Probablemente este subtipo histológico que se considera como poco frecuente sea más habitual que lo estimado en las estadísticas.

Por otro lado, existen variantes morfológicas como el carcinoma epidermoide de células claras (Figura 1) o el acantolítico que es preciso conocer y que pueden plantear problemas de diagnóstico diferencial. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, el carcinoma epidermoide es negativo para las citoqueratinas 7 y 20 y positivo frente a las citoqueratinas 5/6, con negatividad para el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1) y positividad nuclear para la proteína de ciclo celular p63, si bien estas características inmunohistoquímicas distan mucho de ser absolutas.

El **Adenocarcinoma** es un grupo tumoral más heterogéneo que incluye desde las neoplasias periféricas de origen en las áreas más distales del parénquima pulmonar hasta los tumores más centrales de origen en células de revestimiento de la vía aérea. La característica morfológica más relevante es la

formación de estructuras tubulares o glandulares y/o la presencia de material de secreción sobre todo en las formas más sólidas peor diferenciadas⁴ (Figura 2). Los adenocarcinomas pulmonares suelen ser tumores muy heterogéneos desde el punto de vista arquitectural y así las áreas centrales suelen ser de patrón sólido, las intermedias de patrón papilar y las periféricas muestran un crecimiento bronquioloalveolar. Esta heterogeneidad suele permitir el diagnóstico diferencial con neoplasias metastásicas que muestran un patrón arquitectural más homogéneo. El crecimiento bronquioloalveolar no es privativo de los tumores pulmonares primarios ya que existen casos metastásicos que adoptan dicho patrón. Por tanto no debe ser utilizado como criterio para diagnosticar un caso como de origen primario o metastásico.

Es preciso recalcar que el Carcinoma bronquioloalveolar propiamente dicho es un tipo específico tumoral que se caracteriza por presentar un crecimiento no destructivo y no infiltrativo a lo largo de los septos alveolares y que puede ser de tipo mucinoso o no mucinoso (Figura 3)⁴. Nunca muestra

extensión extrapulmonar, incluyendo adenopatías en el mediastino y por ello en los casos donde existe el patrón difuso bilateral es susceptible de tratamiento mediante trasplante pulmonar bilateral sin que exista riesgo de extensión fuera del injerto⁶. Estas características lo hacen radicalmente diferente del adenocarcinoma convencional que puede mostrar un patrón de crecimiento bronquioloalveolar prominente y que ha sido catalogado por algunos autores como adenocarcinoma mínimamente invasivo o incluso adenocarcinoma in situ (Figura 4).

En el momento que un tumor se diagnostica como adenocarcinoma se pone de manifiesto que existe un crecimiento infiltrativo y una posibilidad de afectación metastásica. Si se considera de esta manera restrictiva, el carcinoma bronquioloalveolar es un tumor muy poco frecuente y de un comportamiento claramente diferente al adenocarcinoma convencional. Esto también provoca que el diagnóstico de Carcinoma bronquioloalveolar no deba ser realizado con seguridad en material citológico ya que el principal criterio es el arquitectural y no citológico. Además tampoco debe ser cla-

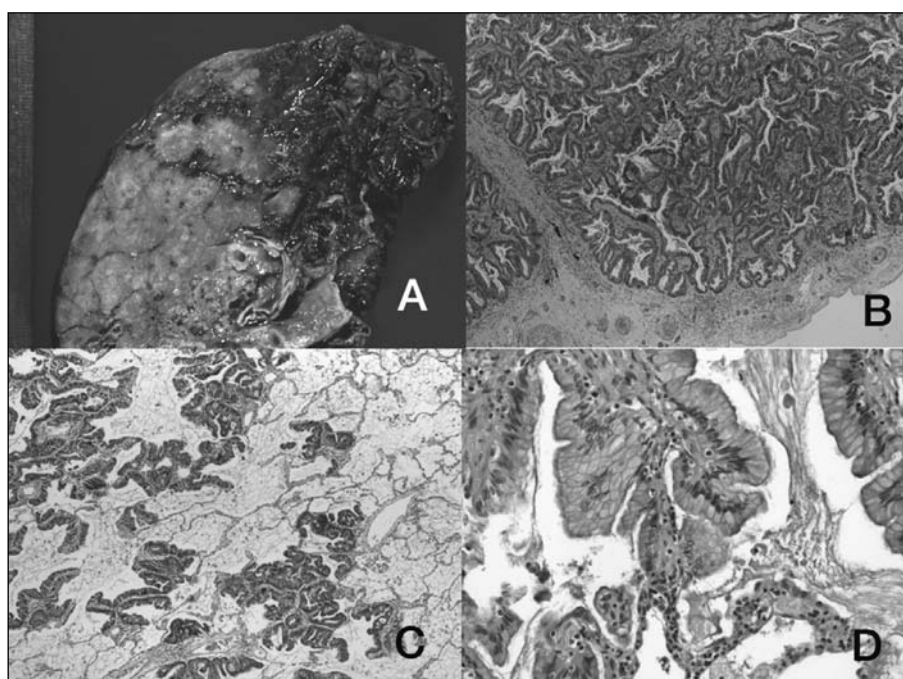


Figura 3: Carcinoma bronquioloalveolar. Imagen macroscópica de consolidación de aspecto neumónico (A). El carcinoma bronquioloalveolar muestra bordes expansivos y no infiltra pleura visceral ni septos interlobulillares (B: H&E Aumentos originales 40x). Puede ser de tipo histológico no mucinoso (C: Aumentos originales 40x) o mucinoso (D: H&E Aumentos originales 100x) con crecimiento lepidico, en mariposa a partir del espacio intersticial.

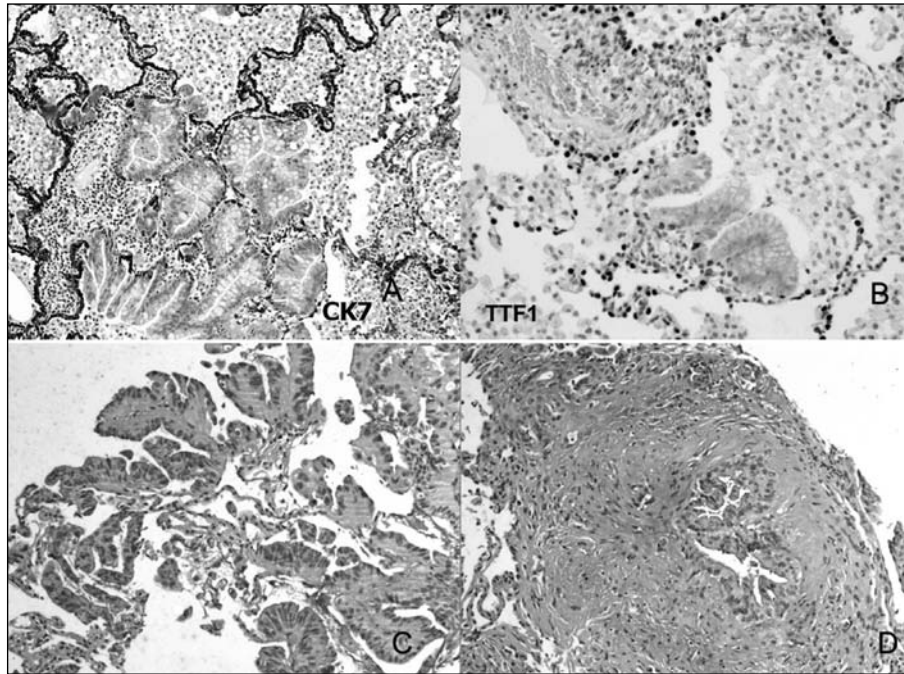


Figura 4: Desde el punto de vista inmunohistoquímico el carcinoma bronquioloalveolar es negativo o débilmente positivo para la citoqueratina 7 (A: CK7 Aumentos originales 40x) y negativo asimismo para el TTF1 (B: TTF1 Aumentos originales 100x). En material de biopsia no es recomendable establecer con seguridad el diagnóstico de carcinoma bronquioloalveolar porque si aparecen lesiones infiltrativas debería ser diagnosticado como adenocarcinoma con patrón de crecimiento bronquioloalveolar prominente (C y D: Diferentes zonas de la misma biopsia transbronquial. C: H&E Aumentos originales 100x. D: H&E Aumentos originales 100x).

sificado categóricamente mediante biopsia transbronquial ya que podría corresponder a una zona de crecimiento bronquioloalveolar en un adenocarcinoma clásico. El diagnóstico debe ser sugerido como posibilidad en estos casos.

El patrón inmunohistoquímico básico del adenocarcinoma es el de positividad para citoqueratina 7 y negatividad para la citoqueratina 20 con positividad asimismo nuclear para el Factor de transcripción tiroideo 1 (TTF1).

Un problema de diagnóstico diferencial desde el punto de vista inmunohistoquímico lo da de nuevo el carcinoma bronquioloalveolar ya que suele ser positivo para la citoqueratina 20 y negativo para el TTF1 (Figura 4) con lo que puede simular una neoplasia metastásica de origen digestivo.

Por último el **Carcinoma de células grandes**, es el subtipo menos frecuente. Lo consideramos como una neoplasia altamente indiferenciada que no permite su clasificación como un adenocarcinoma o un carcinoma escamoso. En casos donde únicamente se dispone de biopsias parciales (mediastinos-

copias o broncoscopias) pueden existir discrepancias cuando se evalúa la totalidad de la masa tumoral en la pieza quirúrgica ya que es posible que aparezcan estigmas de cualquiera de los otros tipos de manera focal que permitan su clasificación. Sin embargo, no todos los tumores que se encuadran dentro de este epígrafe muestran criterios diagnósticos morfológicos mal definidos.

Es el caso del gran grupo de los Carcinomas sarcomatoides (Figura 5) que incluye a su vez a los carcinomas pleomórficos, el carcinoma de células gigantes, el carcinosarcoma el carcinoma fusocelular y el blastoma pulmonar, cada uno con sus características morfológicas distintivas. El carcinoma semejante a linfoepitelioma y otros tumores asociados a Virus de Epstein-Barr⁷. El carcinoma basaloide, a pesar de poder mostrar zonas de diferenciación escamosa focal debe ser considerado asimismo como una variante del Carcinoma de células grandes y por último el Carcinoma neuroendocrino de células grandes.⁴

Especial importancia tiene el comprender el espectro de neoplasias con diferenciación neuroendocrina. Este es un campo que tradicionalmente ha sido controvertido y de difícil explicación. Cualquier clasificación de las neoplasias en anatomía patológica se suele basar en tres características, en los patrones arquitecturales, en la histogénesis tumoral o pueden tener una aproximación mixta. En las clasificaciones que usan la histogenética como punto de partida, existe un gran problema como es la asimilación muchas veces de los términos histogénesis y diferenciación. La histogénesis se refiere al proceso a través del cual agregados de células embrionarias adquieren un cúmulo de características tales que permiten la determinación de su lugar de origen y su destino eventual en el embrión maduro. La diferenciación, sin embargo, hace referencia a las características estructurales y funcionales que las células adquieren durante el proceso.

En muchos textos, estos dos términos se han hecho equivalentes ya que se pensaba que la producción de ciertos materiales eran un monopolio de ciertas células con una derivación histogenética generalmente relacionada con una hoja embrionaria única. Sin embargo, se han demostrado funciones similares en células histogenéticamente distintas y se ha comprobado como la diferenciación celular es un hecho totalmente elástico que depende en muchas ocasiones del entorno en que se encuentran determinadas células. De hecho y aplicando esta teoría existen muchos tumores que no muestran un aspecto neuroendocrino y que sin embargo producen sustancias de carácter neuroendocrino.

Por otro lado, la visión de la cinética tumoral muestra como los patrones de diferenciación celular pueden mantenerse inestables en la vida del tumor (es decir, el fenotipo tumoral puede ser variable). Por ejemplo, el 6% de los carcinomas de

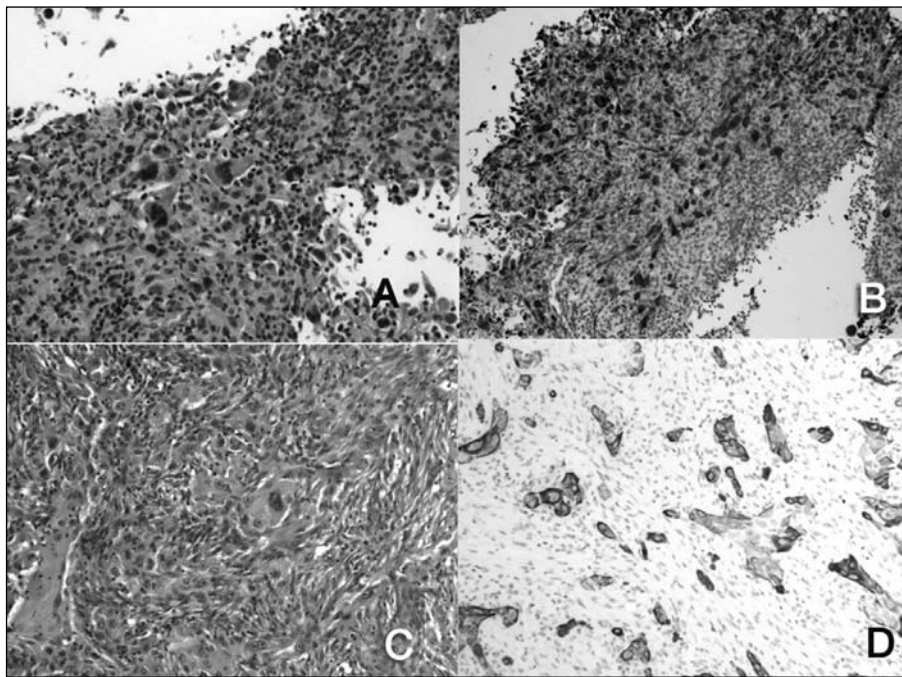


Figura 5: Imágenes de carcinomas sarcomatoides. Biopsia que muestra la presencia de células sueltas en la submucosa con gran componente inflamatorio. Las células son grandes discohesivas y con elevado grado de atipia (A: H&E Aumentos originales 100x). Mediante inmunohistoquímica para citoqueratinas demuestran reactividad (B: Cóctel de citoqueratinas AE1/AE3 Aumentos originales 100x). En otro caso, células similares con depósito de material eosinófilo extracelular (C: H&E Aumentos originales 100x) Mediante inmunohistoquímica reaccionan frente a citoqueratinas (D. AE1/AE3 Aumentos originales 100x). En este último caso se demostró la reactividad para osteonectina en células epiteliales con lo que el diagnóstico fue de carcinosarcoma.

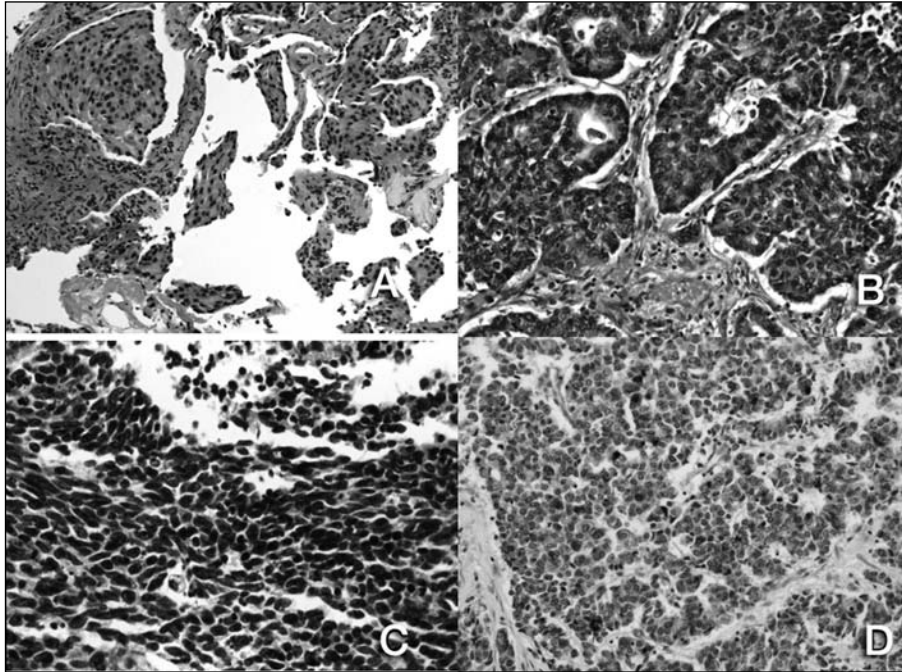


Figura 6: Tumores neuroendocrinos. Biopsia de un paciente con un carcinoide típico. Células que adoptan un patrón cohesivo rosetoide (A: H&E Aumentos originales 40x). Carcinoma neuroendocrino de células grandes con patrón rosetoide (B: H&E Aumentos originales 100x). Carcinoma de células pequeñas con morfología clásica de células en grabno de avena (C: H&E Aumentos originales 100x). Inmunohistoquímica en un caso de carcinoma de células pequeñas con tinción focal para Sinaptofisina (D: Sinaptofisina Aumentos originales 100x).

células pequeñas no tratados muestran características mixtas en el microscopio óptico, mientras que tras el tratamiento, el 39% de los tumores muestran características distintas de las iniciales.

El espectro de diferenciación neuroendocrina (Figura 6) comienza con el **Carcinoide típico** o Carcinoide maduro, Se trata de un tipo tumoral que ocurre en una población más joven que los demás (media de edad de 46,4 años). Las células son muy semejantes unas a otras, de citoplasma claro o granular eosinófilo, núcleo vesiculoso y nucleolo visible. No aparecen necrosis ni mitosis. Entre un 5 y un 10% metastatizan en los ganglios linfáticos regionales. La supervivencia es del orden del 90-95% a 5 años. La producción de un síndrome carcinoide se ha descrito en un 2-7% estando asociada en un 86% de los casos con la existencia de metástasis hepáticas.

El **carcinoide atípico** supone alrededor de un 11-24% de los tumores neuroendocrinos. La edad media de aparición es de 33,2 años, y el tamaño medio en el momento del diagnóstico

es ligeramente mayor que el de los carcinoides típicos. Son centrales o periféricos, aunque más frecuentemente (>60% de los casos) periféricos. Suelen estar bien delimitados macroscópicamente, mostrando patrones de crecimiento similar al anterior, pero con focos de necrosis no extensa, pleomorfismo marcado y actividad mitótica (entre 2 y 10 mitosis/2 milímetros cuadrados). Los nidos organoides están separados normalmente por bandas fibrosas que pueden ser muy prominentes. Estos nidos muestran frecuentemente empalizada periférica. La diferencia desde el punto de vista molecular con los carcinoides típicos está en que las células que forman parte de los carcinoides atípicos poseen actividad telomerasa lo que les confieren inmortalidad mientras que las de los carcinoides típicos no poseen dicha enzima activa⁸.

El **Carcinoma neuroendocrino de células grandes** se conocía antiguamente como variante de células intermedias del carcinoma de células pequeñas. Sin embargo, su comportamiento se acerca más a los carcinomas de células grandes



con lo que ha quedado encuadrado como una variante del carcinoma de células grandes. El patrón arquitectural suele ser sólido y se observan amplias zonas de necrosis y formación de empalizada.. A veces puede observarse fenómeno de arrastre (fenómeno de Azzopardi) semejante al que se observa en el carcinoma de células pequeñas. El núcleo es vesicular y contienen un nucleolo prominente. Además se observa abundante citoplasma. El índice mitótico mayor de 10 mitosis/2 mm² y la presencia de zonas confluentes de necrosis son los mejores parámetros que distinguen este tumor del carcinoma atípico.

El **carcinoma de células pequeñas** o carcinoma microcítico comprende alrededor de un 15% de todos los cánceres de pulmón. Presenta una estrecha asociación con el tabaco y se caracteriza por un crecimiento difuso de células de pequeño tamaño con núcleo hiper cromático finamente granular oval o fusiforme, con nucleolo poco llamativo, membrana nuclear fina, citoplasma escaso, poco teñido y a veces finamente granular . El estroma es escaso, vascular con rara infiltración linfocitaria. Suele verse necrosis de células individuales y figuras mitóticas abundantes. Ocasionalmente las células forman rosetas, pseudorosetas, trabéculas y nidos de diferentes tamaños. Puede mostrar áreas extensas de necrosis por coagulación, con depósitos de ADN en las paredes elásticas de los vasos necróticos (Fenómeno de Azzopardi).

Una variante que existe y que es necesario conocer es el Carcinoma combinado que presenta componentes de carcinoma de células pequeñas y de células grandes que puede ser de adenocarcinoma, carcinoma epidermoide o carcinoma neuroendocrino de células grandes. Esta última asociación (carcinoma de células pequeñas con carcinoma neuroendocrino de células grandes) es relativamente común cuando se examinan múltiples cortes histológicos de piezas quirúrgicas con lo que probablemente exista una zona gris con una frontera difícil de establecer entre ambos.

Los marcadores inmunohistoquímicos en el caso de los tumores neuroendocrinos son básicamente los mismos en todo el espectro y son la enolasa neuronal específica (ENS) que tiene una baja especificidad, la cromogranina, sinaptofisina y el CD56. Por otro lado, estos tumores reaccionan frente al TTF1, aunque este parámetro que inicialmente se estimó co-

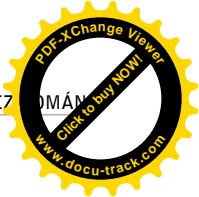
mo altamente específico no lo es tanto al haberse descrito casos de carcinomas de células pequeñas de origen vesical y genital femenino que reaccionan frente a él.

Problemas diagnósticos

A pesar de que los criterios diagnósticos están generalmente bien establecidos, existen una serie de retos que se plantean en el análisis anatomopatológico y que el neumólogo debe conocer para no malinterpretar los hallazgos de las biopsias. Estos son: **El tamaño de la muestra de biopsia**, que debido a los problemas inherentes al procedimiento de la broncoscopia es limitado. Ese pequeño tamaño implica además que se deba aprovechar de una manera racional el tejido, indicando únicamente las técnicas inmunohistoquímicas y moleculares que ven a resultar de ayuda al paciente. El equilibrio entre investigación y asistencia en biopsias de pequeño tamaño debe favorecer siempre la asistencia, evitando fragmentar la muestra para diferentes laboratorios en detrimento de lo necesario para establecer un diagnóstico histológico que como hemos visto es imprescindible para pautar el tratamiento oncológico. Como comentaré en otro apartado del texto, el almacenamiento, proceso y utilización del material tisular debe estar en manos del especialista en Anatomía Patológica para evitar situaciones de conflicto y garantizar además la calidad de los proyectos de investigación tanto básica como clínica.

La heterogeneidad tumoral es algo propio de la patología neoplásica, con lo que siempre deberemos interpretar los hallazgos de una biopsia al albur de la correlación con los hallazgos clínicos. En el caso de discrepancia si es necesario estará indicada una segunda biopsia o una reinterpretación del caso.

Los criterios morfológicos para subclasificar el Carcinoma no microcítico no son siempre fáciles de aplicar y requieren una experiencia considerable al contrario de lo que se pensaba antiguamente. Es labor del patólogo conocer el alcance de sus diagnósticos en cuanto a consecuencias terapéuticas y labor del neumólogo y del oncólogo proporcionar al patólogo información en el universo cambiante de las indicaciones y de los nuevos fármacos.



Las fronteras diagnósticas entre el Carcinoma de células pequeñas y el Carcinoma neuroendocrino de células grandes no son a veces claras sobre todo en biopsias de pequeño tamaño artefactadas y en tomas de citología. Por tanto existen casos donde puede haber discrepancias entre diferentes técnicas diagnósticas. En esos casos, se debe llegar a un diagnóstico conjunto después de examinar las muestras y las características clínicas de cada tumor. En el caso que no se alcance un diagnóstico con la suficiente certeza puede ser necesaria nueva toma de biopsia y de todos modos, siempre será necesario recordar que existen los tumores combinados con componentes de ambos tipos citológicos.

Se requiere llegar a un consenso en lo referente a la estandarización de los tests de genética molecular en el Carcinoma no microcítico pulmonar con el establecimiento de controles de calidad tanto externos como internos en cada laboratorio. Las sociedades de especialistas deberían proporcionar un soporte para estos controles y emitir acreditaciones a los laboratorios y unidades clínicas preparadas para la realización de estas técnicas. Los informes anatomopatológicos y moleculares deberían asimismo estar estandarizados, conteniendo una serie de datos fundamentales como el tipo de técnica utilizada, el nombre comercial del kit, el lote, el tipo de alteración molecular detectada, la sensibilidad de la técnica, el material de partida (congelado o parafina, tumor primario o metastásico), el resultado y todos los datos necesarios para cumplir con la trazabilidad de la técnica. Por supuesto, la integración de los servicios en unidades con acreditación de calidad (ISO, EFQM) debería ser la norma.

Diferentes autores han expuesto ya cómo debería ser el **algoritmo de actuación** en el carcinoma de pulmón. Todos ellos comienzan con la biopsia y el diagnóstico histológico, dejando la puerta abierta a la utilización de pruebas menos invasivas como es la punción aspiración con aguja fina. Una vez alcanzado el diagnóstico morfológico, deberíamos establecer el perfil molecular en todo lo referente a resistencia a fármacos y predicción de respuesta al arsenal disponible. Con todos estos datos, integrados con el estado clínico del paciente y el estudio de extensión se llegaría a la selección del tratamiento adecuado e individualizado⁹.

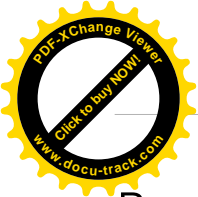
La histología como indicación de quimioterapia

Durante muchos años, los ensayos clínicos y la evaluación de las nuevas drogas dirigidas al tratamiento del carcinoma de pulmón, han desestimado el diagnóstico histológico como punto de corte a tener en cuenta. La mayor parte comparaba diferentes combinaciones basadas en platino hasta mediados de los años 90.

Sin embargo, la revisión de todos los datos de diferentes ensayos clínicos donde se utilizaban dichas combinaciones han apuntado posteriormente a que los pacientes con el diagnóstico de adenocarcinoma mostraban una mayor tasa de respuesta con las pautas que no usaban platino, en contraposición a los pacientes con tumores con morfología diferente al adenocarcinoma que respondían mejor al platino¹⁰. Más recientemente, han aparecido regímenes basados en pemetrexed en primera y segunda línea pero sólo para aquellos pacientes con resultado anatomopatológico de adenocarcinoma o carcinoma de células grandes (es decir, no escamosos)¹¹⁻¹².

Otros ensayos han demostrado asociación de la estirpe histológica con respuesta a otros fármacos como la histología diferente de escamoso con respuesta a paclitaxel¹³ y existen metaanálisis donde estos ensayos han sido recogidos cuidadosamente concluyendo que la evidencia sugiere que la histología puede ser pronóstica o predictiva².

Estos datos indican que el diagnóstico anatomopatológico certero vuelve a recuperar un papel relevante como factor determinante a la hora de considerar el régimen de quimioterapia convencional óptimo para cada paciente, es decir, se trata de un factor predictivo. Falta por determinar la posible importancia como factor pronóstico ya que hasta ahora la mayor parte de ensayos clínicos habían ignorado este parámetro y no disponemos de datos aunque parece existir una cierta tendencia a que los pacientes con carcinomas escamosos muestran una peor supervivencia que el resto³.



Receptores de superficie celular

Todas las células en general y las neoplásicas en particular son dependientes de factores de crecimiento extracelulares y de receptores citoplasmáticos con los que interactúan. La diferencia entre las células normales y las neoplásicas es que las tumorales se hacen "dependientes" de tipos específicos de receptores y no son capaces de contrarrestar la actividad desencadenada por su activación con la contrapartida de que si se inhibe su actividad se actúa sobre una parte fundamental de esa célula. Existen tres grandes clases de receptores de superficie celular según su estructura molecular, los canales iónicos unidos a ligando; los receptores unidos a proteínas G heterotriméricas y los receptores unidos a moléculas con actividad protein-kinasas¹⁴.

La mayor parte de los factores de crecimiento celulares ejercen sus efectos a través de unión a receptores con actividad tirosin-kinasa intrínseca. Estos receptores constan de un dominio extracelular de unión a ligando que proporciona la especificidad de unión, un segmento transmembrana que tiene una función de anclaje a la membrana citoplasmática, un dominio tirosin kinasa intracelular encargado de transmitir la señal de activación y otro dominio carboxiterminal con muchos lugares susceptibles de ser fosforilados y por tanto parece ser que podría modular la actividad kinasa catalítica. La cascada de activación celular comienza con esta fosforilación que hace que un grupo fosfato sea transferido a otra molécula que a su vez activa otra hasta finalizar en el núcleo donde generalmente se activan factores de transcripción que son capaces de inducir a la célula a sintetizar moléculas activadoras del ciclo celular u otras moléculas con actividad proliferativa o que ayuda en cierta manera a la formación de la neoplasia.

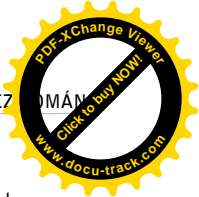
La unión del factor de crecimiento a su receptor hace que el complejo ligando-receptor se internalice dentro de la célula en menos de una hora. En los endosomas el bajo pH hace que se libere el ligando y se transporte el receptor a los lisosomas donde es catabolizado si bien existe un proceso de reciclaje de los receptores hacia la membrana citoplasmática. Es importante destacar que el tiempo necesario para la degrada-

ción de un receptor es menor de 4 horas, así que para mantener una estimulación continuada de los receptores durante más que unas pocas horas es preciso la síntesis de nuevas moléculas de receptores. La célula neoplásica es capaz de salvar esta circunstancia de varias maneras como con la sobreexpresión génica en el caso de Her2neu o EGFR. Es decir, teniendo más copias de la región génica que codifica para el receptor y que permite tener una reserva funcional que anula la degradación fisiológica de los receptores como mecanismo de protección frente al cáncer.

Excepto el receptor del Insulin Growth Factor (IGF) que es un homodímero, el resto de receptores precisa para activarse la unión con el ligando que induce la heterodimerización (unión con otras moléculas) y la activación de los dominios intracitoplasmáticos con actividad tirosin-kinasa que a su vez desencadenarán una fosforilación de intermediarios de la ruta molecular implicada en la señal. Las moléculas citoplasmáticas que median estas respuestas son los conocidos como segundos mensajeros.

Una diferencia fundamental entre las células neoplásicas y las normales es que los genes que codifican estos receptores de superficie están generalmente mutados en una forma tal que los hace constitucionalmente activos sin necesidad de unión a un ligando para ser activados con lo que las células se hacen autónomas, es decir no precisan de factores externos para proliferar.

El Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) regula varios procesos celulares fundamentales como son la proliferación, angiogénesis o invasividad y se encuentra sobreexpresado en un porcentaje variable de carcinomas pulmonares que oscila según la zona geográfica de origen entre un 5% en Europa y un 32% en el este asiático¹⁵. Su importancia radica en el hecho de que actualmente existen varias pautas que usan fármacos inhibidores de la actividad tirosin-kinasa específica de EGFR como Gefitinib, Erlotinib o anticuerpos frente a la porción externa de EGFR como Cetuximab para tratar a los pacientes con cáncer de pulmón en los casos en los que existe una alteración molecular detectable en EGFR.



Existe una discrepancia entre los diferentes métodos para la detección del EGFR. Inicialmente se encontró que una proporción variable de carcinomas pulmonares sobreexpresaban la proteína EGFR por métodos inmunohistoquímicos. Poco tiempo después se comprobó que era posible detectar una sobreexpresión del gen de EGFR por medio de hibridación in situ fluorescente (FISH) de manera similar a lo que se practicaba en el cáncer de mama con el oncogén Her2neu¹⁶. Sin embargo, la correlación con la respuesta a los nuevos fármacos inhibidores de la actividad tirosin-kinasa era cuando menos discutible. Posteriormente varios grupos de investigadores hallaron que existían diferentes mutaciones en el gen EGFR que podían ser detectadas y que parecían tener una mejor correlación con la respuesta a tratamiento^{17,18}. Por tanto cada uno de los métodos detectaba una clase de alteración, desde la cantidad de proteína, es decir del propio receptor (inmunohistoquímica) hasta la amplificación génica (múltiples copias del gen EGFR mediante FISH) hasta la mutación en el propio gen que conlleva un exceso de actividad (análisis de mutaciones por métodos moleculares).

Debido a todos estos datos, se ha discutido mucho tiempo acerca de la técnica ideal que resulta predictiva para estos pacientes, la expresión de la proteína por métodos inmunohistoquímicos, la sobreexpresión génica por medio de FISH o el análisis de mutaciones. La conclusión parece ser que el análisis de la secuencia del EGFR es un marcador más racional, para la respuesta clínica a los inhibidores de la actividad tirosin-kinasa, que el número de copias génicas, ya que por un lado, existen mutaciones que no aumentan las copias del gen con lo que no serían detectables por métodos de FISH; las mutaciones sin amplificación se asocian intensamente a la respuesta clínica a los fármacos inhibidores; y en definitiva, son las mutaciones y no las amplificaciones, las que se relacionan con un favorable devenir clínico.

En lo que sí coinciden los estudios es en que las mutaciones ocurren más frecuentemente en Adenocarcinomas de mujeres no fumadoras con patrón de crecimiento bronquioloalveolar prominente y se asocian con una elevada sensibilidad al tratamiento con inhibidores de la actividad tirosin-kinasa^{19,21}. Por otro lado, estas mutaciones también parecen comportarse como factor pronóstico ya que se asocian con mejor supervivencia²².

En cuanto al mecanismo molecular, más del 80% de las mutaciones del EGFR que confieren eficacia terapéutica a los inhibidores de la actividad tirosin-kinasa se ven restringidas fundamentalmente a dos exones, al exón 19 que sufre en un 50% de los casos mutaciones en forma de delección; y al exón 21, que muestra en un 40% mutaciones puntuales. Resulta interesante destacar que las mutaciones descritas del gen EGFR son mutuamente excluyentes con las de KRAS, BRAF y Her2.

Sin embargo, no todo son buenas noticias, ya que la gran mayoría de los pacientes con una respuesta inicial a erlotinib y gefitinib suelen recaer. Estudios recientes han identificado mutaciones en el exón 20 (T790M) en los tumores de pacientes que presentaron una recidiva, fueron tratados con inhibidores reversibles estándar y desarrollaron resistencia²³.

Existen sin embargo, otros métodos que usa la célula neoplásica para adquirir resistencia al tratamiento con fármacos específicos de la diana molecular EGFR como la amplificación del oncogén met²⁴⁻²⁶, activación de otros receptores con actividad TK como el Receptor del Factor de crecimiento semejante a insulina (ILGFR1)²⁷ o las mutaciones del oncogén KRAS²⁸ al igual que ocurre en el adenocarcinoma de colon.

El dato fundamental a tener en cuenta de nuevo es que es necesaria una adecuada clasificación histológica de los tumores ya que parece que sólo los adenocarcinomas son subsidiarios de obtener beneficio con este tipo de tratamientos y en concreto, resulta importante la distinción entre adenocarcinoma convencional y carcinoma bronquioloalveolar.

Inhibidores de la angiogénesis

El proceso de proliferación vascular o angiogénesis asociado a los tumores es bien conocido e históricamente se ha considerado el así llamado Factor de angiogénesis tumoral (TAF) descrito por Folkman en 1974 como principal responsable. Dicho factor angiogénico sería el responsable de alterar selectivamente las características que poseen en condiciones normales las células endoteliales y estructuras asociadas.

Sin embargo, este proceso de angiogénesis no es tan sencillo como puede parecer y requiere múltiples pasos moleculares



para ser exitoso. Estos pasos son fundamentalmente: Invasión del estroma, proliferación, migración, supervivencia y diferenciación.

Así, del factor único de angiogénesis tumoral inicial se ha pasado a una lista ampliada de factores tanto proangiogénicos como antiangiogénicos con diferentes funciones cada uno de ellos que complica este proceso.

Es muy importante considerar que es necesario un balance entre ambos tipos de factores y el tener en cuenta que las funciones de las diferentes moléculas no son estancas. En realidad, el Factor de crecimiento fibroblástico b (FGFb) es el mitógeno más potente para las células endoteliales y el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se comporta como un factor de permeabilidad vascular. De hecho, induce un aumento de permeabilidad 50.000 veces mayor que el inducido por histamina. Probablemente, la actividad de los fármacos antiangiogénicos esté relacionada entre otras con esta función de aumento de la permeabilidad que si es inhibida puede producir una falta de nutrientes y de oxígeno similar a la producida por la ausencia de vasos. Por otro lado, VEGF actúa asimismo como un factor de supervivencia endotelial interactuando con las rutas de Bcl2, A1, Akt, IAP con lo que se puede deducir que la inhibición de VEGF da lugar a apoptosis de células endoteliales.

Los factores angiogénicos han sido explorados en pacientes con cáncer de pulmón, donde se han encontrado datos reveladores como que los niveles de VEGF en las células epiteliales bronquiales de pacientes fumadores aumentan conforme el grado de displasia alcanza el alto grado²⁹ o que existen factores asociados con la angiogénesis tumoral que correlacionan con el pronóstico de estos pacientes³⁰⁻³², incluso los niveles de VEGF en sangre periférica funcionan como factor predictivo de respuesta a los inhibidores específicos de VEGF. El VEGF ha sido validado por la FDA como diana terapéutica para el anticuerpo monoclonal Bevacizumab en combinación con quimioterapia estándar³³ y posteriormente han sido sintetizadas pequeñas moléculas como el Sunitinib o el Sorafenib con acción asimismo frente a VEGF.

Sin embargo, el contexto apropiado para el uso de agentes anti-angiogénicos debe ser claramente definido, sobre todo basa-

do en algunos datos de seguridad que requieren individualización de los tratamientos.³⁴. De hecho, Bevacizumab está contraindicado en pacientes con morfología de carcinoma epidermoide debido a la elevada incidencia de hemoptisis severa que aparece hasta en un 31% de los pacientes con dicha histología³⁵, y aunque no está claro aún el mecanismo patogénico, esos mismos problemas de seguridad han aparecido a la hora de tratar los carcinomas epidermoides con pequeñas moléculas inhibitoras de la angiogénesis como el Sunitinib³⁶.

Por otro lado, parecen existir interrelaciones entre EGFR y VEGF y existen comunicaciones donde los casos de resistencia al bloqueo de EGFR cursan con sobreexpresión de VEGF³⁷. Así pues parece sensato intentar la inhibición de ambas rutas moleculares y de hecho así se está intentando en algún ensayo clínico³⁸.

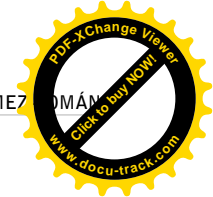
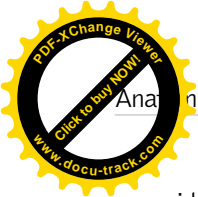
Biobancos

La necesidad de disponer de tejido en condiciones estrictas de almacenamiento que permita la realización de todo tipo de pruebas moleculares es perentoria en cualquier hospital que pretenda disponer de tratamientos actualizados para sus pacientes oncológicos. Esa necesidad va íntimamente unida al concepto de Biobanco. Un biobanco no es únicamente un almacén de tejidos más o menos organizado, si no que debe cumplir una serie de condiciones que hace que deba ser gestionado por profesionales que conozcan tanto la naturaleza de la enfermedad como los protocolos y exigencias de un establecimiento de las características de un Biobanco. Por tanto, debe ser gestionado por los Servicios de Anatomía Patológica que son los que están habituados al contacto y al trabajo con el tejido.

Existen varias guías de buenas prácticas³⁹⁻⁴², así como la reciente Ley de Investigación Biomédica que recoge las condiciones que debe requerir un Biobanco⁴³.

Son criterios de calidad y seguridad que deben ser exigidos los siguientes:

La obligatoriedad de protocolos de consentimiento informado, la existencia de bases específicas de datos, con políticas de



seguridad según legislación vigente, incluyendo el alta en la Agencia de Protección de datos, una política de calidad certificada según normativas internacionales ISO9001/2000, la participación en rondas de control de calidad externo, protocolos de seguridad de las muestras congeladas y protocolos de evaluación de la calidad de las muestras.

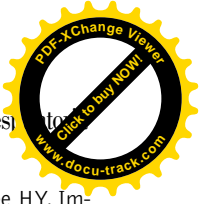
En la selección de muestras deben regir los siguientes principios básicos de los que el fundamental es dar prioridad absoluta al correcto diagnóstico histopatológico, por lo que sólo se considerarán aplicables al Biobanco aquellas muestras con excedente de tejido y en cualquier momento, si es necesario, las muestras podrán ser usadas para actividad diagnóstica. Por tanto, el biobanco de muestras sólidas, aunque especialmente dirigido a investigación, debe ser considerado una extensión del archivo diagnóstico.

La utilización de protocolos estandarizados para la elección de muestras, fijación y distribución del tejido mejoran la reproducibilidad y el diagnóstico y análisis, sabiendo que no todos los procedimientos proporcionan material apto para todas las técnicas moleculares. De hecho, las muestras fijadas en formol e incluidas en parafina son útiles para el diagnóstico rutinario y técnicas de inmunohistoquímica, hibridación in situ fluorescente (FISH) y análisis de ADN, mientras que para el análisis de expresión génica reproducible es necesario disponer de material en congelación, aunque ya se está obteniendo resultados buenos a partir de muestras incluidas en parafina. Los análisis de proteómica precisan de manera invariable disponer de material congelado.

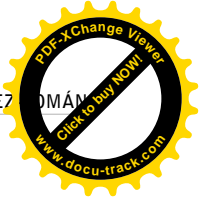
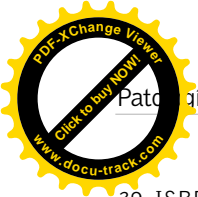
En resumen, la asistencia del paciente con cáncer de pulmón necesita de un diagnóstico histológico certero incluso en biopsias obtenidas por broncoscopia donde el material es escaso. Es necesario sensibilizar a los neumólogos, oncólogos y patólogos acerca de este hecho y de los posibles efectos secundarios de ciertos tratamientos ante histologías específicas como en el caso de los inhibidores de la angiogénesis y los carcinomas epidermoides. Es necesario asimismo rentabilizar todo el material tisular disponible para realizar las técnicas moleculares que permitan tratar a los pacientes con los nuevos fármacos existentes, algo que está íntimamente relacionado con la creación de biobancos.

BIBLIOGRAFIA

1. Pfister DG, Jonson DH, Azzoli CG et al. American society of clinical oncology treatment of unresectable non-small cell lung cancer guideline: update 2003. *J Clin Oncol* 2004;22:330-53
2. Hirsch FR, Spreafico A, Novello S et al. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thoracic Oncol* 2008;3:1-14
3. West H, Harpole D, Travis W. Histologic considerations for individualized systemic therapy approaches for the management of non-small cell lung cancer. *Chest* 2009;136:1112-18
4. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Lyon. 2004
5. Hernández-Hernández JR, Heras-Gómez F, Cordovilla-Pérez MR, Antolín-García T, Bollo De Miguel E; Grupo de Estudio CB07-SOCALPAR Incidence of bronchopulmonary cancer in Castilla y Leon and Cantabria in the year 2007. A study by the Castilla y Leon and Cantabria Respiratory Diseases Society (SOCALPAR). *Arch Bronconeumol*. 2010 Jan;46(1):7-14
6. Gómez-Román J; Esparza del Valle C; Zarrabeitia MT; Cifrián Martínez J; Cuevas González J; Zurbano Goñi F; Mons Lera R; Val-Bernal JF. Recurrence of bronchioloalveolar carcinoma in donor lung after lung transplantation. Microsatellite analysis demonstrates a recipient origin. *Pathol Intern* 2005;55(9):580-4
7. Gómez-Román JJ, Lazuén Fernández S, Val-Bernal JF. EBV-associated lymphocyte rich Adenocarcinomas and Squamous cell lung carcinomas. A distinctive tumor unrelated to Lymphoepithelioma-like carcinomas. *Modern Pathology*. 2009;22:530-537
8. Gómez-Román JJ; Fontalba A; Sánchez L; Hernández E; Fernández-Luna JL; Val-Bernal JF. Telomerase Activity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors. Correlation with Histological Subtype. *Am J Surg Pathol* 2000;24(3):417-21
9. Petty RD, Nicolson MC, Kerr KM, Collie-Duguid E, Murray GI. Gene expression profiling in non-small cell lung cancer: from molecular mechanisms to clinical application. *Clin Cancer Res* 2004;10:3237-48
10. Georgoulas V, Papadakis E, Alexopoulos A et al. Platinum-based and non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial. *Lancet* 2001;357:1478-84
11. Weiss GJ, Rosell R, Fossella F, Perry M, Stahel R, Barata F, Nguyen B, Paul S, McAndrews P, Hanna N, Kelly K, Bunn PA. The impact of induction chemotherapy on the outcome of second-line therapy with pemetrexed or docetaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2007;18(3):453-60.
12. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004;22:1589-97



13. Ceresoli GL, Gregorc V, Cordio S, Bencardino KB, Schipani S, Cozzarini C, Bordonaro R, Villa E. Phase II study of weekly paclitaxel as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2004;44(2):231-9.
14. Mendelsohn, Howley, Israel, Liotta. *The molecular basis of cancer*. 2nd Ed. Saunders NY. 2002
15. Haber DA, Bell DW, Sordella R, Kwak EL, Godin-Heymann N, Sharma SV, Lynch TJ, Settleman J. Molecular targeted therapy of lung cancer: EGFR mutations and response to EGFR inhibitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:419-26
16. Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridisation predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008;26: 3351-7
17. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA. Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:587-95
18. Rosell R, Moran T, Queralt C et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Eng J Med* 2009;361:958-67
19. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, 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.
20. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.
21. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13306-11
22. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008;358:1160-74.
23. Pao W, Miller VA, Politi KA, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2005;2(3):e73
24. Bean J, Brennan C, Shih JY, 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 U S A* 2007;104:20932-7.
25. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316: 1039-43
26. Cappuzzo F, Skokan M, Gajapathy S, et al. Effect of increased MET gene copy number on survival of surgically resected non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Clin Oncol* 2008;26:Suppl:589s
27. Morgillo F, Kim WY, Kim ES, Ciardiello F, Hong WK, Lee HY. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib. *Clin Cancer Res* 2007;13:2795-803
28. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* 2005;2(1):e17
29. Merrick DT, Haney J, Petrunich S, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer* 2005;48:31-45
30. Strieter RM. Out of the shadows: CXC chemokines in promoting aberrant lung cancer angiogenesis. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2008;1(5):305-7
31. Dowlati A, Gray R, Sandler AB, Schiller JH, Johnson DH. Cell adhesion molecules, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy with or without bevacizumab — an Eastern Cooperative Oncology Group study. *Clin Cancer Res* 2008;14:1407-12
32. Heymach JV, Hanrahan EO, Mann H, et al. Baseline VEGF as a potential predictive biomarker of vandetanib clinical benefit in patients with advanced NSCLC. *J Clin Oncol* 2008;26:Suppl:426s
33. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2542-50. [Erratum, *N Engl J Med* 2007;356:318]
34. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Molecular Origins of Cancer Lung Cancer *N Engl J Med* 2008;359:1367-80
35. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF 3rd, Gaudreault J, Damico LA, Holmgren E, Kabbinnar F. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(11):2184-91
36. Socinski MA, Novello S, Brahmer JR, Rosell R, Sanchez JM, Belani CP, Govindan R, Atkins JN, Gillenwater HH, Pallares C, Tye L, Selaru P, Chao RC, Scagliotti GV. Multicenter, phase II trial of sunitinib in previously treated, advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):650-6
37. Vioria-Petit A, Crombet T, Jothy S, et al. Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor- blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2001;61:5090-101
38. Herbst RS, O'Neill VJ, Fehrenbacher L, et al. Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:4743-50



39. ISBER 2008 Best Practices Guidelines for Repositories: Collection, Storage, Retrieval and Distribution of Biological Materials for Research. *Cell Preservation Technology* 6:3-58, 2008. [<http://www.isber.org/Pubs/BestPractices2008.pdf>]
40. International Agency for Research on cancer – IARC / OMS Common minimum technical standards and protocols for biological resource centres dedicated to cancer research. Editores: E. Caboux, A. Plymoth, P. Hainout. Lyon, 2007 [<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wrk/wrk2/index.php>]
41. OECI / TuBaFrost European Tumour bank Network [<http://www.tubafrost.org>]
42. Morente MM, Mager R, Alonso S, et al: TuBaFrost 2: standardising tissue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network. *Eur J Cancer* 2006;42: 2684–2691
43. Ley de Investigación biomédica 121/000104. BOE 21 de junio de 2007. pp 247-276