

Artículo original

Patología y Estudios Moleculares en el Cáncer de Pulmón de Células no Pequeñas (CPCNP): 2do consenso nacional de la sociedad panameña de oncología (SPO).

Pathology and Molecular Studies in Non Small Cell Lung Cancer (CPCNP): 2nd national consensus of the Panamanian Oncology Society (SPO).

*Vergara R., **Barrera I., ***González K., ****Crismatt A.

*Servicio de Patología, Instituto Oncológico Nacional (ION), Panamá. **Servicio de Patología, Hospital Santo Tomás (HST), Panamá. ***Servicio de Patología, Policlínica Horacio Díaz Gómez, Veraguas, Panamá. ****Servicio de Oncología, Instituto Oncológico Nacional (ION), Panamá. Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Palabras claves:

Cáncer de pulmón de células no pequeñas, espécimen, Tiempo de isquemia fría, tiempo de fijación, biomarcadores, citología, bloque celular, adenocarcinoma, carcinoma de células pequeñas, inmunohistoquímica, citoqueratinas, Hibridación por Inmuno-Fluorescencia in Situ, mutaciones, genes de fusión, Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, Re-arreglo ALK.

Keywords:

Non-Small Cell Lung Cancer, Specimen, Cold Ischemia Time, Fixation Time, Biomarkers, Cytology, Cell Block, Adenocarcinoma, Small Cell Carcinoma, Immunohistochemistry, Cytokeratins, In situ Immuno Fluorescence Hybridization, fusion genes, Epidermal Growth Factor Receptor, ALK Re-arrangement.

Correspondencia a:

Dra. Ruth Vergara,
Dr. Alejandro Crismatt

Correo electrónico:

ruthmabel30@yahoo.com,
drcrismatt@gmail.com

Resumen

En la última década el diagnóstico histopatológico se ha vuelto un determinante importante para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Un número creciente de pacientes se benefician de terapias blancas dirigidas a alteraciones moleculares particulares (Mutaciones, genes de Fusión...etc.), por lo tanto, el diagnóstico preciso y las pruebas de laboratorio basadas en biomarcadores predictivos para la determinación de los pacientes que más probablemente respondan a las terapias blanco, representan un cambio en el paradigma diagnóstico del cáncer de pulmón y son ahora un estándar[1]. El diagnóstico histopatológico del cáncer de pulmón es un proceso de múltiples pasos que inicia con el diagnóstico morfológico para determinar el tipo histológico (refinado por la inmunohistoquímica en los casos requeridos), seguido de la caracterización molecular del tumor. La creciente complejidad del algoritmo diagnóstico representa nuevos retos para los pacientes con cáncer de pulmón, dentro de los cuales destaca la disponibilidad de suficiente tejido para realización de todas las pruebas moleculares. La mayoría de los CPCNP son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que las grandes muestras de tumor (resección quirúrgica) se obtienen solo en unos pocos casos. Por lo tanto, es imperativo que toda adquisición de tejido tumoral se maximice para lograr realizar las pruebas moleculares requeridas. El rol del equipo multidisciplinario que incluye al neumólogo, radiólogo, patólogo, cirujano torácico y oncólogo es esencial para determinar el mejor abordaje de cada paciente[2,3].

Abstract

In the last decade, histopathological diagnosis has become an important determinant for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). A growing number of patients benefit from therapies targeting particular molecular alterations (Mutations, Fusion genes... etc.), thus accurate diagnosis and laboratory tests based on predictive biomarkers for the determination of patients who more likely to respond to target therapies, represent a change in the diagnostic paradigm of lung cancer and are now a standard[1]. The histopathological diagnosis of lung cancer is a multi-step process that begins with the morphological diagnosis to determine the histological type (refined by immunohistochemistry in the required cases), followed by the molecular characterization of the tumor. The increasing complexity of the diagnostic algorithm represents new challenges for patients with lung cancer, in which the availability of sufficient tissue for the realization of all molecular tests stands out. Most NSCLC are diagnosed in advanced stages of the disease, so large tumor samples (surgical resection) are obtained only in a few cases. Therefore, it is imperative that any acquisition of tumor tissue is maximized to achieve the required molecular tests. The role of the multidisciplinary team that includes the pulmonologist, radiologist, pathologist, thoracic surgeon and oncologist is essential to determine the best approach for each patient[2,3].

1. MANEJO DEL ESPÉCIMEN

El muestreo del tumor primario puede ser por broncoscopia, Toracoscopia Asistida por Video (VATS), Toracotomía abierta o guiada por imágenes (Percutánea, trans-bronquial o trans-esofágica)[4]. Alguno de estos abordajes diagnósticos, así como otras intervenciones que acceden a sitios extra torácicos (por ejemplo, biopsia de médula ósea) pueden ser seleccionados, cuando sea apropiado, para tomar muestras de la enfermedad metastásica, ya que no se ha encontrado diferencias en los resultados de las pruebas moleculares entre los tumores primarios y las metástasis de un mismo paciente[1].

La elección del sitio de muestreo generalmente se determinará por la facilidad de acceso, el paciente, la seguridad de la intervención y el rendimiento de tejido del método seleccionado. Las muestras de tejidos van desde la muestra completa del tumor (Pieza quirúrgica) hasta las diferentes variedades de citología. El rendimiento de cualquier procedimiento variará según la naturaleza de la técnica (cirugía abierta o cerrada, guiada por imágenes Etc.), el equipo utilizado (calibre o tipo de aguja de muestreo Etc.) y la habilidad del operador. Tres a seis biopsias por cilindro a través de la pared torácica con aguja de 18-20G son suficientes como material para evaluar durante el diagnóstico histopatológico como para estudios moleculares[54]. Las biopsias de tejido y los especímenes de tipo citológico son adecuados para el diagnóstico, pero deben ser manejados adecuadamente por un personal idóneo y para facilitar los procedimientos diagnósticos moleculares necesarios[5].

El tiempo de isquemia fría (tiempo hasta la fijación) debe ser minimizado, e idealmente de sólo unos pocos minutos y menos de una hora, para evitar la degradación de las proteínas y ácidos nucleicos (NA)[6,7]. La fijación inhibe la desintegración o autólisis de las células y preserva la morfología del tejido. Las muestras deben ser fijadas en formalina neutra tamponada al 10% (solución de formaldehído al 4%), la cual se encuentra ampliamente disponible y tiene la propiedad de conservar las proteínas, ARN (ácido Ribonucleicos) y ADN (Ácido Desoxirribonucleico) para el posterior análisis de biomarcadores.

El tiempo de fijación recomendado es entre 6 a 48 h, los tiempos superiores o inferiores a este rango puede afectar negativamente la calidad de la inmunohistoquímica, la hibridación in situ (ISH) y las pruebas de mutaciones[3,8]. Se debe evitar realizar procedimientos los días viernes y días previos a festivos largos. La Fijación insuficiente puede resultar en una pobre morfología de los tejidos.

No se recomiendan los fijadores ácidos ya que conducen a una rápida degradación de los ácidos nucleicos, ni la fijación acelerada con formalina calentada ya que degrada la morfología y disminuye la sensibilidad de los estudios moleculares. Se debe evitar la descalcificación

de las metástasis óseas con agentes ácidos que se saben degradan el ADN. El ácido etilendiamino-tetraacético es un agente descalcificante eficaz, que no tiene efectos adversos sobre el ADN y debe utilizarse en muestras con sospecha de cáncer de pulmón en donde se requiere descalcificación y estudios moleculares de manera anticipada[9-11, 53]. Las biopsias por cilindro o endoscópicas deben ser separadas y procesadas por lo menos en dos casetes para evitar perder tejido al momento de realizar los cortes histológicos[53].

El envejecimiento de las secciones de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina, causa la degradación de los epítomos y del ADN. Las secciones deben ser cortadas en fresco y el análisis de biomarcadores debe ser llevado a cabo dentro de 4-6 semanas, para evitar resultados no informativos o falsos negativos. Las secciones de tejido almacenadas pueden prolongarse mediante revestimiento de parafina o por sellado con cintas especiales[3,10].

Hasta el 40% de todos los diagnósticos de CPCNP se realiza solo por citología. Los análisis de biomarcadores son aplicables a los especímenes citológicos, que incluyen bloques celulares, centrifugado celular (Cytospin), frotis y citologías de base líquida[12]. Los bloques celulares son los preferidos por la mayoría de instituciones para el análisis de marcadores, ya que se utilizan mismos protocolos que las muestras por histología.

La fijación basada en etanol de los frotis, también permite el análisis de mutaciones, la Hibridación por Inmuno-Fluorescencia in Situ (FISH) e IHC, aunque los patólogos deben ser conscientes de que los protocolos de los laboratorios varía con respecto a los tejidos fijados en formalina. Los mismos factores pre-analíticos (tiempo de fijación y envejecimiento del material) se aplican a los especímenes de citología.

Un patólogo, preferiblemente con experiencia en cáncer de pulmón, debe revisar todo el material disponible de un paciente, con el fin de seleccionar el material óptimo para el análisis. Esto incluirá secciones de marcado para macro / micro disección según se requiera (ver abajo).

Cuando la citología y la biopsia se procesan de manera independiente, debe existir buena comunicación entre los patólogos para facilitar la mejor selección de muestras. Los patólogos también son responsables de la supervisión del personal técnico que prepara y procesa los especímenes antes del análisis molecular.

Para las pruebas de ADN o ARN basadas en biomarcadores, suele ser importante enriquecer el contenido de células tumorales del tejido, utilizando la extracción de ácidos nucleicos. Las secciones de tejido con alto contenido de tumoral pueden utilizarse directamente. En muestras más pobres, cuando sea factible, las áreas identificadas por los patólogos pueden ser raspadas (macro disección manual) de los portaobjetos.

Recomendaciones para el Manejo de la Muestra Tumoral

- Evitar la toma de muestras los viernes o previo al día de feriados largos.
- Obtener de tres a seis biopsias por cilindro, usando agujas de 18-20G, o la mayor cantidad mediante proceso bronco-endoscópico.
- Procesamiento de muestras
 - Se recomienda la Fijación con formalina tamporada neutra al 10% (Formaldehído al 4%).
 - Separar las muestras al momento de incluirlas para su procesamiento.
 - El tiempo de fijación no debe ser inferior a 6 h, ni superior a las 48 h.
 - Las secciones para pruebas de biomarcadores moleculares deberían ser cortadas idealmente, inmediatamente antes de su análisis.
- Las Muestras de citología (Bloques celulares, frotis directos, biopsias líquidas) se pueden utilizar de forma fiable para detectar las mutaciones de EGFR y el reordenamiento ALK.
- El mismo patólogo debe revisar todo el material disponibles de tumor del paciente (incluyendo biopsias y especímenes citológicos) para seleccionar el más adecuado para el análisis de biomarcadores.
- Se recomienda el enriquecimiento de muestras por micro o macro disección para maximizar el contenido de células tumorales antes de la extracción de ADN.

2. Diagnóstico Histológico

El diagnóstico histológico específico (es decir, escamoso vs. adenocarcinoma) es de suma importancia para la toma de decisiones terapéuticas. Los criterios diagnósticos para la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de las neoplasias pulmonares requieren del análisis de todo el tumor, sin embargo, la mayoría de los cánceres de pulmón no son resecados quirúrgicamente y el diagnóstico, clasificación y pruebas de biomarcadores moleculares se lleva a cabo en pequeñas muestras hechas por biopsia o citología[13].

La falta de criterios diagnósticos histopatológicos aplicables y la tendencia de los patólogos de hacer diagnósticos morfológicos con evidencia insuficiente, probablemente explique la alta inexactitud reportada de la clasificación morfológica para los subtipos de CPCNP, cuando se manejan muestras pequeñas[14–21]. Los tumores carentes de evidencia morfológica definitiva de histologías escamosas o glandulares en la muestra pequeña, se deben catalogar como CPCNP-NOS (Del Inglés “No Other Wise Specified”). Las tasas de reporte de CPCNP-NOS son altamente variables, lo que

probablemente refleja la variedad de abordajes diagnósticos de los diferentes patólogos y oscilan entre el 25 al 30 % de las biopsias pequeñas, y hasta el 40 % de las citologías.

La IHQ puede reducir las tasas de CPCNP – NOS a < 10 %, pero nunca a cero. La mayoría de las muestras de CPCNP–NOS son el resultado del muestreo no representativo de los cánceres de pulmón, en su mayoría adenocarcinomas[15]. Los marcadores como p63, p40 y cito queratina CK 5/6 se asocian con los carcinomas escamosos, mientras que TTF1 y Napsina A, así como las tinciones de mucina, se asocian con adenocarcinomas[22–27]. Se recomienda el uso de no más de dos marcadores para diferenciar escamoso de adenocarcinoma (p63 y TTF-1)[54]. Sin embargo, estos marcadores no son específicos para ninguno de estos diagnósticos y solo tiene valor predictivo positivo cuando se expresan por encima de ciertos valores en la muestra diagnóstica. El TTF-1 se expresa sólo el 75%-80% de los adenocarcinomas de pulmón[22–24]. Cuando el subtipo de CPCNP se predice por este enfoque, el diagnóstico recomendado es “probablemente (o favorece) carcinoma de células escamosas” o “probablemente (o favorece) adenocarcinoma”. Este abordaje diagnóstico tiene una precisión del 85% y los pacientes diagnosticados de esta forma deben ser manejados de igual manera a los que tiene el subtipo histológico definido[28,29].

Recomendaciones – Diagnóstico Histológico.

- El diagnóstico de Cáncer de Pulmón de células no pequeñas – NOS (No especificado) en las muestras pequeñas debe corresponder a < 10 % de los diagnósticos.
- Este porcentaje se alcanza con el uso juicioso de la IHQ en los pacientes morfológicamente indeterminados. Un abordaje recomendado es usar TTF-1 para predecir adenocarcinoma, y p63 para predecir carcinoma de células escamosas.
- Recomendamos que las pruebas de Inmuno-histoquímica sean realizadas en el centro donde el paciente va a recibir su tratamiento definitivo (usualmente el Instituto Oncológico Nacional), con la finalidad de maximizar el tejido disponible.
- Los biomarcadores pueden hacerse de forma refleja o secuencial de acuerdo a las posibilidades de cada instalación de contar con el equipo multidisciplinar y del recurso humano y equipos disponibles.

3. Marcadores Moleculares

Mutaciones del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)

Las mutaciones activadoras del dominio Tirosina Cinasa del Receptor del factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR – por “Epidermal Growth Factor Receptor”) se

encuentran en el 10 al 16 % de los casos de adenocarcinomas y de manera esporádica en los pacientes con carcinomas escamosos[30,31]. La carcinogénesis por mutaciones del EGFR es desconocida, pero no está relacionada al tabaquismo. Estas mutaciones, por lo tanto, son más comunes en pacientes que nunca han fumado o fumadores pasivos, mujeres y pacientes jóvenes[32,33]. Estos parámetros clínicos no deben ser utilizados para seleccionar a los pacientes que requieren muestreo del EGFR. Evidencia anecdótica sugiere que cualquier histología de cáncer de pulmón, inclusive el sub tipo de células pequeñas, sin antecedente de tabaquismo o con exposición mínima, debiera considerarse para la prueba[1].

Múltiples estudios fase III, en pacientes Europeos, Asiáticos y Norteamericanos con mutaciones del EGFR, demostraron mejores tasas de respuesta (70%) y supervivencia libre de progresión en los pacientes tratados con Inhibidores de Tirosina Kinasa (ITC-gefitinib, erlotinib, afatinib) comparados con los que recibían quimioterapia de manera inicial para su enfermedad metastásica[34-38].

El uso de los ITK del EGFR está bien establecido en la práctica cotidiana y el muestreo de las mutaciones de RFCE, en casos seleccionados, es un componente rutinario de la evaluación de los pacientes con cáncer de pulmón.

Las mutaciones más significativas del EGFR son las deleciones del exón 19 o la mutación por sustitución de L858R del exón 21 (Ocupan del 80 al 90 % de las mutaciones), pero otras mutaciones menos frecuentes en el exón 18 y 21 también pueden predecir respuestas a los ITK. (39, 40).

La metodología utilizada para su detección dependerá de la disponibilidad de tecnología para cada centro, y los usuarios deberán ser conscientes de las limitaciones en la cobertura de mutaciones de la tecnología que disponen.

La mutación T790M se encuentra en el 50 % de los pacientes que recaen y en la actualidad existen medicamentos activos para los que desarrollan esta mutación, por lo que se recomienda reevaluar su presencia en los pacientes que fallan a la primera línea de ITK por la presencia de esta alteración, por medio de una nueva biopsia (tejido o Biopsia líquida)[41].

Recomendaciones – Muestreo del EGFR

-La detección de mutaciones del EGFR se debe realizar en todos los pacientes con tumores no escamosos y enfermedad avanzada o recurrente. Recomendamos que la prueba se realice en el Instituto Oncológico Nacional, para maximizar la cantidad del tejido.

-En los pacientes con carcinoma escamoso y sin

historia de consumo de tabaco (o mínima exposición al tabaco) se debe considerar fuertemente la realización de estas pruebas.

-Se recomienda el análisis mutacional que tenga amplia cobertura de los exones 18 al 21. Si el material es mínimo o los recursos son limitados, al menos se debe determinar la deleción del exón 19 y la L858R, que representan al menos el 80 % de los casos.

-Se recomienda que cualquier metodología empleada sea evaluada por un programa de validación externo.

Re-arreglos del Gen ALK (Anaplastic Lymphoma kinase) y otras alteraciones relevantes.

El re-arreglo del gen ALK se encuentra en el 3% -5% de los adenocarcinomas y predice la respuesta a los inhibidores de ALK-dirigidos. Los tumores con re-arreglo ALK se asocian a características clínicas patológicas particulares, como lo son; la edad más temprana de inicio, poca exposición al tabaco, e histología adenocarcinoma (particularmente con morfología en anillo de sello o acinar)[42- 47].

Al igual que con las mutaciones del EGFR, estas características clínico-patológicas no son suficientes para seleccionar a los pacientes que requieren pruebas de detección[42,43,47]. Los re-arreglos ALK son muy infrecuentes en los carcinomas escamosos, se han descrito casos en los carcinomas adeno-escamosos[46] y usualmente son mutuamente excluyentes de las mutaciones del EGFR o KRAS[48].

El inhibidor de la tirosina quinasa de ALK-crizotinib-es efectivo en pacientes cuyos tumores muestran un reordenamiento del gen ALK. El Crizotinib está aprobado en la primera línea de tratamiento de los pacientes con CPCNP metastásico y con reordenamiento ALK, ya que mejora las tasas de respuesta y la supervivencia libre de progresión comparado con la quimioterapia de primera línea. Así mismo el alectinib y el ceritinib, dos TKI dirigidos contra los re-arreglos ALK, han demostrado mejores tasas de respuesta y supervivencia libre de progresión que la quimioterapia de segunda línea, en los pacientes que progresan luego de recibir crizotinib.

Se han descrito mutaciones en los genes ROS1 y BRAF (3 y 2%, respectivamente) susceptibles al tratamiento con terapias blanco, y al igual que con los ITK del EGFR y ALK, se alcanzan altas tasas de respuesta y supervivencia libre de progresión y todas son mutuamente excluyentes entre sí[50, 51].

Recientemente la inmunoterapia con anti PD1 (Pembrolizumab) demostró mejorar las tasas de respuesta y supervivencia libre de progresión en comparación con la primera línea de quimioterapia, en paciente con expresión $\geq 50\%$ de PDL1 (Programmed death-ligand 1) por

IHQ y sin mutaciones del EGFR y ALK, por lo que en este grupo de pacientes se considera como el nuevo estándar[52]. En la figura 1 se resume el abordaje diagnóstico patológico propuesto por el grupo.

Recomendaciones – Muestreo de los Re-arreglos ALK y otras alteraciones relevantes

-A todos los tumores no escamosos, de pacientes con enfermedad avanzada o recurrente, se les debe realizar las pruebas para los re-arreglos ALK, la cual se dispone en el Instituto Oncológico Nacional.

-En los pacientes con carcinoma escamoso y sin historia de consumo de tabaco (o mínima exposición al tabaco) se debe considerar fuertemente la realización de estas pruebas.

-Se debe utilizar la IHQ como método de cribado y el FISH para la evaluación definitiva.

-En los paciente sin alteraciones de los genes ALK/EGFR, se recomienda la realización de IHQ para PDL1. En la actualidad su realización en nuestro país está sujeta a la disponibilidad de las pruebas y los medicamentos aprobados.

-Dependiendo de la disponibilidad del centro académico, se recomienda la realización de alteraciones menos frecuente como ROS1 y BRAF, ya que cuentan con blancos terapéuticos eficaces.

-Las metodologías empleadas deben ser validadas por un programa de asesoramiento externo.

REFERENCIAS

- [1] Kerr KM, Bubendorf L, Novello S et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: Pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 2014;25[9]:1681-1690
- [2] Kerr KM. Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology* 2012; 60: 531–546.
- [3] Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJ et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* 2012; 76: 1–18.
- [4] Lim E, Baldwin D, Beckles M et al. Guidelines on the radical management of patients with lung cancer. *Thorax* 2010; 65(suppl III): iii1–iii27.
- [5] Felip E, Gridelli C, Baas P et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010. *Ann Oncol* 2011; 22: 1507–1519.
- [6] Neumeister VM, Anagnostou V, Siddiqui S et al. Quantitative assessment of effect of preanalytic cold ischemic time on protein expression in breast cancer tissues. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104: 1815–1824.
- [7] Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E et al. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2013; 26: 1–9.
- [8] Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135: 537–543.
- [9] Arber DA. Effect of prolonged formalin fixation on the immunohistochemical reactivity of breast markers. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 183–186.
- [10] Babic A, Loftin IR, Stanislaw S et al. The impact of pre-analytical processing on staining quality for H&E, dual hapten, dual color in situ hybridization and fluorescent in situ hybridization assays. *Methods* 2010; 52: 287–300.
- [11] Chafin D, Theiss A, Roberts E et al. Rapid two-temperature formalin fixation. *PloS One* 2013; 8: e54138.
- [12] Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase Inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol* 2013; 8: 823–859.
- [13] Travis W, Brambilla E, Nicholson A, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification: *J Thorac Oncology*. 2015 Sep[10] 9: 1243-1260.
- [14] Thomas JS, Lamb D, Ashcroft T et al. How reliable is the diagnosis of lung cancer using small biopsy specimens? Report of a UKCCCR Lung Cancer Working Party. *Thorax* 1993; 48: 1135–1139.
- [15] Edwards SL, Roberts C, McKean ME et al. Preoperative histological classification of primary lung cancer: accuracy of diagnosis and use of the non-small cell category. *J Clin Pathol* 2000; 53: 537–540.
- [16] Schreiber G, McCrory DC. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. *Chest* 2003; 123: 115S–128S.
- [17] Rivera MP, Detterbeck F, Mehta AC, American College of Chest Physicians. Diagnosis of lung cancer: the guidelines. *Chest* 2003; 123: 129S–136S.
- [18] Burnett RA, Howatson SR, Lang S et al. Observer variability in histopathological reporting of non-small cell carcinoma on bronchial biopsy specimens. *J Clin Pathol* 1996; 49: 130–133.
- [19] Cataluña JJ, Perpiñá M, Greses JV et al. Cell type accuracy of bronchial biopsy specimens in primary lung cancer. *Chest* 1996; 109: 1199–1203.

- [20] Matsuda M, Horai T, Nakamura S et al. Bronchial brushing and bronchial biopsy: comparison of diagnostic accuracy and cell typing reliability in lung cancer. *Thorax* 1986; 41: 475–478.
- [21] Chuang MT, Marchevsky A, Teirstein AS et al. Diagnosis of lung cancer by fibreoptic bronchoscopy: problems in the histological classification of non-small cell carcinomas. *Thorax* 1984; 39: 175–178.
- [22] Loo PS, Thomas SC, Nicolson MC et al. Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens. *J Thorac Oncol* 2010; 5:442–447.
- [23] Mukhopadhyay S, Katzenstein AL. Subclassification of non-small cell lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol* 2011; 35: 15–25.
- [24] Terry J, Leung S, Laskin J et al. Optimal immunohistochemical markers for distinguishing lung adenocarcinomas from squamous cell carcinomas in small tumor samples. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 1805–1811.
- [25] Righi L, Graziano P, Fornari A et al. Immunohistochemical subtyping of non-small cell lung cancer not otherwise specified in fine-needle aspiration cytology: a retrospective study of 103 cases with surgical correlation. *Cancer* 2011; 117: 3416–3423.
- [26] Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH et al. p40 (ΔNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012; 25: 405–415.
- [27] Wallace WA, Rassl DM. Accuracy of cell typing in non-small cell lung cancer by EBUS/EUS-FNA cytological samples. *Eur Respir J* 2011; 38: 911–917.
- [28] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M et al. International association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 244–285.
- [29] Travis WD, Brambilla E, Noguchi M et al. Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013; 137: 668–684.
- [30] Sartori G, Cavazza A, Sgambato A et al. EGFR and K-ras mutations along the spectrum of pulmonary epithelial tumors of the lung and elaboration of a combined clinicopathologic and molecular scoring system to predict clinical responsiveness to EGFR inhibitors. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 478–489.
- [31] Marchetti A, Martella C, Felicioni L et al. EGFR mutations in non-small cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 2005; 23: 857–865.
- [32] Tsao AS, Tang XM, Sabloff B et al. Clinicopathologic characteristics of the EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006; 1: 231–239.
- [33] Pham DK, Kris MG, Riely GJ et al. Use of cigarette-smoking history to estimate the likelihood of mutations in epidermal growth factor receptor gene exons 19 and 21 in lung adenocarcinomas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1700–1704.
- [34] Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13: 239–246.
- [35] Zhou C, Wu YL, Chen G et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label randomized phase 3 study. *Lancet Oncol* 2011; 12: 735–742.
- [36] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361: 947–957.
- [37] Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11: 121–128.
- [38] Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013; 31: 3327–3334.
- [39] Li AR, Chitale D, Riely GJ et al. EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J Mol Diagn* 2008; 10: 242–248.
- [40] Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 169–181.
- [41] Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 2011; 3: 75ra26.
- [42] Soda M, Choi YL, Enomoto M et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448: 561–566.
- [43] Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4247–4253.
- [44] Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 13–17.
- [45] Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M et al. Clinicopathologic features of nonsmall- cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol* 2010; 17[3]: 889–897.
- [46] Chaft JE, Rekhtman N, Ladanyi M, Riely GJ. ALK-

- rearranged lung cancer: adenosquamous lung cancer masquerading as pure squamous carcinoma. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 768–769.
- [47] Wong DW, Leung EL, So KK et al. University of Hong Kong Lung Cancer Study Group. The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 2009; 115: 1723–1733.
- [48] Zhang X, Zhang S, Yang X et al. Fusion of EML4 and ALK is associated with development of lung adenocarcinomas lacking EGFR and KRAS mutations and is correlated with ALK expression. *Mol Cancer* 2010; 9: 188.
- [49] Solomon BJ, Mok T, Kim DW, et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2014 Dec 4; 371[23]:2167-77.
- [50] Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, Riely GJ, Varella-Garcia M, Shapiro GI, Costa DB, Doebele RC. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2014 Nov 20; 371[21]:1963-71.
- [51] Planchard D, Besse B, Rigas JR, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF V600E-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016 Jul 31; 17[7]:984-93.
- [52] Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2016 Nov 10; 375[19]:1823-33.
- [53] Aisner D, Rumery M, Merrick D et al. Do more with less, Tips and techniques for maximizing small biopsy and cytology specimens for molecular and ancillary testing: The University of Colorado Experience. *Arch Pathol Lab Med*. Vol 140. Nov 2016; 1206-1220.
- [54] Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AM, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): Recommendations of the European Expert Group; *Thorax* 2016; 71:177–184.