



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**LAS TÉCNICAS RADIOLÓGICAS DE MUESTREO DEL CÁNCER
DE PULMÓN EN EL CONTEXTO DE LAS NUEVAS TERAPIAS
DIRIGIDAS**



VIRGINIA PÉREZ DUEÑAS

MAYO 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID FACULTAD DE MEDICINA

**LAS TÉCNICAS RADIOLÓGICAS DE MUESTREO DEL CÁNCER
DE PULMÓN EN EL CONTEXTO DE LAS NUEVAS TERAPIAS
DIRIGIDAS**

TESIS DOCTORAL

AUTORA: VIRGINIA PÉREZ DUEÑAS

DIRECTORES: DRA. TORRES SÁNCHEZ Y DRA. CONDE GALLEGO
TUTOR: DR. FRANCISCO GARCÍA RÍO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

2017



MARÍA ISABEL TORRES SÁNCHEZ, JEFE DE SECCIÓN DE RADIODIAGNÓSTICO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ, ESTHER CONDE GALLEGO, MÉDICO ADJUNTO DEL SERVICIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA-LABORATORIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO HM SANCHINARRO Y FRANCISCO GARCÍA RÍO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE DE SECCIÓN DE NEUMOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ

CERTIFICAN:

Que Doña **Virginia Pérez Dueñas** ha realizado bajo nuestra dirección y tutoría el proyecto de investigación **“Las técnicas radiológicas de muestreo del cáncer del pulmón en el contexto de las nuevas terapias dirigidas”**, con el que pretende optar al grado de Doctor en Medicina.

Dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarias para que pueda ser aceptado para su presentación y defensa.

En Madrid, a 22 de Mayo de dos mil diecisiete.

Francisco García Río

M^a Isabel Torres Sánchez

Esther Conde Gallego

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han colaborado en la realización de este proyecto.

En primer lugar a mis directoras de tesis, sin su ayuda este proyecto no habría sido posible. A la Dra. María Isabel Torres Sánchez, quien incentivó el deseo de desarrollar este proyecto y que es para mí un referente profesional, debo agradecer su continua motivación y su apoyo incondicional. A la Dra. Esther Conde Gallego, por su tiempo y su trabajo, por su paciencia y su carácter docente.

A mí tutor, el Dr. Francisco García Ríó, gracias por su ayuda y su disponibilidad.

Deseo expresar un agradecimiento especial a los Dres. Jose María Viquer, Blanca Vicandi y Pilar López, por su imprescindible colaboración en la realización de este trabajo. Así mismo deseo agradecer al Dr. Fernando López-Ríos por transmitirme su motivación y estímulo.

Deseo también expresar mi gratitud a las Dras. Allona, Ortiz de Mendivil y García Cañamaque por su apoyo constante e incondicional.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, en especial a mi padre y a mi marido por su inestimable ayuda y tiempo dedicado, a mi madre por su comprensión y cariño, a mis suegros por el amor que han dado a mis hijas mientras he dedicado mi tiempo a este proyecto y a mi hija Daniela, por cederme el tiempo necesario. Gracias también a Amelie, Josepha, Schaima y Jazmín, por la gran ayuda en casa y cariño transmitido a mis hijas durante el tiempo que he dedicado a la realización de este proyecto.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	13
ÍNDICE DE FIGURAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS	19
I. RESUMEN	23
II. INTRODUCCIÓN	29
2.1 JUSTIFICACIÓN	31
2.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN	33
2.2.1 <i>Incidencia y mortalidad</i>	33
2.2.2 <i>Etiopatogenia de la enfermedad</i>	35
2.3 CLÍNICA DEL CÁNCER DE PULMÓN.....	36
2.3.1 <i>Síntomas por extensión locorregional</i>	36
2.3.2 <i>Síntomas por metástasis a distancia</i>	37
2.3.3 <i>Síndromes paraneoplásicos</i>	37
2.4 DIAGNÓSTICO Y ESTADIAJE DEL CÁNCER DE PULMÓN POR IMAGEN	37
2.4.1 <i>Técnicas de imagen morfológica</i>	38
2.4.1.1 Radiografía simple.....	38
2.4.1.2 Tomosíntesis digital	39
2.4.1.3 Tomografía computarizada multidetector	39
2.4.1.4 Tomografía computarizada con energía dual	45
2.4.2 <i>Técnicas de imagen morfológica y funcional</i>	45
2.4.2.1 TC perfusión	45
2.4.2.2 Resonancia magnética	46
2.4.3 <i>Técnicas de imagen molecular</i>	47
2.4.3.1 PET-TC.....	47
2.4.3.2 PET-RM.....	51
2.5 TÉCNICAS DE MUESTREO EN CÁNCER DE PULMÓN.....	52
2.5.1 <i>Técnicas radiológicas</i>	52
2.5.1.1 Punción transtorácica guiada por TC	52
2.5.1.2 Punción transtorácica guiada por ecografía	53
2.5.2 <i>Técnicas invasivas no quirúrgicas</i>	53
2.5.2.1 Fibrobroncoscopia	53
2.5.2.2 Biopsia guiada por navegación electromagnética	54
2.5.2.3 Punción transbronquial guiada por ecobroncoscopia.....	54
2.5.2.4 Punción endoscópica guiada por ultrasonidos	55
2.5.3 <i>Otras técnicas de muestreo</i>	55

2.5.3.1 Citología de esputo.....	55
2.5.3.2 Toracocentesis	56
2.5.3.3 Biopsia pleural	56
2.5.3.4 Otros procedimientos.....	56
2.5.3.5 Estadificación del cáncer de pulmón mediante técnicas quirúrgicas	56
2.6 ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN	57
2.6.1 <i>Clasificación histológica del cáncer de pulmón</i>	57
2.7 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN	61
2.7.1 <i>Introducción</i>	61
2.7.2 <i>Recomendaciones para la determinación de EGFR y ALK en el carcinoma de pulmón no célula pequeña</i>	62
2.7.3 <i>Tipo de muestra óptima y gestión de la misma para el estudio de EGFR y ALK</i>	63
2.7.4 <i>Mutaciones de EGFR</i>	63
2.7.5 <i>Reordenamientos de ALK</i>	64
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
3.1 HIPÓTESIS.....	67
3.2 OBJETIVO GENERAL	67
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	69
4.1 SELECCIÓN DE LOS CASOS.....	71
4.1.1 <i>Criterios de inclusión</i>	71
4.1.2 <i>Criterios de exclusión</i>	72
4.2 PROCEDIMIENTO RADIOLÓGICO	73
4.3 VARIABLES CONSIDERADAS.....	80
4.3.1 <i>Variables clínico-radiológicas</i>	80
4.3.2 <i>Variables anatomopatológicas</i>	80
4.4 ESTUDIO DE DIANAS TERAPÉUTICAS EN LOS CARCINOMAS DE PULMÓN NO DE CÉLULA PEQUEÑA	81
4.4.1 <i>Estudio de las mutaciones de EGFR</i>	81
4.4.2 <i>Estudio de los reordenamientos de ALK</i>	85
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86
V. RESULTADOS	89
5.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA	91
5.2 RESULTADOS POR OBJETIVOS ESPECÍFICOS	97

5.2.1 Eficacia de los dos métodos de muestreo empleados: punción- aspiración con aguja fina (PAAF) y biopsia con aguja gruesa (BAG).....	97
5.2.1.1- Conocer la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN), la eficiencia y la exactitud diagnóstica de ambas técnicas de muestreo para el diagnóstico citológico/histológico de malignidad en lesiones pulmonares sospechosas por su aspecto radiológico en TC, considerando el diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica el patrón oro.....	97
5.2.1.2- Comparar la sensibilidad, la especificidad, el VPP, el VPN y la eficiencia de ambas técnicas de muestreo para el diagnóstico de carcinoma de pulmón en lesiones pulmonares sospechosas en TC, considerando el diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica el patrón oro.	98
5.2.1.3- Conocer el rendimiento diagnóstico de la PAAF y de la BAG guiadas por TC de lesiones pulmonares, es decir, la frecuencia de muestras concluyentes para diagnóstico.....	100
5.2.2 Complicaciones derivadas de PAAF y BAG guiadas por TC	101
5.2.2.1- Evaluación del tipo y la frecuencia de complicaciones derivadas de la PAAF y de la BAG guiadas por TC.	101
5.2.2.2 Análisis de la posible asociación de los distintos tipos de complicaciones con características de la muestra y diagnóstico de benignidad o malignidad.....	101
5.2.3- Relación de aspectos metodológicos con el rendimiento de ambos tipos de muestreo para el estudio molecular de EGFR y ALK en los carcinomas no de célula pequeña de pulmón.	106
5.2.3.1- Determinar el rendimiento de la PAAF y de la BAG para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP no escamoso: mutaciones de EGFR y reordenamientos de ALK.	106
5.2.3.2- Estudiar la relación entre el número de marcadores diagnósticos/predictivos empleados y el porcentaje de muestras con material insuficiente para el posterior estudio molecular de mutaciones de EGFR y reordenamientos de ALK.	108
5.2.3.3- Analizar la relación entre el porcentaje de celularidad tumoral en las muestras obtenidas mediante BAG y la obtención de muestras válidas para estudios moleculares en CPNCP no escamoso.	110
VI. DISCUSIÓN	115
6.1 DISCUSIÓN DEL MÉTODO.....	117

6.1.1 Calibre de la aguja en el diagnóstico del CP mediante punción guiada por TC y otros factores relacionados con la rentabilidad del procedimiento.....	117
6.1.2 La necesidad de técnicas de inmunocito/histoquímica para la subclasificación del CP.	119
6.1.3 Papel del citopatólogo in situ en la PAAF guiada por TC.	120
6.1.4 La importancia del equipo multidisciplinar en el manejo clínico actual del cáncer de pulmón.....	121
6.2 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	122
6.2.1 Características generales de la muestra.	122
6.2.2 Rendimiento diagnóstico y eficacia de la PAAF frente a la BAG de lesiones pulmonares.	123
6.2.3 Complicaciones de la punción guiada por TC y su correlación con el calibre de la aguja.	126
6.2.4 Rendimiento de PAAF y BAG para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP.	129
6.2.5 Relación entre el número de marcadores empleados y el rendimiento de la muestra para posterior estudio molecular de EGFR y ALK.	133
6.2.6 Relación entre la celularidad tumoral y el rendimiento de las muestras de BAG para el estudio molecular de EGFR y ALK.....	134
VII. CONCLUSIONES	137
VIII. BIBLIOGRAFÍA	141
IX. ANEXOS	165

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Utilidad de la TC en la valoración del cáncer de pulmón.....	42
Tabla 2	Sistema internacional de clasificación TNM para cáncer de pulmón.....	43
Tabla 3	Estadios radiológicos TNM.....	43
Tabla 4	Última clasificación de la OMS 2015 de tumores de pulmón.....	58
Tabla 5	Terminología y criterios para el adenocarcinoma, el carcinoma epidermoide y el CPNCP-NOS en biopsias pequeñas y citología comparada con los términos empleados en pieza de resección según la clasificación de la OMS 2015.....	60
Tabla 6	Terminología diagnóstica empleada para biopsias pequeñas y citologías en comparación con los términos para piezas de resección con carcinoma de células pequeñas, carcinoma neuroendocrino de células grandes, carcinoma adenoescamoso y carcinoma sarcomatoide según la clasificación de la OMS 2015.....	61
Tabla 7	Diagnósticos de malignidad en muestras de PAAF y BAG.....	93
Tabla 8	PAAF y BAG con resultados positivos o negativos verdaderos o falsos según el diagnóstico en pieza quirúrgica.....	93
Tabla 9	Diagnósticos en pieza quirúrgica.....	94
Tabla 10	Correlación de diagnósticos en PAAF y BAG con pieza quirúrgica.....	95
Tabla 11	Tabla de contingencia para el diagnóstico de lesión maligna mediante PAAF y BAG.....	97
Tabla 12	Valores de eficacia de los procedimientos de punción transtorácica para el diagnóstico de lesión maligna.....	98

Tabla 13	Tabla de contingencia para el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante PAAF y BAG.....	99
Tabla 14	Valores de eficacia de los procedimientos de punción transtorácica para el diagnóstico de cáncer de pulmón.....	99
Tabla 15	Distribución de complicaciones en las categorías de cada característica del paciente usada como predictor de complicaciones de PAAF y BAG.....	102
Tabla 16	Parámetros de los modelos obtenidos para predecir el riesgo de sufrir complicaciones usando como predictores sexo, edad, malignidad de la lesión y localización.....	103
Tabla 17	Parámetros de los modelos obtenidos para predecir el riesgo de sufrir neumotórax y neumotórax con tubo usando como predictores las variables: sexo, edad, malignidad de la lesión y localización.....	104
Tabla 18	Parámetros de los modelos obtenidos para predecir el riesgo de sufrir hemorragia perilesional y hemoptisis usando como predictores las variables: sexo, edad, malignidad de la lesión y localización.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Frecuencia de detección de cáncer según estadio en los tipos de tumores más prevalentes en ambos sexos.....	34
Figura 2	Supervivencia a 5 años de los tumores más prevalentes en ambos sexos según el estadio al diagnóstico.....	34
Figura 3	Radiografía de tórax en proyecciones PA y lateral.....	38
Figura 4	Imágenes axiales de TC con contraste iv.....	40
Figura 5	Reconstrucciones MPR de TC.....	40
Figura 6	Reconstrucciones MIP de TC.....	41
Figura 7	Reconstrucción MinIP y broncoscopia virtual en TC.....	41
Figura 8	Medición volumétrica del nódulo pulmonar en TCMD.....	44
Figura 9	PET-TC de estadificación.....	49
Figura 10	Estimación del MTV en PET-TC.....	50
Figura 11	PET-RM de reestadificación. Comparación de los valores del <i>SUV</i> y del <i>ADC</i>	51
Figura 12	Material para PAAF guiada por TC.....	75
Figura 13	PAAF guiada por TC.....	76
Figura 14	Material para valoración <i>in situ</i> de las extensiones citológicas.....	76
Figura 15	Muestra de PAAF con citología líquida.....	77
Figura 16	Material para BAG guiada por TC.....	77
Figura 17	BAG guiada por TC.....	78
Figura 18	Muestra tisular obtenida mediante BAG.....	79

Figura 19	Análisis de mutaciones en el <i>EGFR</i> por secuenciación directa.....	84
Figura 20	Análisis de mutaciones en el <i>EGFR</i> por el kit Therascreen <i>EGFR</i> Mutation Test.....	84
Figura 21	Estudio de la translocación de <i>ALK</i> mediante técnica de FISH.....	85
Figura 22	Localización de las lesiones diagnosticadas mediante PTT-TC.....	91
Figura 23	Frecuencia de solicitud de estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP no escamoso.....	96
Figura 24	Resultados de los estudios moleculares de <i>EGFR</i> y <i>ALK</i> en muestras de PAAF y de BAG.....	96
Figura 25	Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de pacientes en la que el resultado de PAAF y BAG fue concluyente (cáncer, no cáncer) y no concluyente.....	100
Figura 26	Proporción de complicaciones después de un procedimiento de PAAF y de BAG.....	101
Figura 27	Distribución de muestras en las categorías analizadas para el rendimiento diagnóstico de <i>EGFR</i> y <i>ALK</i> , en PAAF y en BAG.....	106
Figura 28	Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de muestras en la que el estudio de <i>EGFR</i> a partir de PAAF y BAG fue valorable y no valorable.....	107
Figura 29	Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de muestras en la que el resultado del estudio de <i>ALK</i> a partir de PAAF y BAG fue valorable y no valorable.....	108
Figura 30	Distribución de muestras en las categorías analizadas para el rendimiento de los estudios moleculares en función del número de marcadores empleados.....	109
Figura 31	Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de PAAF y BAG con muestras válidas para estudio molecular en función del número de marcadores utilizados.....	110

Figura 32	Distribución de muestras de BAG en las categorías de estudio de <i>EGFR</i> y <i>ALK</i> en función del porcentaje de celularidad tumoral de las muestras de BAG.....	111
Figura 33	Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de muestras de BAG en las que se solicitó estudio de <i>EGFR</i> y/o <i>ALK</i> en función del porcentaje de celularidad tumoral de la muestra de BAG.....	112
Figura 34	Comparación de la frecuencia de muestras válidas para estudios de <i>EGFR</i> (A) y/o de <i>ALK</i> (B) en función del porcentaje de celularidad tumoral de la muestra de BAG.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenocarcinoma

ADC: coeficiente de difusión aparente

ALK: Kinasa de linfoma anaplásico (del inglés, *anaplastic lymphoma kinase*)

AMP: Asociación de Patología Molecular (del inglés, *Association for Molecular Pathology*)

BAG: biopsia con aguja gruesa

BTB: biopsia transbronquial

CAP: Colegio americano de patólogos (del inglés, *College of American Pathologists*)

CCG: carcinoma de célula grande

CE: carcinoma epidermoide o escamoso

CP: cáncer de pulmón

CPCP: cáncer de pulmón de células pequeñas (o SCLC, del inglés *small cell lung carcinomas*)

CPNCP: cáncer de pulmón no de células pequeñas (o NSCLC, del inglés *non-small cell lung carcinomas*).

CPNCP-NOS: cáncer de pulmón de células no pequeñas no específico (o NSCLC-NOS, del inglés *non-small cell lung carcinomas not otherwise specified*).

CT: celularidad tumoral

DE: desviación estándar

DWI: imagen potenciada en difusión (del inglés, *diffusion weighted imaging*)

E: especificidad

EBUS: ecobroncoscopia (del inglés, *endobronchial ultrasound*)

EE.UU.: Estados Unidos

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *epidermal growth factor receptor*)

EML4-ALK: del inglés, *Echinoderm microtubule associated proteinlike 4-anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*)

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FBC: fibrobroncoscopia

FDG: fluorodesoxiglucosa

FDA: del inglés, *Food and Drug Administration*

FEV1: volumen espiratorio máximo en el primer segundo

FISH: hibridación *in situ* fluorescente (del inglés, *fluorescent in situ hybridization*)

FN: falsos negativos

FP: falsos positivos

G: Gauge

H&E: hematoxilina y eosina

IASLC: Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (del inglés, *International Association for the Study of Lung Cancer*)

ICQ: inmunocitoquímica

IHQ: inmunohistoquímica

irRC: del inglés, *Immune-related Response Criteria*)

ITK: inhibidor tirosina quinasa (del inglés, *tyrosine kinase inhibitor*)

Iv: intravenoso

LBA: lavado broncoalveolar

LDT: laboratorio de dianas terapéuticas

MED: mediastinoscopia

MEDTM: mediastinotomía

MEDCE: mediastinoscopia cervical extendida

MPR: reconstrucciones multiplanares (del inglés, *multiplanar reformations*)

MIP: proyección de máxima intensidad (del inglés, *maximum intensity projection*)

MinIP: proyección de mínima intensidad (del inglés, *minimum intensity projection*)

MTV: volumen metabólico tumoral (del inglés, *metabolic tumour volume*)

NPS: nódulo pulmonar solitario

OMS: organización mundial de la salud

PAAF: punción aspiración con aguja fina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)

PET: tomografía por emisión de positrones (del inglés, *positron emission tomography*).

PET-TC: tomografía por emisión de positrones-tomografía computarizada.

PTB-EBUS: punción transbronquial guiada por ecobroncoscopia

PTT: punción transtorácica

PTT-TC: punción transtorácica guiada por TC

PTT-US: punción transtorácica guiada por ultrasonidos

RECIST: del inglés, *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors*

ROSE: evaluación inmediata *in situ* (del inglés, *rapid on site evaluation*)

S: Sensibilidad

SEAP: sociedad española de anatomía patológica

SEOM: sociedad española de oncología médica

SUV: del inglés, *Standardized Uptake Value*

TC: tomografía computarizada

TCED: tomografía computarizada con energía dual

TCMD: tomografía computarizada multidetector

RM: resonancia magnética

US: ultrasonidos

VPP: valor predictivo positivo

VPN: valor predictivo negativo

Vs: versus

I. RESUMEN

RESUMEN

El cáncer de pulmón (CP) es una enfermedad con alta incidencia y prevalencia, así como la primera causa de mortalidad por cáncer en el mundo Occidental¹. Esto es debido, entre otros factores, a que la enfermedad se detecta en estadio avanzado, no resecable en al menos el 70% de los casos^{1,2}. Sin embargo, actualmente se dispone de terapias dirigidas a alteraciones moleculares en el carcinoma pulmonar no de células pequeñas (CPNCP), con excelentes resultados de respuesta y periodo libre de progresión. Por este motivo, es esencial identificar a los pacientes que potencialmente se pueden beneficiar de estos tratamientos. En este contexto, la obtención y el procesamiento de las muestras pequeñas para optimizar el material y realizar los estudios moleculares es fundamental^{3,4}.

La punción transtorácica guiada por TC (PTT-TC) es una de las técnicas principales para la confirmación diagnóstica en muestra citológica o histológica. Sin embargo, no es usual el empleo de aguja fina de calibre 25G para realizar todo el proceso diagnóstico y la tipificación del tumor, incluidos los estudios moleculares de *EGFR* y *ALK* en el CPNCP y este es el hecho que ha motivado la realización de este estudio.

Nuestro propósito ha sido comprobar si la punción-aspiración con aguja ultrafina (PAAF) guiada por TC es una opción con resultados comparables a los de la biopsia con aguja gruesa (BAG) para el diagnóstico de lesiones pulmonares sospechosas de malignidad, del CP y para la realización de estudios de biomarcadores predictivos en el CPNCP, con el menor daño posible para el paciente.

Con este objetivo se ha comparado una serie de 617 PAAF con aguja de 25G con otra de 247 BAG con aguja de 20G de lesiones pulmonares, ambas guiadas por TC.

Los datos obtenidos confirman la alta eficacia de la PAAF de 25G para el diagnóstico de malignidad y de carcinoma pulmonar, así como para su clasificación histológica, si bien el rendimiento de la PAAF fue inferior al de la BAG a pesar de la evaluación inmediata del material por un citopatólogo experto. La BAG presentó una frecuencia muy superior de complicaciones comparada con la PAAF (52% y 14%, respectivamente). El rendimiento de las muestras de PAAF para el estudio de mutaciones de *EGFR* fue superior al de la BAG (98% y 67%, respectivamente) siendo de especial importancia en esta última un porcentaje de celularidad tumoral >30% para obtener resultados concluyentes en al menos el 70% de los casos. Para el análisis de los reordenamientos de *ALK*, la BAG mostró un rendimiento ligeramente superior al de la PAAF (83% frente al 73%) y no se observó influencia importante del porcentaje de células tumorales en las BAG para la obtención de resultados. Por último, el rendimiento

de la PAAF para estudio de dianas terapéuticas apenas se vio influenciado por la realización previa de 3 o más marcadores diagnósticos, a diferencia de la BAG, en la que el rendimiento se reduce al 47% en estos casos.

Por tanto, la PAAF guiada por TC con aguja de 25G parece superior a la BAG para el estudio de mutaciones de *EGFR*, siendo el rendimiento muy similar al de la BAG para el estudio de reordenamientos de *ALK* y la eficiencia de ambas técnicas de muestreo para el diagnóstico de carcinoma pulmonar es alta.

ABSTRACT

Lung cancer is a very prevalent disease, and it is the first cause of cancer death toll in Occidental countries. One of the main reasons that explain its high mortality rate is that it is usually detected in an advanced stage, being not resectable in at least 70% of the cases. But recently there are new therapies available that target molecular alterations in non-small cell lung cancer (NSCLC), with excellent response results and free-period of progression. Thus, it is essential to identify those patients that can potentially benefit from these treatments. Taking this into account, the way the small tissue samples are obtained and processed in order to optimize the material and perform the molecular studies is very important.

CT-guided transthoracic lung puncture is one of the main procedures for obtaining a cytologic or histologic sample for a diagnostic tumor confirmation. Nevertheless, it is not very frequently used a 25-G fine-caliber needle to perform the complete diagnostic process and the tumor classification, including the *EGFR* and *ALK* molecular studies in the NSCLC, being this the main reason that motivated this study.

Our purpose was to determine whether a CT-guided fine needle aspiration biopsy (FNAB) could be an option with similar results to those obtained with a core needle biopsy (CNB) in the diagnosis of suspicious lung lesions, of lung cancer and in the predictive biomarkers NSCLC studies, with the lower rate of complications for the patient.

A series of 617 25G FNAB and another series of 247 CNB lung lesions specimens, both of them CT-guided, were compared.

The results confirm a high efficacy of the 25-G FNAB for the diagnosis of malignancy and of lung cancer, as well as for its histologic classification, but a lower diagnostic biopsy rate when compared to the CNB, even when the sample was immediately evaluated by an expert cytopathologist. The CNB had a much higher complications' rate compared to FNAB (52% and 14%, respectively). Samples diagnostic rate obtained for *EGFR* mutation status evaluation by FNAB procedure was higher than

with CNB (98% and 67%, respectively), taking into account the importance of obtaining for this assessment 30% or more of tumor cellularity percentage in CNB specimens, in order to achieve final results in at least 70% of the cases. The CNB obtained a slightly higher diagnostic rate compared to the FNAB (83% against 73%) when analysing the *ALK* rearrangements and no important influence to obtain results was seen of the tumor cellularity percentage in CNB samples. Finally, the FNAB diagnostic rate for therapeutic targets analysis was not influenced by the previous assessment of 3 or more diagnostic markers, as opposed to the CNB, where there is a decrease to 47% of diagnostic rate in these cases.

To sum up, CT-guided 25-G FNAB seems superior to CNB for *EGFR* mutation status assessment, having both techniques a similar diagnostic rate when evaluating *ALK* rearrangements and the efficiency of both sampling techniques for the diagnosis of lung cancer is high.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Justificación

El cáncer de pulmón (CP) es la primera causa de mortalidad por cáncer en el mundo occidental. Esta enfermedad causó 159.000 muertes en Estados Unidos (EE.UU.) sólo en el 2013 según la sociedad americana del cáncer, lo que supone el 27% de los fallecimientos por cáncer en este país⁵. En España se registraron 27.853 casos nuevos en el 2012 y causó el mayor número de fallecimientos por cáncer (21.118 muertes), muy por encima del segundo con mayor mortalidad (cáncer de colon con 14.700 muertes)⁶.

El diagnóstico de CP corresponde a un 14% y un 12% de los cánceres detectados en hombres y en mujeres, respectivamente. La mayor parte de los casos (hasta un 70%) se detectan ya en fase localmente avanzada o diseminada, lo que ha llevado a la puesta en marcha de programas de detección precoz y evaluación de la rentabilidad y beneficio de los mismos².

La frecuencia y la mortalidad del CP, junto al hecho de que en la mayor parte de los casos se detecte en fases avanzadas, lo convierten en una enfermedad relevante en la medicina actual.

Desde la primera clasificación diagnóstica de los tumores pulmonares llevada a cabo por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1981, se han realizado considerables progresos en el conocimiento de la patogénesis, histología y biología molecular del CP, lo que ha llevado a cambios en sucesivas clasificaciones. La última actualización, publicada en el año 2015, aporta parámetros para una mayor precisión en el diagnóstico no sólo en piezas quirúrgicas sino también en biopsias pequeñas y muestras citológicas y además, enfatiza en los estudios genéticos e integra el diagnóstico molecular como herramienta para el tratamiento en el CP⁷. En este aspecto, en la última década se ha producido un gran avance, en especial en los carcinomas de pulmón no de célula pequeña (CPNCP), gracias al desarrollo de fármacos específicos y de técnicas para el estudio de biomarcadores moleculares predictivos de eficacia de estas terapias dirigidas^{8,9,10,11}. Actualmente, según las guías internacionales CAP/IASLC/AMP 2013 (*College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology*)¹² y NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*)¹³, y la actualización del consenso nacional SEAP/SEOM (Sociedad Española de Anatomía Patológica y Sociedad Española de Oncología Médica)¹⁴, entre los biomarcadores moleculares que deben determinarse en

todos los pacientes con CPNCP en estadios avanzados, son las mutaciones en el gen *EGFR* y los reordenamientos de *ALK*.

Este cambio paradigmático en el conocimiento y manejo del CP refleja la importancia de obtener una muestra suficiente para hacer un diagnóstico histológico preciso y para realizar el estudio de biomarcadores moleculares.

Actualmente existen distintos métodos para la obtención de una muestra cito/histológica. Ante una lesión pulmonar sospechosa, se puede obtener muestra para un diagnóstico citológico o histológico mediante fibrobroncoscopia si se trata de una lesión central o mediante punción transtorácica guiada por TC (PTT-TC) cuando la lesión es periférica. En este último caso se puede tomar la muestra con agujas de diferente calibre (por ejemplo, aguja fina del calibre 25G y aguja gruesa de 20G) en función del tamaño y localización de la lesión, comorbilidad y factores de riesgo del paciente. La elección del tipo de aguja también depende de los medios de diagnóstico en los Servicios de Anatomía Patológica y de los protocolos establecidos en cada centro. Hasta la fecha, la utilidad y las ventajas de las diferentes PTT-TC, es decir, punción-aspiración con aguja fina (PAAF) o biopsia con aguja gruesa (BAG), frente a otros procedimientos invasivos para el diagnóstico de lesiones pulmonares sospechosas de malignidad, están descritas en la literatura^{15,3}. No obstante, las referencias bibliográficas en las que se compara la utilidad de la muestra citológica obtenida mediante PAAF frente a la muestra histológica obtenida mediante BAG en el estudio de dianas terapéuticas en el CP son escasas, concretamente si consideramos aguja fina del calibre 25G y aguja gruesa de 20G.

Este trabajo se centra en analizar las ventajas e inconvenientes, rendimiento y eficacia de ambas técnicas de PTT-TC (BAG y PAAF), para el diagnóstico histológico de CP en muestras pequeñas (citológicas versus histológicas) y para el estudio de dianas terapéuticas (*EGFR* y *ALK*) en pacientes con CPNCP en estadio clínico avanzado.

2.2 Epidemiología del cáncer de pulmón

2.2.1 Incidencia y mortalidad

El CP representa aproximadamente un 13% de todos los casos nuevos de cáncer y es responsable de alrededor del 27% de las muertes por cáncer.

Actualmente es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (primera en EE.UU.). El CP es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la primera causa de muerte por neoplasia a nivel mundial³. Según estadísticas de 2012 ocasionó 1,59 millones de muertes a nivel mundial, más del doble que el siguiente tumor en mortalidad (cáncer de hígado, 745.000 muertes)⁶.

En España se estiman 26.715 casos al año⁶ y se registraron 27.853 casos nuevos en el 2012. La edad promedio en el momento del diagnóstico es de aproximadamente 70 años¹⁶.

A nivel global, en cuanto a la incidencia por tumores, es el tercer tumor más frecuentemente diagnosticado en ambos sexos en el 2012, el más frecuente en hombres (en Europa es el 2º después del de próstata) y el 3º en mujeres (tanto a nivel mundial como europeo) después del cáncer de mama y el colorrectal. En España era el 4º tumor más prevalente en varones y el 10º en mujeres en el 2012^{6,17}.

Aunque la incidencia de nuevos casos está en disminución, no se ha reducido la mortalidad apenas en comparación con otros tumores como el cáncer de mama o el colorrectal. La elevada mortalidad de este tipo de cáncer se debe en gran medida a que la mayor parte se detectan en estadio avanzado, a diferencia de otros tumores también muy prevalentes¹ (Figura 1).

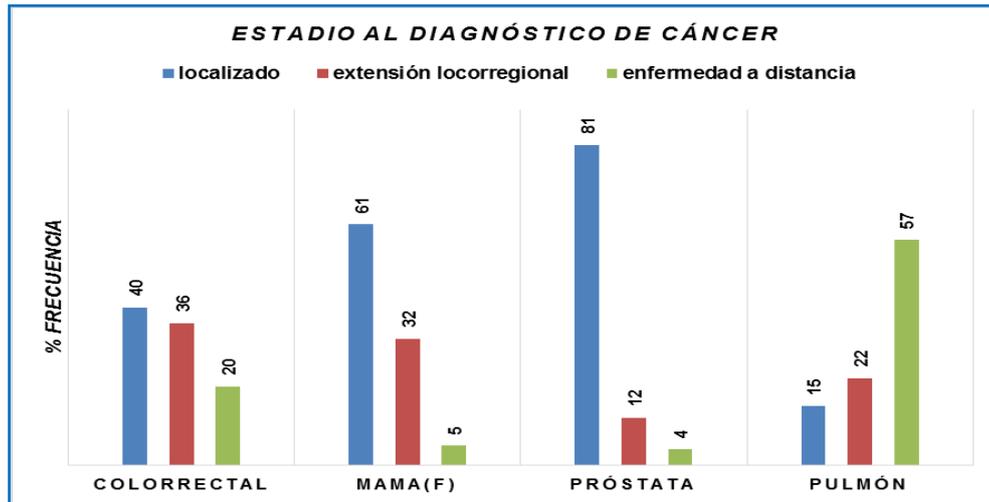


Figura 1. Frecuencia de detección de cáncer según estadio en los tipos de tumores más prevalentes en ambos sexos. Datos de EE.UU. (2004-2010). F: femenino

Incluso considerando la supervivencia a 5 años de los casos detectados en estadio precoz, la diferencia de pronóstico del CP frente al de mama, colorrectal y próstata es asombrosa¹(Figura 2). Debido al peor pronóstico del CP, a pesar de ser el 3^{er} tumor con mayor incidencia a nivel mundial, su prevalencia a los 5 años es inferior a la de otros tumores diagnosticados con menor frecuencia⁶.

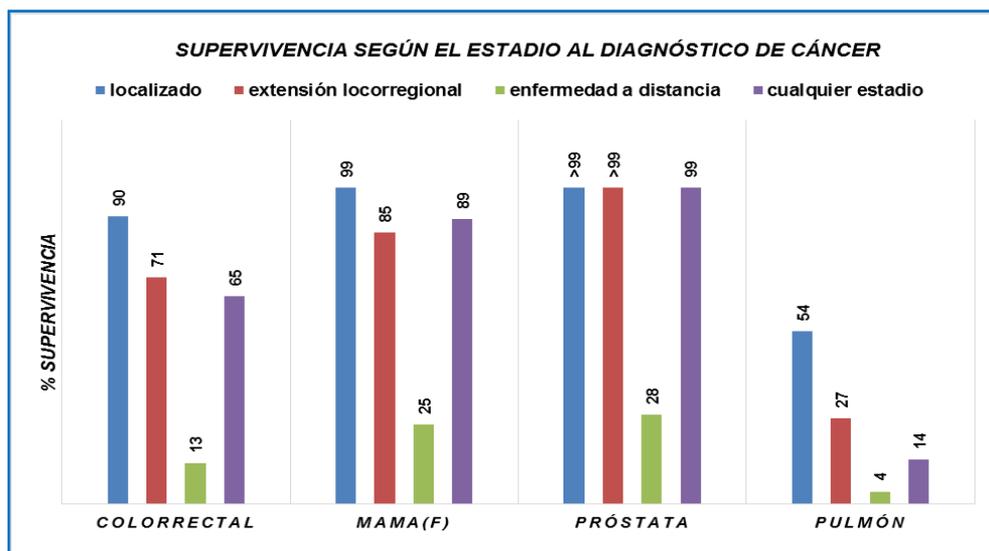


Figura 2. Supervivencia a 5 años de los tumores más prevalentes en ambos sexos según el estadio al diagnóstico. Datos de EE.UU. (2004-2010). F: femenino

En las últimas décadas se ha producido un incremento en la detección de CP en pacientes con clínica no relacionada con éste y en pacientes con diagnóstico previo de otros tumores. También ha aumentado la detección de CP en estadio localizado¹⁸.

2.2.2 Etiopatogenia de la enfermedad

El principal factor de riesgo para desarrollar CP es el tabaco. La evolución temporal de esta enfermedad con aumento de la incidencia en mujeres a finales del siglo XX, se debe fundamentalmente al aumento del tabaquismo en el sexo femenino¹⁹.

El riesgo de desarrollar CP de un fumador es 10 a 30 veces mayor que el de un no fumador y es directamente proporcional a la cantidad de tabaco consumido. Aunque el riesgo de padecer CP se va reduciendo una vez se deja de fumar, el riesgo de un exfumador siempre será superior al de un nunca fumador^{20,21}. La exposición al humo de tabaco del fumador pasivo está así mismo considerado un factor de riesgo. Las estirpes histológicas que más se relacionan con el tabaco son el carcinoma microcítico o carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) y el carcinoma epidermoide (CE)³.

La incidencia y distribución geográfica del CP también está directamente relacionada con el tabaquismo, siendo más frecuente en países desarrollados debido entre otros factores, a que el tabaquismo está más extendido en el mundo occidental.

Además del tabaco otros factores de riesgo ambientales relacionados son exposiciones ocupacionales (por ejemplo el radón, el asbesto y derivados), gases de calefacción y cocinas, así como la contaminación del aire procedente fundamentalmente del combustible diésel^{22,23}.

En un grupo independiente como factores de riesgo individuales se consideran la radioterapia, la enfermedad inflamatoria crónica de vía aérea, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el antecedente de tuberculosis pulmonar y de un tumor pulmonar, así como factores genéticos^{3,24,25,26}.

El CP se caracteriza por un complejo patrón de alteraciones moleculares. Esto quiere decir que pueden estar presentes todas las diferentes maneras de transformarse el genoma [alteraciones en el número de copias (amplificaciones, deleciones), reordenamientos (o fusiones), mutaciones en oncogenes y genes supresores tumorales, etc.]. Todas estas alteraciones son diversas y suelen afectar a la regulación de procesos celulares muy concretos, tales como la división celular, la detección y la reparación del

daño al DNA, la muerte celular programada (o apoptosis), la adhesión celular, en los factores de transcripción del DNA y en las vías de la regulación de la transducción de señales²⁷.

2.3 Clínica del cáncer de pulmón

La sintomatología inicial depende fundamentalmente de la localización y del tamaño del tumor, así como de la posible afectación de estructuras vecinas y de la diseminación regional.

Los síntomas pueden dividirse en 3 grupos: producidos por extensión locorregional, por metástasis a distancia u ocasionados por la producción tumoral de sustancias (síndromes paraneoplásicos).

2.3.1 Síntomas por extensión locorregional

Debido al crecimiento endobronquial de un tumor central puede aparecer tos seca, hemoptisis o expectoración hemoptoica, disnea, estridor o sibilancias, fiebre y tos productiva secundaria a neumonía obstructiva o incluso dolor torácico inespecífico.

En el caso de tumores periféricos síntomas frecuentes son tos, disnea, dolor torácico localizado, dolor pleurítico o absceso pulmonar por cavitación tumoral.

Por extensión por contigüidad los tumores centrales pueden producir obstrucción traqueal, parálisis diafragmática, fístula broncoesofágica, disfagia (en caso de invasión o compresión del esófago), disfonía (por afectación del nervio recurrente laríngeo) o pericarditis (que puede originar arritmias o derrame pericárdico).

El síndrome de vena cava superior se produce por compresión por adenomegalias o invasión vascular en tumores del lóbulo superior derecho, produciendo dilataciones venosas en hombros y brazos, cefalea y edema cervicofacial.

Los tumores periféricos pueden afectar a la pared torácica con invasión de costillas y cuerpos vertebrales o derrame pleural. El tumor de Pancoast o del vértice pulmonar puede invadir el plexo braquial, el ganglio estrellado, la cadena simpática, los nervios intercostales, los vasos linfáticos de la fascia endotorácica, las costillas y las vértebras vecinas. Por tanto, puede producir dolor en la cintura escapular, brazo y antebrazo, atrofia de los músculos de la mano, anhidrosis y síndrome de Horner (ptosis palpebral, miosis y enoftalmos).

2.3.2 Síntomas por metástasis a distancia

El CP disemina vía hematológica a glándulas adrenales, hígado, cerebro y esqueleto.

Las metástasis óseas suelen ser líticas y afectan predominantemente al esqueleto axial produciendo dolor intenso, hipercalcemia y elevación de la fosfatasa alcalina.

Las metástasis cerebrales pueden dar lugar a síntomas inespecíficos (cefaleas, náuseas, vómitos) o focales (convulsiones, parestesia de una extremidad, trastornos de conducta). No es excepcional que sea la primera manifestación clínica del CP al ser la metástasis más frecuente.

Las metástasis hepáticas pueden producir dolor abdominal, hepatomegalia, astenia, anorexia, ictericia y elevación de enzimas hepáticas.

2.3.3 Síndromes paraneoplásicos

Se desarrollan en aproximadamente un 10% y se deben a la producción tumoral de sustancias biológicamente activas, con posibles manifestaciones como la hipercalcemia, la hiponatremia, secreción inadecuada de hormona antidiurética, Cushing, osteoartropatía hipertrófica, acropaquias, polimiositis y dermatomiositis.

Los síntomas más frecuentes al debut de la enfermedad son la tos y el síndrome constitucional. Síntomas inespecíficos como pérdida de peso, astenia, anorexia y dolores osteomusculares u otros más específicos como cambios sutiles del humor o leve pérdida de fuerza en un miembro, así como alteraciones bioquímicas o hematológicas no explicadas por otro motivo en personas con factores de riesgo debe alertar de la posibilidad de un CP.

Los síntomas rápidamente progresivos y los síndromes paraneoplásicos, clínica secundaria a grandes adenopatías mediastínicas como la disfagia o el síndrome de vena cava superior, el dolor por metástasis óseas y la sintomatología neurológica por metástasis cerebrales son más frecuente en el CPCP, mientras que el síndrome de Horner y la hipercalcemia son más frecuentes en el CPNCP³.

2.4 Diagnóstico y estadiaje del cáncer de pulmón por imagen

Las técnicas radiológicas son claves en el diagnóstico, evaluación de respuesta a tratamiento y seguimiento del CP, especialmente la tomografía computarizada multidetector (TCMD). Por otro lado, la información metabólica que proporciona la

tomografía por emisión de positrones (PET), tiene un papel importante en el diagnóstico y estadificación inicial y probablemente en la reevaluación. A continuación detallamos las indicaciones y hallazgos característicos en cada una de las técnicas de imagen utilizadas en el CP.

2.4.1 Técnicas de imagen morfológica

2.4.1.1 Radiografía simple

Todo paciente con síntomas sugestivos de CP debe hacerse en primer lugar una radiografía de tórax. Hallazgos como nódulo/s pulmonares o masas, derrame pleural, aumento de tamaño del hilio pulmonar, engrosamiento de líneas paratraqueales, atelectasia o consolidación más atelectasia, son signos que pueden indicar la presencia de una neoplasia primaria pulmonar (Figura 3).

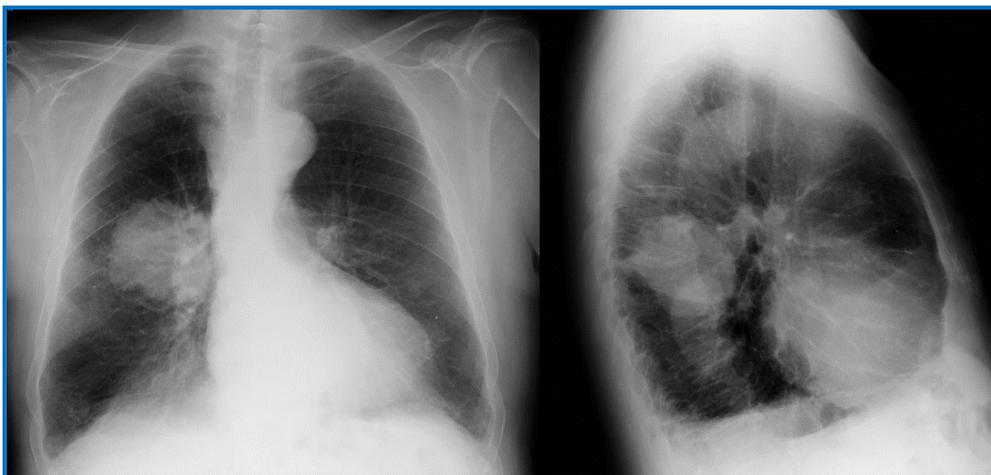


Figura 3. Radiografía de tórax en proyecciones PA y lateral. Masa pulmonar parahiliar derecha en varón fumador de 66 años con hemoptisis.

En el caso de detectarse un nódulo pulmonar solitario (NPS), es fundamental revisar radiografías anteriores dado que las lesiones estables en el tiempo al menos dos años tienen menor probabilidad de ser procesos tumorales²⁸.

La identificación de un NPS es importante porque representa muchas veces una forma curable de cáncer. Si es de nueva aparición es necesario hacer una tomografía computarizada (TC) para caracterizarlo. El tamaño del nódulo guarda relación directa con la probabilidad de malignidad (nódulos superiores a 2 cm son malignos en un 64 a 84% de los casos)³.

2.4.1.2 Tomosíntesis digital

Esta técnica resuelve dudas diagnosticas en comparación con la repetición de radiografía de tórax, tanto en lesión hiliar como en dudosas opacidades nodulares. Parece más fiable para la exclusión de nódulos periféricos que para descartar lesiones centrales. Mejora la sensibilidad (S) de la radiografía de tórax para la detección de nódulos no calcificados y mejora la especificidad (E) y la variabilidad interobservador tanto para la detección de nódulos como de lesiones hiliares²⁹. Sin embargo, apenas se utiliza en nuestro medio, pues habitualmente ante una lesión dudosa o sospechosa en la radiografía se realiza una TC.

2.4.1.3 Tomografía computarizada multidetector

La TCMD es la técnica de elección para la caracterización y el seguimiento de nódulos pulmonares, así como para estadificar y reevaluar el CP.

Ante la sospecha clínica de CP la exploración debe realizarse con contraste intravenoso (iv), para diferenciar mejor la afectación ganglionar hiliomediastínica, evaluar infiltración y/o oclusión vascular y detectar metástasis en órganos sólidos (Figura 4). La imagen debe incluir desde el nivel cervical hasta crestas ilíacas y debe obtenerse en apnea y con resolución espacial isotrópica para permitir el postproceso.

Las reconstrucciones multiplanares (MPR) y de proyección de máxima intensidad (MIP) son fundamentales en los casos de enfermedad localmente avanzada, puesto que gran parte de los criterios de reseabilidad serán evaluados en base a estas imágenes. Estas reconstrucciones permiten valorar afectación de pared torácica en tumores periféricos y la infiltración de estructuras hiliomediastínicas (tanto vascular como de vía aérea) en tumores centrales, especialmente en la neumonitis obstructiva o atelectasia distal (Figuras 5 y 6).

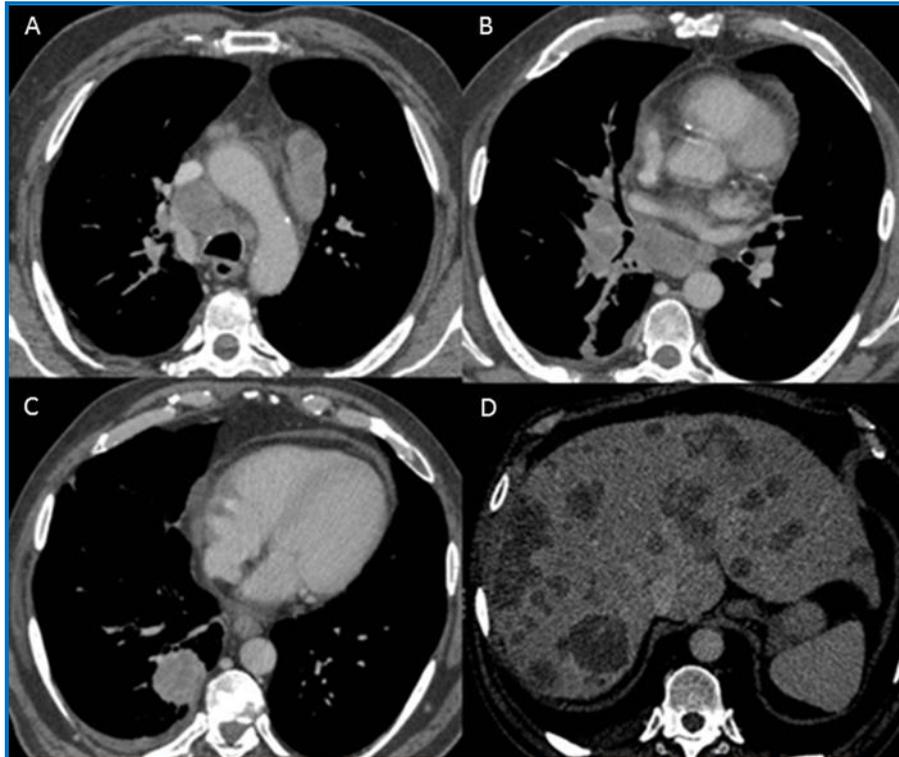


Figura 4. Imágenes axiales de TC con contraste iv. Nótese la buena delimitación de la afectación ganglionar mediastínica y las estructuras vasculares (A,B), la excelente diferenciación de los márgenes de la lesión pulmonar, el derrame pleural y pericárdico (C),

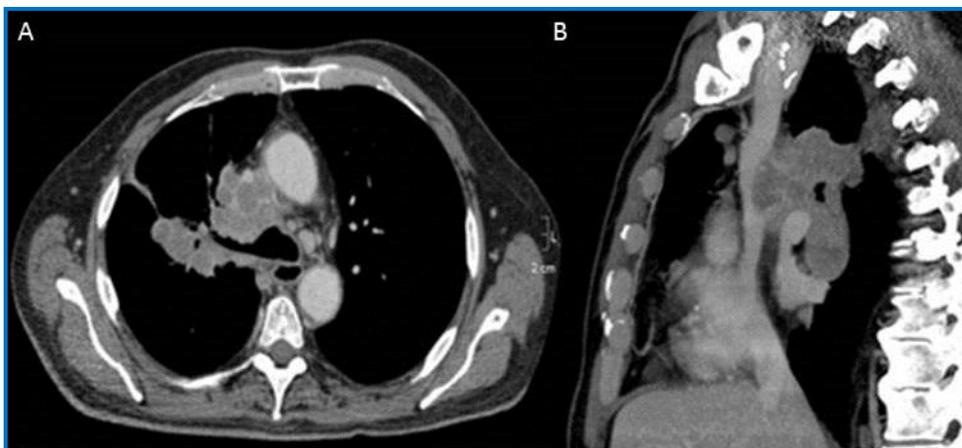


Figura 5. Reconstrucciones MPR de TC. Imagen axial oblicua para valoración de la infiltración bronquial (izquierda) e imagen sagital oblicua para evaluación de la afectación de la vena cava superior (derecha).

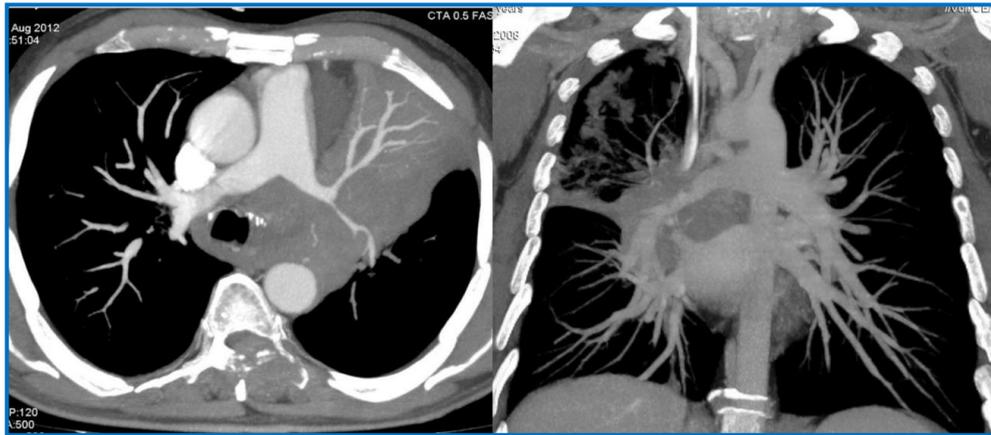


Figura 6. Reconstrucciones MIP de TC. Planos axial (izquierda) y coronal (derecha). Obsérvese la excelente visualización de la infiltración vascular hilar en dos tumores centrales.

Las reconstrucciones MIP permiten además detectar con mayor S posibles nódulos pulmonares satélites o contralaterales al tumor que pueden ser metástasis⁵.

También pueden ser útiles las reconstrucciones de proyección de mínima intensidad (MinIP) y la broncoscopia virtual para confirmar la infiltración de la vía aérea y/o conocer de manera más precisa la localización del tumor (Figura 7).

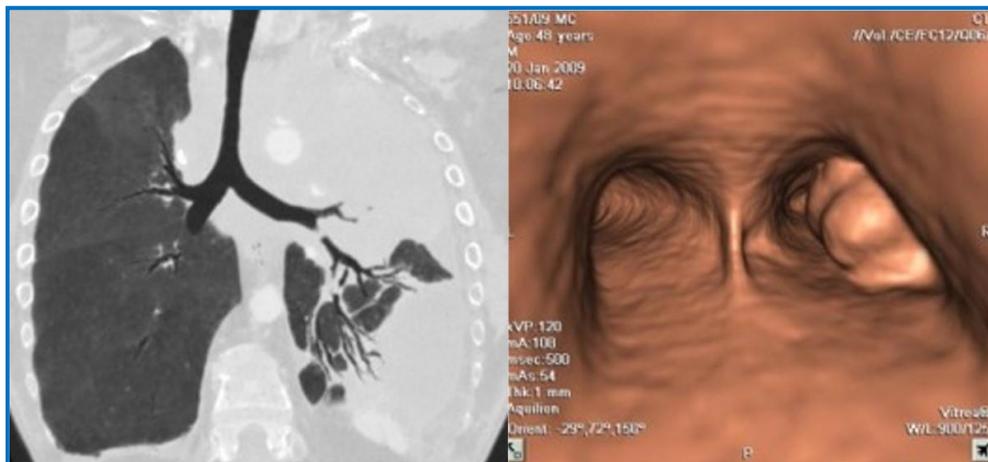


Figura 7. Reconstrucción MinIP y broncoscopia virtual en TC. Imagen de MinIP en el plano coronal que permite delimitar la afectación del bronquio lobar inferior (izquierda). Imagen de broncoscopia virtual que confirma esta afectación bronquial (derecha).

La tecnología más reciente de equipos de doble fuente de 256/320 detectores, con resolución espacial isotrópica submilimétrica y menor resolución temporal permiten realizar estudio de perfusión y monitorizar la angiogénesis tumoral³⁰.

En el caso de un NPS, hay que valorar no sólo el tamaño, los bordes, la localización y la densidad para establecer la sospecha radiológica de malignidad, sino también realizar monitorización volumétrica del crecimiento.

Datos morfológicos sospechosos de malignidad en un NPS son calcificaciones excéntricas³¹, componente sólido en una lesión de atenuación vidrio deslustrado³², contorno espiculado, lobulado o mal definido³³ y paredes gruesas e irregulares en el caso de las lesiones cavitadas^{28,32}. En series recientemente publicadas se establece correlación entre las características radiológicas, la histología y el pronóstico del paciente con adenocarcinoma (AC) de pulmón, postulándose la utilidad de la caracterización de la lesión por TC para determinar el mejor método quirúrgico^{34,35,36}.

Cuando estamos ante una lesión pulmonar de características morfológicas no definidas, de tamaño mayor a 7-8mm, se puede realizar una TC dinámica. Esta consiste en el estudio seriado en una misma localización antes y después de la administración de contraste iv a los 1, 3 y 5 minutos incluso a los 15 minutos. La falta de captación de contraste tiene un alto valor predictivo para benignidad, (96%) y un realce inferior a 15UH descarta malignidad con una S y E del 98% y 55%, respectivamente³⁷. Realce mayor de 15UH puede traducir malignidad o patología inflamatoria. Un realce superior a 20-25UH y lavado posterior de 5-30 UH es sugestivo de malignidad³⁸

Tabla 1. Utilidad de la TC en la valoración del cáncer de pulmón

Caracterización de nódulos pulmonares detectados en la radiografía de tórax
Evaluación de tamaño tumoral y posible invasión de estructuras adyacentes
Valoración de los vasos para diagnosticar infiltración vascular
Mejor valoración de neumonitis obstructiva o atelectasia que en la radiografía
Detección de posibles nódulos en la proximidad del tumor o contralaterales
Evaluación de la posible afectación ganglionar
Detección de derrame o nodularidad en pleura y/o pericardio
Detección de posible afectación ósea, hepática y suprarrenal

La estadificación radiológica del CP se hace por TC y debe hacerse según la clasificación TNM, que se basa en el análisis de 3 descriptores: «T», para el tumor primario; «N», para la afectación ganglionar y «M», para las metástasis³⁰.

A continuación se muestra la 7ª edición (2009) del sistema internacional de clasificación TNM y estadios radiológicos del CP según la misma.

Tabla 2. Sistema internacional de clasificación TNM para cáncer de pulmón

TX	Citología positiva
T1	≤3 cm
T1a	≤2 cm
T1b	>2-3 cm
T2	Bronquio principal, ≥2 cm de carina, invasión de pleura visceral, atelectasia parcial
T2a	>3-5 cm
T2b	>5-7cm
T3	>7cm, invasión de pared torácica, diafragma, pericardio, pleura mediastínica, bronquio principal, <2 cm de carina, atelectasia total, nódulo separado en el mismo lóbulo
T4	Invasión del mediastino, corazón, grandes vasos, carina, tráquea, esófago, vértebra; nódulo tumoral separado en un lóbulo homolateral distinto
N1	Peribronquiales o hiliares homolaterales
N2	Subcarinales o mediastínicas homolaterales
N3	Mediastínicas o hiliares, contralaterales, escalénicas o supraclaviculares
M1	Metástasis a distancia
M1a	Nódulo tumoral separado en un lóbulo contralateral; nódulos pleurales, derrame pleural maligno o pericárdico
M1b	Metástasis a distancia

Tabla 3. Estadios radiológicos TNM

Carcinoma oculto	TX N0 M0
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio IA	T1a.b N0 M0
Estadio IB	T2a N0 M0
Estadio IIA	T2b N0 M0
	T1a,b N1 M0
	T2a N1 M0
Estadio IIB	T2b N1 M0
	T3 N0 M0
Estadio IIIA	T1a.b T2a.b N2 M0
	T3 N1, N2 M0
	T4 N0, N1 M0
Estadio IIIB	T4 N2 M0
	Cualquier T N3 M0
Estadio IV	Cualquier T
	Cualquier N M1

La TCMD es la técnica de elección para la reevaluación del CP, aplicando en la redacción del informe radiológico los criterios RECIST v1.1, según los cuales es necesario evaluar la respuesta en las lesiones diana y no diana, describir si hay necrosis/cavitación y si hay nuevas lesiones. En pacientes con inmunoterapia deben

aplicarse los criterios de respuesta inmunológica bidimensionales irRC³⁰. Aunque la periodicidad del seguimiento de la respuesta tumoral es un tema controvertido, se recomienda hacer una primera valoración 6-12 semanas después de iniciar el tratamiento y luego cada 6-12 semanas después de haber finalizado, siempre mediante TC.

La TCMD permite valorar la evolución del tumor tras la radioterapia, si bien cambios secundarios al tratamiento como la neumonitis o fibrosis circundantes lo dificultan. La neumonitis, puede presentarse de 1 a 6 meses después de la radioterapia torácica externa y la fibrosis de 6 a 12 meses después. En los casos de fibrosis en la TC se observa una atelectasia con bronquiectasias por tracción limitada a la zona irradiada, que puede progresar hasta los 24 meses y desarrollar engrosamiento o derrame pleural. Es importante disponer de TC anteriores con contraste iv y comparar los estudios sucesivos porque la recidiva tumoral se caracteriza por crecimiento de tejidos blandos dentro de la fibrosis.

Actualmente, los avances técnicos permiten realizar adquisiciones volumétricas y vóxeles isotrópicos para el cálculo del volumen del tumor, que es más reproducible que la del diámetro mayor en un solo plano, con mayor concordancia intra e interobservador³⁹ (Figura 8).

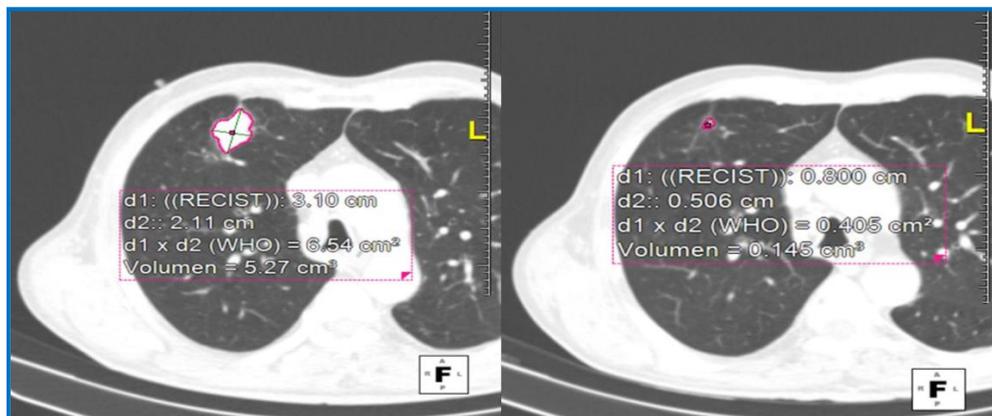


Figura 8. Medición volumétrica del nódulo pulmonar en TCMD.

Las medidas volumétricas (Figura 8) tienen mayor sensibilidad para detectar respuestas parciales y progresión, lo que podría permitir una detección más temprana de las mismas logrando cambios más precoces en el manejo de los pacientes.

2.4.1.4 Tomografía computarizada con energía dual

Los equipos de última generación adquieren estudios con distintos espectros de rayos X facilitando la caracterización de elementos químicos y permiten detectar alteraciones funcionales en ausencia de anomalías morfológicas.

Mediante la perfusión y su cuantificación es posible diferenciar necrosis de tumor viable, lo cual posibilita controlar los tumores tratados con termoablación⁴⁰.

Por otro lado, parece existir una moderada correlación entre el valor estándar de captación (SUV, del inglés *Standardized Uptake Value*) máximo obtenido en la PET y el realce máximo de yodo en los tumores, sobre todo en el CPNCP, lo que podría convertir a la tomografía computarizada con energía dual (TCED) en sustituto del PET en la evaluación de la respuesta.

La TCED también ha mostrado su utilidad en la caracterización de los nódulos pulmonares mediante estudios de perfusión. Puede ayudar a distinguir mejor entre calcificaciones y captación de yodo. También se está estudiando su precisión para clasificar los nódulos pulmonares en malignos y benignos, basándose en los diferentes grados de realce de dichos nódulos⁴¹.

2.4.2 Técnicas de imagen morfológica y funcional

2.4.2.1 TC perfusión

La TC perfusión permite evaluar la vascularización tumoral analizando temporalmente los cambios de atenuación en los vasos sanguíneos y los tejidos, mediante la rápida adquisición de series de imágenes con contraste iv. Los parámetros más utilizados son el flujo sanguíneo, el volumen sanguíneo y la permeabilidad, que se han relacionado con la angiogénesis, la vascularización tumoral y la necrosis. Los últimos estudios coinciden en que esta técnica puede predecir la respuesta terapéutica antes de observar cambios morfológicos por su sensibilidad para detectar cambios precoces en la vascularización tumoral en pacientes tratados con antiangiogénicos⁴². La limitación principal para extender su uso es la heterogeneidad de los protocolos existentes y las diferencias entre las marcas comerciales³⁰. Recientemente se han publicado las primeras guías clínicas para unificar conceptos y establecer protocolos en ensayos clínicos⁴³.

Avances tecnológicos como la reducción del tiempo de rotación del *gantry*, permiten realizar perfusión en lesiones de hasta 15-16mm de longitud craneocaudal. También ha sido clave la creación de *software* de corrección de artefactos de movimientos respiratorios y otros movimientos, que mejora la fiabilidad del análisis, para el cual la metodología será muy diferente según fabricantes /casas comerciales.

2.4.2.2 Resonancia magnética

La utilidad de la resonancia magnética (RM) para la evaluación del CP es inferior a la de la TCMD. A pesar de nuevas técnicas de corrección de artefactos por movimiento y de la mejora de las secuencias de pulso con sincronismo cardiaco y respiratorio, la imagen de RM sigue siendo tremendamente susceptible al movimiento. Sin embargo, en los tumores del vértice pulmonar la RM es superior a la TC gracias a su mayor capacidad para la diferenciación de tejidos de partes blandas. Permite evaluar mejor la invasión del plexo braquial o del cuerpo vertebral, datos fundamentales para valorar resecabilidad y para la planificación de radioterapia.

Con las secuencias de difusión (DWI), se ha mejorado la capacidad de la RM para diferenciar nódulos pulmonares benignos y malignos y para monitorizar la respuesta terapéutica⁴⁴. Se ha correlacionado el incremento de los valores del mapa de coeficiente de difusión aparente (ADC) después de la quimioterapia, con aumento de la supervivencia y del periodo libre de enfermedad⁴⁵.

Respecto a la detección de nódulos pulmonares se afirma que la DWI puede detectar hasta el 86,5% de los nódulos de entre 6 y 9 mm y hasta el 97% de los >10mm⁴⁶. Para la diferenciación de nódulo benigno y maligno la eficacia es de hasta un 91%, incluso con menos falsos positivos (FP) que el PET-TC⁴⁷. Los falsos negativos (FN) pueden ser por contenido mucinoso, necrosis, lesiones subsólidas, AC de bajo grado y metástasis⁴⁸. Los nódulos malignos presentan menores valores en el mapa de ADC que los benignos⁴⁹. Sin embargo, establecer un umbral universal de valor de ADC para diferenciarlos es difícil debido a la falta de estandarización de la secuencia. Con el valor de $ADC=1.25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$ se cita en la literatura una precisión del 91%, S del 90% y E del 100% en el diagnóstico de malignidad⁵⁰. La secuencia de difusión es útil para distinguir el tumor del parénquima colapsado en neumonitis obstructiva y/o atelectasia⁵¹.

Por otro lado, parece que la DWI puede orientar para la diferenciación de CPNCP de alto o bajo grado, dato con valor pronóstico. El valor de ADC muestra una correlación

inversa con la celularidad del tumor ($p=0,02$)⁵². Los ACs bien diferenciados presentan unos valores de ADC significativamente superiores a los tumores de estirpe epidermoide (CE) de moderado y bajo grado de diferenciación ($p=0,05$)⁵³.

Para la monitorización terapéutica, se ha propuesto evaluar el porcentaje de vóxeles con aumento significativo del valor de ADC como predictor de buena respuesta, correlacionándolo con la disminución de tamaño del tumor en TC⁵⁴.

La secuencia de perfusión con contraste iv aporta información sobre la vascularización tumoral y es de especial interés en evaluación de respuesta a inhibidores de la angiogénesis, pues permite analizar parámetros farmacocinéticas cuantitativos⁵⁵.

Por tanto, la RM con difusión y perfusión proporciona información acerca de los cambios biológicos en el tumor en respuesta a los tratamientos. En los próximos años debe lograrse una estandarización en las técnicas de adquisición, procesado y análisis, determinar el rango de variabilidad de las medidas y establecer criterios de respuesta tumoral por RM.

Por último, señalar que la RM cerebral con contraste iv es superior a la TC y a la PET-TC para la detección de metástasis cerebrales y se debe de realizar ante cualquier síntoma o signo neurológico y en pacientes asintomáticos con CP estadio III⁵⁶. En estadios más tempranos es aconsejable en las estirpes no escamosas por su mayor incidencia de afectación cerebral⁵.

2.4.3 Técnicas de imagen molecular

2.4.3.1 PET-TC

Esta técnica aporta información funcional basada en el aumento de la actividad glucolítica de los tumores y en la 2-[18F]fluoro-2-desoxi-D-glucosa (18F-FDG), radiofármaco análogo de la glucosa marcado con Fluor18⁵⁷. El metabolismo de la 18F-FDG se valora de forma semicuantitativa utilizando el SUV, que se define como el cociente entre la concentración del radiotrazador en el tejido y la dosis inyectada, dividido por el peso del paciente. Generalmente, los tumores malignos tienen un $SUV > 2,5-3$. Los valores del SUV pueden verse influidos por la glucemia, el peso del paciente o el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la adquisición del PET⁵⁸.

Las principales indicaciones del PET con 18F-FDG en CP son dudas diagnósticas en el NPS y el estadiaje tumoral cuando se sospecha enfermedad no detectada mediante otras técnicas.

En la evaluación del NPS, un aumento de captación de FDG sugiere malignidad, sin olvidar que existen FP en la tuberculosis activa, la histoplasmosis o los nódulos reumatoideos. Las lesiones con captación baja de FDG deben ser consideradas como benignas, si bien existen FN en tumores con baja actividad metabólica o hipocelulares como el tumor carcinoide, el adenocarcinoma con componente predominante lepidico y nódulos de tamaño inferior a 10 mm⁵⁹.

En los últimos años, diversos estudios han sugerido que la 18F-FDG-PET puede proporcionar información sobre las características genómicas y moleculares del tumor, como por ejemplo, ayudar a diferenciar tumores con mutaciones del gen *EGFR* de aquellos que no las tienen^{60,61}. En un estudio retrospectivo se demostró que una alta avidéz por la FDG (SUVmax ≥ 5), se correlacionaba con *EGFR* de genotipo salvaje⁶⁰. También parece mostrar utilidad en la cuantificación de la respuesta metabólica tumoral valorando el porcentaje de descenso del SUVmax a las pocas semanas del inicio del tratamiento y correlacionándolo con la progresión libre de enfermedad y la supervivencia⁶².

La PET-TC ha demostrado alta exactitud en la evaluación de adenopatías mediastínicas y en la detección de enfermedad a distancia no evidente en la TC^{63,64}. Su elevado valor predictivo negativo (VPN) en la valoración de adenopatías es fundamental, por lo que cuando hay ganglios mediastínicos mayores de 15mm y el PET-TC es negativo, es dudosa la necesidad de efectuar procedimientos invasivos para determinar el estadiaje N⁶⁵. Existen FN en micrometástasis, por lo que se recomienda mediastinoscopia cuando la PET-TC es negativa y se sospechan metástasis ganglionares debido a la localización o el tamaño del tumor, cuando el grado de captación de glucosa del tumor primario sea bajo y cuando el tamaño de las adenopatías sea menor de 16 mm⁶⁵.

Sin embargo, el valor predictivo positivo (VPP) de la PET-TC para la estadificación N es bajo debido a los FP por procesos inflamatorios-infecciosos por lo que habría que realizar mediastinoscopia en estadiaje N2 por PET-TC⁶⁶. En pacientes con enfermedad potencialmente resecable se propone biopsia de adenopatías si son positivas, o cirugía si son negativas en PET y de pequeño tamaño, excepto en tumores de localización

central o de baja actividad metabólica y cuando los ganglios tengan un eje corto mayor de 15mm⁵.

En pacientes candidatos a radioterapia, la PET-TC permite delimitar mejor la zona a irradiar, por lo que se recomienda en estadios clínicos IA-IIIa.

La PET-TC detecta metástasis ocultas no sospechadas en un 10-20% de pacientes (Figura 9), pero siempre que sea posible es necesario confirmación histológica, correlación con otras pruebas de imagen o seguimiento clínico y radiológico^{67,68}.

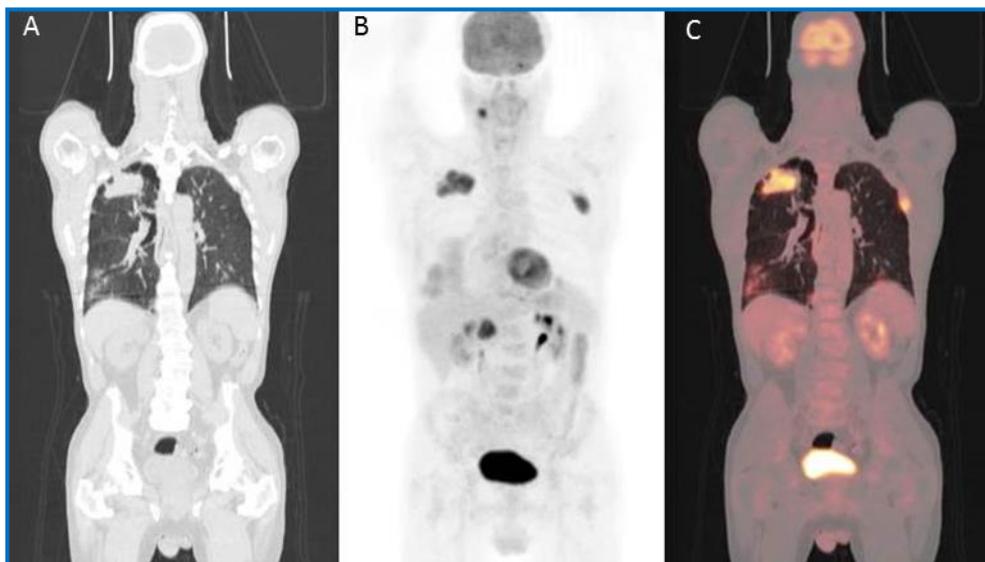


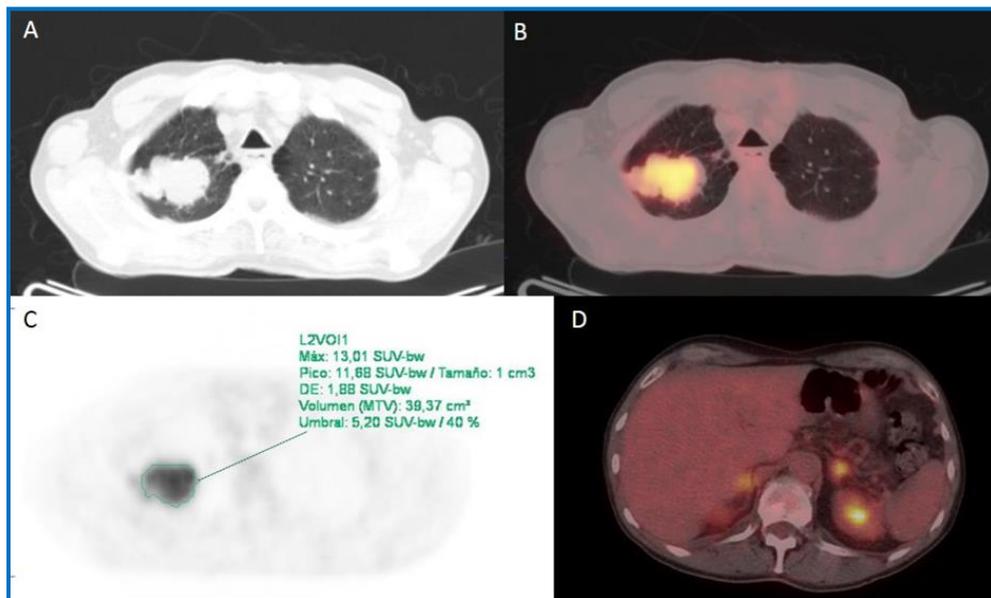
Figura 9. PET-TC de estadificación. Enfermedad diseminada al diagnóstico. Imágenes de TC (A), PET (B) y fusión PET-TC (C). Lesión pulmonar en lóbulo superior derecho en paciente con diagnóstico de adenocarcinoma, con afectación ósea en arco costal izquierdo y probable adenopatía cervical derecha patológica.

Aunque la PET-TC es más exacta que la TC para la detección de enfermedad oculta, no se ha demostrado que el estadiaje del CP mediante PET-TC mejore la supervivencia y es controvertido si reduce el riesgo de toracotomías no necesarias^{69,70,71}.

En la reevaluación del CPNCP estadio III tras tratamiento permite seleccionar los pacientes en respuesta ganglionar para cirugía con intención curativa^{72,73}. El tiempo transcurrido desde la finalización de la neoadyuvancia es importante, siendo recomendable que transcurran 8-12 semanas para disminuir los FP por inflamación^{74,30}.

El papel de la PET para la evaluación de la respuesta terapéutica ha sido muy

estudiado en la última década. Parece que detecta cambios en el metabolismo celular más rápido que las pruebas de imagen convencionales. Recientemente, ha sido introducido un nuevo marcador para monitorizar respuesta: la carga tumoral total o “volumen metabólico tumoral” (MTV) (Figura 10), considerado un potencial factor pronóstico^{75,76}. Este cada vez se utiliza más pero aún es necesario estandarizar las técnicas y métodos de medida para homogeneizar criterios de definición de respuesta⁷⁷.



Por último, aunque la 18F-FDG es el trazador más usado en imagen oncológica y PET, nuevos radiofármacos están comenzando a utilizarse para conocer el comportamiento biológico del tumor. La 18Fluorotimidina (FLT) por ejemplo, se relaciona con proliferación celular y su uso como predictor de respuesta y supervivencia está en investigación⁷⁸. También se están usando agentes antitumorales (como el erlotinib o el gefitinib) radiomarcados para ver y cuantificar la concentración del fármaco *in vivo*. Esto último permite identificar lesiones tumorales en principio no visibles en la PET con FDG⁷⁹.

2.4.3.2 PET-RM

Esta nueva modalidad de imagen híbrida ya disponible para uso clínico en escáneres de adquisición simultánea, no ha demostrado ventajas en el estadiaje torácico del CPNCP frente a la PET-TC^{80,81}. Sí se ha demostrado una correlación inversa entre los valores del SUV y los valores del ADC en difusión no Gaussiana⁸² (Figura 11). En una serie de 33 pacientes en los que se realizó PET-TC y PET-RM consecutivos, se comparó la estadificación TNM por imagen con la toracotomía. La E del PET-RM para la confirmación de enfermedad resecable fue del 92,3% y la S del 97,3%. La concordancia entre el estadiaje puede variar sustancialmente o ser casi perfecta (Cohen's kappa: 0.627-0.823)⁸³. Entre las ventajas frente a la PET-TC, destaca la reducción de radiación (de hasta un 75%) y la posibilidad de completar el estudio de extensión en la misma exploración añadiendo la RM cerebral. La diferencia fundamental es la duración del estudio, de al menos 40 minutos frente a unos 20 minutos que tarda en adquirirse un PET-TC.

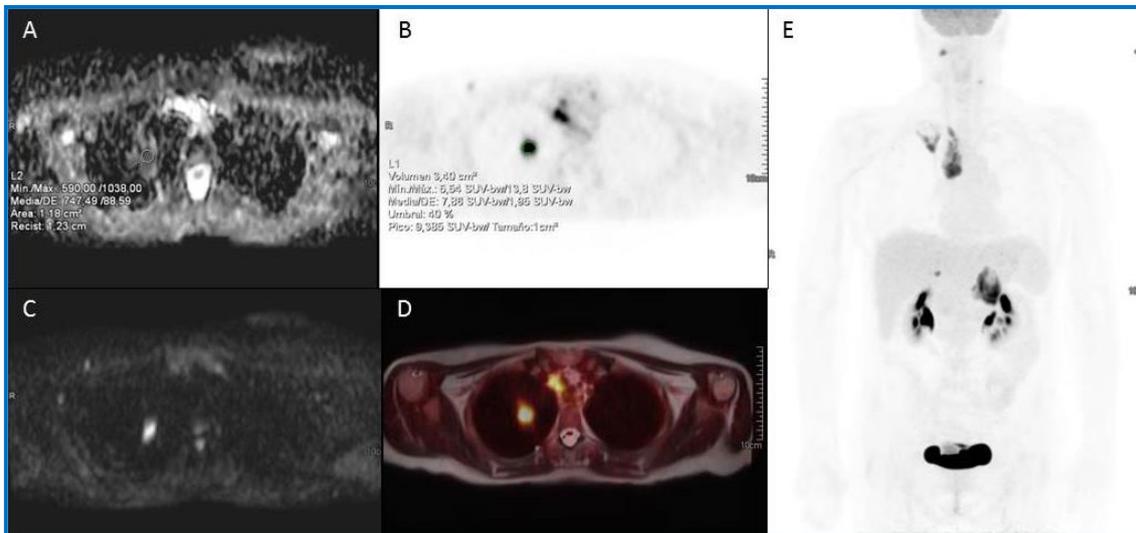


Figura 11. PET-RM de reestadificación. Comparación de los valores del SUV y del ADC. Se observa un nódulo pulmonar en el lóbulo superior derecho con restricción de la difusión (A, C) y captación de FDG en rango patológico en el PET y adenopatías con incremento de la actividad metabólica en mediastino superior (B, D, E). Obsérvese la correlación inversa del SUV (SUV máximo 13,3) (B) y el valor del ADC (ADC mínimo 590 x 10⁻³) (A). La reconstrucción MIP coronal del PET (E) muestra el tumor, la afectación mediastínica y suprarrenal, así como una adenopatía cervical derecha patológica.

2.5 Técnicas de muestreo en cáncer de pulmón

2.5.1 Técnicas radiológicas

2.5.1.1 Punción transtorácica guiada por TC

La punción transtorácica (PTT) fue aplicada por primera vez por Leyden en 1883 para diagnosticar el germen causal de una neumonía. Pasan casi 100 años hasta que su uso se generaliza en el ámbito clínico para el diagnóstico de lesiones pulmonares⁸⁴. Desde entonces ha sido ampliamente empleada pues existen hasta 490 publicaciones que dan a conocer diversos aspectos de esta técnica según se indica en una revisión sistemática de 2015⁸⁵.

Está indicada para el estudio de lesiones pulmonares periféricas cuando no se tiene diagnóstico por broncoscopia (biopsia transbronquial [BTB] y lavado broncoalveolar [LBA]) o citología de esputo y se presume que su resultado va a influir la decisión terapéutica. La indicación más controvertida es el estudio del NPS, pues un resultado negativo no excluye malignidad y un nódulo maligno requiere cirugía. Si se cuenta con patólogos expertos y se trata de pacientes cuya función ventilatoria pudiera verse deteriorada por la cirugía, la indicación es indiscutible.

La coagulopatía no corregida y la incapacidad del paciente para cooperar son las únicas contraindicaciones absolutas. Contraindicaciones relativas son la EPOC, el enfisema bulloso, la hipertensión pulmonar, una alta sospecha de tumores vasculares, la insuficiencia cardíaca, la ventilación mecánica y un evento coronario reciente.

Para la obtención de la muestra puede utilizarse aguja fina, obteniéndose una muestra para estudio citológico mediante aspirado, o aguja gruesa, más conocida como *trucut*, para realizar estudio histológico de la muestra. Existen numerosos tipos de agujas gruesas para la obtención de cilindros, si bien la principal diferencia es el uso de sistema coaxial o no coaxial, relacionado con la frecuencia de complicaciones.

Las principales complicaciones que se pueden dar son neumotórax, la más frecuente, y la hemorragia perilesional, en ocasiones con esputo hemoptoico o incluso hemoptisis. Menos frecuentemente puede aparecer dolor, infección, embolismo aéreo y siembra tumoral en el trayecto de la aguja⁸⁴.

Numerosos factores han demostrado influencia en la eficacia de la PTT-TC. El tamaño de la lesión y sobre todo la distancia a la pleura, así como otros factores como la necrosis, fibrosis, neumonías secundarias y reacciones inflamatorias peri-tumorales son causas frecuentes de muestras no representativas y FNs. Indudablemente la experiencia del radiólogo y del patólogo va a condicionar en gran medida la eficacia del procedimiento.

Otro factor estudiado en el rendimiento de la PTT-TC es la utilidad del uso de las MPR. Ohno y colaboradores observaron mejor rendimiento de la muestra con el empleo de las imágenes de MPR para guía de punción⁸⁶.

La novedosa técnica de PTT guiada por TC con haz cónico presenta en centros con experiencia similar S, E, y precisión para el diagnóstico de malignidad que la biopsia guiada por TC con modo fluoroscopia, sin diferencias significativas con respecto a la dosis de radiación⁸⁷.

2.5.1.2 Punción transtorácica guiada por ecografía

La PTT también se puede realizar guiada por ecografía (PTT-US) en lesiones pulmonares en contacto con la pared torácica. Según la literatura la rentabilidad de las muestras es comparable a la de la PTT-TC. Realizada por expertos frente a la PTT-TC sin modo fluoroscopia es más rápida y segura puesto que el trayecto y punta de la aguja se ven a tiempo real y además no supone radiación ionizante. La eficacia considerada como número de verdaderos positivos dividida por el total de punciones es de hasta el 89%⁸⁵. El riesgo de neumotórax y hemorragia según la literatura actual puede ser menor⁸⁸.

2.5.2 Técnicas invasivas no quirúrgicas

2.5.2.1 Fibrobroncoscopia

La fibrobroncoscopia (FBC) es necesaria en la práctica totalidad de los pacientes que van a tratarse mediante cirugía. Presenta un alto rendimiento diagnóstico y proporciona información útil para la reseccabilidad, con aceptable nivel de tolerancia y morbimortalidad. Su rentabilidad es superior en tumores centrales. En lesiones visibles en la endoscopia supera el 90%, siendo aconsejable la toma de una BTB, cepillado y LBA.

La S de la BTB en tumores centrales alcanza el 88% y en los periféricos dependerá del tamaño. Se dan mejores resultados en lesiones mayores de 2cm (63% frente al 34% en lesiones menores), al margen del número de muestras tomadas y la visualización de la llegada del bronquio al tumor en la TC¹⁵. En series de nódulos detectados en TC de cribado, los resultados de la FBC considerando la pieza quirúrgica como patrón oro fueron: S 13,5%, E 100%, VPP 100% y VPN 48% por lo que no se recomienda de forma rutinaria en el cribado del CP⁸⁹.

El LBA es una técnica poco sensible pero muy específica para el diagnóstico de CP, con un alto VPP (S 47%, E 91,6%, VPP 66%). La exactitud global considerando la BTB como patrón oro es de hasta un 70,5% y la concordancia de hasta el 39%. La obtención de BTB y LBA eleva la tasa de confirmación de CP⁹⁰.

Se ha analizado la utilidad del examen *in situ* de la citología en lesiones pulmonares periféricas radiológicamente sospechosas, obteniéndose un VPP de hasta el 97% con reducción del tiempo de FBC y de complicaciones e incremento del cociente coste/efectividad⁹¹.

Respecto a los factores que condicionan la exactitud diagnóstica del LBA y BTB, además del número de marcadores de inmunohistoquímica (IHQ) empleados, se obtienen peores resultados en tumores de mayor tamaño y con menor grado de diferenciación⁹².

2.5.2.2 Biopsia guiada por navegación electromagnética

Esta técnica consiste en un dispositivo de localización guiado por imagen de TC complementario a la ecobroncoscopia (EBUS) radial que se puede realizar con o sin fluoroscopia. Se recomienda en lesiones periféricas difíciles de alcanzar por FBC. Con esta técnica se puede obtener un rendimiento diagnóstico del 74-80% que mejora en combinación con el EBUS hasta un 88-90% (EBUS y NEM por separado 69% y 59%, respectivamente)¹⁵.

2.5.2.3 Punción transbronquial guiada por ecobroncoscopia

La punción transbronquial (PTB) con EBUS ha demostrado S, E, VPP y VPN para el diagnóstico de malignidad del 90%, 100%, 100% y 20%, respectivamente, con una exactitud diagnóstica del 90%, en una serie de 123 pacientes en los que la FBC o la PTT-TC fueron negativas para lesiones paratraqueales/parabronquiales o

paraesofágicas o bien se trataba de lesión periférica sospechosa con ganglios mediastínicos positivos en PET, excluyendo lesiones endobronquiales⁹³.

En metaanálisis comparativos de PTB-EBUS y punción endoscópica ecoguiada para el estadiaje N, refieren S del 86% y E del 100% de la PTB-EBUS. Existe evidencia de que la combinación de ambas es más sensible que cada una por separado, pudiendo sustituir otros métodos más invasivos⁹⁴.

En centros con experiencia de al menos 5 años en PTB-EBUS, se ha observado menor tasa de complicaciones que en las PTT-TC, un incremento del porcentaje de pacientes diagnosticados mediante esta técnica (hasta el 47%) y una reducción de las PTT y de las citologías de líquido pleural comparado al manejo previo de la lesión sospechosa de CP cuando aún no se disponía de EBUS⁹⁵.

2.5.2.4 Punción endoscópica guiada por ultrasonidos

Esta técnica puede ser de utilidad para obtener muestra del tumor primario en el caso de lesiones en contacto con la pleura mediastínica cerca del esófago. En un metaanálisis que incluye 18 estudios, se especifica S para la estadiaje N del 83% y E del 97%. Cuando se realiza en pacientes con adenopatías sospechosas en la TC, la S aumenta al 90% y la E hasta el 97%⁹⁶.

Este procedimiento permite, además, confirmar metástasis subdiafragmáticas (en glándula adrenal izquierda, ganglios del tronco celíaco e hígado) y valorar invasión mediastínica por contigüidad con más precisión que las técnicas radiológicas (S 98%, E 98%, FNs 1%, y FPs 30%) reduciendo el número de toracotomías innecesarias⁵.

2.5.3 Otras técnicas de muestreo

2.5.3.1 Citología de esputo

Es el método menos invasivo para confirmar el diagnóstico de CP, particularmente útil en pacientes con tumor central y hemoptisis. La citología positiva se asocia frecuentemente a bajo FEV1, tumores mayores de 2,4 cm y estirpe escamosa. Se recomienda como primer método de confirmación de CP en lesiones centrales y cuando la FBC y la PTT suponen alto riesgo de complicaciones. Su S oscila del 42% al 97% y su E del 68% al 100%, siendo muy variable en función de la metodología de obtención de muestras¹⁵.

Ocasionalmente, las células malignas del esputo pueden proceder de carcinomas laríngeos o faríngeos, e incluso resultar falsamente positivas en pacientes con enfermedades respiratorias inflamatorias (tuberculosis, bronquitis crónica, etc.), por lo que basándose exclusivamente en esta técnica, se precisa de un contexto clínico-radiológico compatible para establecer el diagnóstico de CP.

2.5.3.2 Toracocentesis

Cuando exista derrame pleural se deberá realizar previo a la práctica de otras técnicas más invasivas una citología del líquido pleural, pues si es positiva cambia el estadiaje y condiciona el tratamiento. La punción del derrame con guía ecográfica mejora la obtención de muestra adecuada y reduce el riesgo de neumotórax, especialmente si el derrame es escaso. La S para la detección de células malignas es del 49 al 91%, incluso superior a una biopsia pleural percutánea¹⁵.

2.5.3.3 Biopsia pleural

Puede realizarse ciega, percutánea guiada por imagen (cuando existe engrosamiento pleural sospechoso en la TC) o mediante toracoscopia en pacientes con citología negativa y derrame pero sin engrosamiento pleural en TC, con cifras de rendimiento diagnóstico entre 88% al 93% y 94% al 100%, respectivamente¹⁵.

2.5.3.4 Otros procedimientos

Cuando el tumor primario es difícilmente accesible y no hay signos de afectación pleural en las pruebas de imagen, se puede considerar el diagnóstico de CP mediante punción guiada por TC/US de lesiones hepáticas, adrenales u óseas sospechosas.

2.5.3.5 Estadificación del cáncer de pulmón mediante técnicas quirúrgicas

Los procedimientos invasivos para el diagnóstico y estadiaje del CP son la mediastinoscopia (MED), la mediastinotomía (MEDTM), la mediastinoscopia cervical extendida (MEDCE) y la videotoracoscopia.

La MED es la técnica más utilizada para confirmación de enfermedad ganglionar mediastínica en casos de sospecha y PTB-EBUS o punción endoscópica negativa o no concluyente. Permite explorar las estaciones paratraqueales derechas e izquierdas, superiores e inferiores y la subcarínica. Si el tumor es izquierdo, se precisa ampliar la

exploración a las estaciones subaórtica y paraaórtica, mediante MEDTM paraesternal izquierda o MEDCE. Realizadas en combinación en candidatos a tratamiento quirúrgico, la MED y la MEDTM paraesternal izquierda o la MEDCE presentan: S del 86%, E del 100%, exactitud diagnóstica del 94%, VPP del 100% y VPN del 90%. La tasa de complicaciones es de alrededor del 3% y la de mortalidad sobre el 0,1%.

La toracoscopia, con o sin asistencia de vídeo, permite una exploración completa de la cavidad pleural y del mediastino ipsilateral. Permite el acceso a las estaciones paratraqueales inferiores derechas, hiliares, subcarínicas, paraesofágicas, del ligamento pulmonar inferior en ambos lados, subaórticas y paraaórticas izquierdas. Es una exploración unilateral por lo que no puede descartar estadio N3, salvo que se exploren ambos hemitórax. Es útil para confirmar o descartar afectación pleural y en el diagnóstico de nódulos pulmonares periféricos, pues permite biopsiarlos o extirparlos.

2.6 Anatomía patológica del cáncer de pulmón

2.6.1 Clasificación histológica del cáncer de pulmón

Desde la primera clasificación histológica de los tumores pulmonares llevada a cabo por la OMS en 1981, se han realizado considerables progresos en el conocimiento de la patogénesis, histología y biología molecular del CP, lo que ha llevado a cambios en sucesivas clasificaciones. La última actualización, publicada en el año 2015, aporta parámetros para mayor precisión en el diagnóstico no sólo en piezas quirúrgicas sino también en biopsias pequeñas y muestras citológicas y además, enfatiza en los estudios genéticos e integra el diagnóstico molecular como herramienta para tratamiento en CP (en concreto, para terapias dirigidas)⁷.

Esta clasificación engloba múltiples tipos tumorales, tales como tumores primarios epiteliales, mesenquimales, linfocitocarios y de origen ectópico, así como tumores secundarios o metastásicos (Tabla 4). De todos ellos, el grupo más importante, por frecuencia, es de los tumores epiteliales primarios y dentro de éstos, el de los tumores epiteliales malignos o carcinomas. Dada la frecuencia de estas neoplasias, en la práctica clínica, el término de carcinoma de pulmón se hace sinónimo al de cáncer de pulmón.

Tabla 4. Última clasificación de la OMS 2015 de tumores de pulmón		
<p>TUMORES EPITELIALES MALIGNOS</p> <p>Carcinoma epidermoide</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma epidermoide queratinizante • Carcinoma epidermoide no queratinizante • Carcinoma epidermoide basaloide • Lesiones pre-invasivas: carcinoma <i>in situ</i> <p>Adenocarcinoma</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma lepidico • Adenocarcinoma acinar • Adenocarcinoma papilar • Adenocarcinoma micropapilar • Adenocarcinoma sólido • Adenocarcinoma mucinoso infiltrante • Adenocarcinoma fetal • Adenocarcinoma coloide • Adenocarcinoma entérico • Adenocarcinoma mínimamente infiltrante • Lesiones pre-invasivas • Hiperplasia adenomatosa atípica • Adenocarcinoma <i>in situ</i> <p>Tumores neuroendocrinos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma de célula pequeña • Carcinoma neuroendocrino de célula grande • Tumor carcinoide • Típico • Atípico • Lesiones pre-invasivas: hiperplasia neuroendocrina difusa 	<p>Carcinoma de células grandes</p> <p>Carcinoma adenoescamoso</p> <p>Carcinoma sarcomatoide</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma pleomórfico • Carcinoma de células fusiformes • Carcinoma de células gigantes • Carcinosarcoma • Blastoma pulmonar <p>Carcinoma inclasificable</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma tipo-linfoepitelioma • Carcinoma NUT <p>Tumores de glándula salivar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma mucoepidermoide • Carcinoma adenoide quístico • Carcinoma epi-mioepitelial <p>TUMORES EPITELIALES BENIGNOS</p> <p>Papiloma</p> <ul style="list-style-type: none"> • Papiloma escamoso: exofítico e invertido • Papiloma glandular • Mixto, escamoso y glandular <p>Adenoma</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pneumocitoma esclerosante • Adenoma Alveolar • Adenoma Papilar • Cistoadenoma mucinoso • Adenoma de glándula mucosa 	<p>TUMORES MESENQUIMALES</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hamartoma • Condroma • Tumores PEComatosos • Linfangioleiomatosis • Tumor miofibroblástico peribronquial congénito • Linfangiomatosis pulmonar difusa • Tumor miofibroblástico inflamatorio • Hemangioendotelioma epitelioide • Blastoma pleuropulmonar • Sarcoma sinovial • Sarcoma intimal de arteria pulmonar • Sarcoma mixoide pulmonar con traslocación <i>EWSR1</i> • Tumores microepiteliales <p>TUMORES LINFOPROLIFERATIVOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Linfoma marginal (MALT) • Linfoma difuso de células grandes • Granulomatosis linfomatoide • Histiocitosis de células Langerhans <p>TUMORES ECTÓPICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tumores germinales: teratoma • Timoma intrapulmonar • Melanoma • Meningioma <p>TUMORES METASTÁSICOS</p>

Los carcinomas de pulmón se clasifican en dos grandes grupos según su morfología, la cual está relacionada con una clínica y una biología molecular características que condicionan una diferente actitud terapéutica inicial. Dichos grupos son:

- Carcinomas de pulmón de célula pequeña (CPCP o SCLC, del inglés *small cell lung carcinomas*). Representan aproximadamente un 20% de los tumores. Su evolución clínica es rápida por lo que el tratamiento más común suele ser quimioterapia y/o radioterapia.

- Carcinomas de pulmón no de célula pequeña (CPNCP o NSCLC, del inglés *non-small cell lung carcinomas*). Representan aproximadamente el 80% de los CPs. Clínicamente estos tumores evolucionan con más lentitud que los anteriores de manera que el tratamiento de elección suele ser la cirugía, siempre que el estadio lo permita⁹⁷. Dentro de este grupo se incluyen los dos principales tipos histológicos del CP: el adenocarcinoma (AC) y el carcinoma epidermoide (CE) o escamoso, representando un 50% y un 30%, respectivamente.

Como se ha referido anteriormente, entre las aportaciones de la última clasificación de la OMS destacan:

a) la incorporación de nuevos criterios y terminologías en el diagnóstico de biopsias pequeñas y muestras citológicas (especialmente relevante dado que aproximadamente el 70% de los pacientes con CP se presentan en estadios avanzados y su diagnóstico histológico se basa casi exclusivamente en el estudio de este tipo de muestras).

b) la recomendación de aplicar técnicas de IHQ para subclassificar los CPNCPs (ACs *versus* CEs) en aquellos casos en los que los criterios morfológicos (con técnica de Hematoxilina-Eosina [H&E]) no sean suficientes⁹⁸. En este sentido, los marcadores de IHQ más aceptados son: TTF1 y napsin A como marcadores de AC y, p63, p40 (isoforma Δ Np63) y CK5/6 como marcadores escamosos^{98,99,100,101}. Con la combinación de estos anticuerpos se consigue clasificar como AC o CE más del 90% de los casos, evitándose el diagnóstico de CPNCP-no especificado (CPNCP-NOS, del inglés *not otherwise specified*) en biopsias pequeñas/citológicas o de carcinoma de célula grande (CCG) en pieza quirúrgica⁹⁸ (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Terminología y criterios para el adenocarcinoma, el carcinoma epidermoide y el CPNCP-NOS en biopsias pequeñas y citología comparada con los términos empleados en pieza de resección según la clasificación de la OMS 2015*		
Terminología nueva en biopsia pequeña/citología	Morfología / Técnicas especiales	Terminología en pieza de resección
Adenocarcinoma (AC) (describir patrones identificables)	Patrones morfológicos de AC claramente presentes	Patrón predominante de AC: lepidico, acinar, papilar, sólido y micropapilar
AC con patrón lepidico (si es puro, añadir la nota: un componente infiltrante no puede ser excluido)		AC mínimamente infiltrante, AC <i>in situ</i> o AC infiltrante con componente lepidico
AC mucinoso infiltrante (describir los patrones presentes: utilizar el término AC mucinoso con patrón lepidico, si el patrón lepidico es puro)		AC mucinoso infiltrante
AC con características coloidales		AC coloidal
AC con características fetales		AC fetal
AC con características entéricas ^b		AC entérico
CPNCP, sugestivo de AC ^c	Patrones morfológicos de AC no presentes pero sugestivos por técnicas especiales (es decir, TTF-1-positivo)	AC (patrón sólido puede ser un componente del tumor)
Carcinoma epidermoide o escamoso (CE)	Patrones morfológicos de CE claramente presentes	CE
CPNCP, sugestivo de CE ^c	Patrones morfológicos de CE no presentes pero sugestivos por técnicas especiales (es decir, p40-positivo)	CE (patrón no queratinizante puede ser un componente del tumor)
CPNCP-NOS ^d	Sin clara morfología ni patrones de tinción de AC, CE o neuroendocrina	Carcinoma de células grandes (CCG)

*Modificado desde los artículos de Travis et al.

b. Metástasis de un cáncer colorrectal deben ser cuidadosamente excluidas con técnicas inmunohistoquímicas y la correlación clínica.

c. Estas categorías no siempre corresponden a un AC sólido o a un CE no queratinizante, respectivamente. Los componentes pobremente diferenciados en el AC o CE se deben muestrear.

d. CPNCP-NOS patrón se puede ver no sólo en los CCG, si no también cuando en los componentes pobremente diferenciados de AC o CE que no expresan marcadores inmunohistoquímicos o mucina.

Abreviaturas: AC: adenocarcinoma, CCG: carcinoma de células grandes, CE: carcinoma epidermoide o escamoso, CPNCP: carcinoma de pulmón no célula pequeña, NOS: tipo no especificado, OMS: Organización Mundial de la Salud, TTF-1: factor de transcripción tiroideo 1.

Tabla 6. Terminología diagnóstica empleada para biopsias pequeñas y citologías en comparación con los términos para piezas de resección con carcinoma de células pequeñas, carcinoma neuroendocrino de células grandes, carcinoma adenoescamoso y carcinoma sarcomatoide según la clasificación de la OMS 2015*	
Terminología en biopsias pequeñas/citologías	Terminología en piezas de resecciones
Carcinoma de células pequeñas (CPCP)	CPCP
Carcinoma no de células pequeñas (CPNCP) con morfología neuroendocrina (NE) y marcadores NE positivos, posible carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC)	LCNEC
CPNCP con morfología NE Si los marcadores NE son negativos, comentar: se trata de un CPNCP donde se sospecha un LCNEC, pero sin diferenciación NE con técnicas especiales	Carcinoma de células grandes con morfología NE (LCNEM)
Morfología presente de adenocarcinoma (AC) y carcinoma epidermoide (CE): CPNCP-NOS. Comentar que los componentes de AC y CE están presentes, lo que podría representar un carcinoma adenoescamoso	Carcinoma adenoescamoso (si ambos componentes \geq 10%)
Patrones morfológicos de AC o CE no presentes pero con tinciones inmunohistoquímicas sugestivas de tener componentes glandular y escamoso separados: CPNCP-NOS	AC, CE, carcinoma adenoescamoso o carcinoma de células grandes con características inmunohistoquímicas poco definidas
Especificar los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas y la interpretación y comentar que podría representar un carcinoma adenoescamoso	
CPNCP con células fusiformes y/o carcinoma de células gigantes (mencionar si hay AC o CE)	Carcinoma pleomórfico, de células fusiformes y/o carcinoma de células gigantes
*Modificado desde los artículos de Travis et al.	
<i>Abreviaturas:</i> AC, adenocarcinoma; CE, carcinoma epidermoide; LCNEC, carcinoma neuroendocrino de células grandes; LCNEM, carcinoma de células grandes con morfología NE; NOS, tipo no especificado de otro modo; CPNCP, carcinoma no de células pequeñas; NE, neuroendocrino; OMS, Organización Mundial de la Salud	

2.7 Biología molecular del cáncer de pulmón

2.7.1 Introducción

Como se ha referido anteriormente, en las últimas décadas se ha experimentado un cambio paradigmático en el conocimiento y manejo del CP, en especial en los CPNCP. A medida que los avances en el estudio de la biología molecular de estos tumores han conducido a la identificación de diferentes alteraciones genético-moleculares asociadas con su desarrollo, ha sido posible dividir los CP en subgrupos genéticamente definidos de acuerdo con la frecuencia de dichas alteraciones^{102,103,104,105,106,107}. Estas alteraciones se están convirtiendo en marcadores de utilidad en el diagnóstico y en el establecimiento

del pronóstico, así como en biomarcadores predictivos de eficacia a terapias dirigidas^{8,9,10,11}. La selección del tratamiento basado en marcadores moleculares predictivos ha modificado sustancialmente el enfoque clínico de los pacientes y las líneas de investigación de los últimos años¹⁰⁸. En este sentido, la respuesta a inhibidores tirosina quinasa (ITKs) en pacientes portadores de mutaciones en el gen *EGFR* representó uno de los mayores avances terapéuticos en el CPCNP de la última década^{109,110,111}. En el año 2007, la identificación de la translocación del *ALK* se sumó al listado de biomarcadores predictivos en el CPNCP¹¹². Ambas determinaciones se consideran hoy esenciales en la práctica clínica a la hora de decidir las opciones terapéuticas^{11,113}.

Los continuos avances en el campo de la biología molecular y en desarrollo terapéutico están permitiendo la identificación de nuevos y potenciales biomarcadores predictores de eficacia a determinados fármacos, especialmente en AC de pulmón, tales como: reordenamientos de *ROS1* (recientemente incorporado a la práctica clínica según las últimas actualizaciones de las guías internacionales), *RET* y *NTRK1*; mutaciones de *KRAS*, *BRAF* y *HER2*; y amplificación de *MET* y *HER2*, entre otros^{13,5,102,103,104,113}. En carcinomas escamosos, algunos potenciales biomarcadores de interés son: mutaciones o amplificación de *PI3KCA*, amplificación de *FGFR1* o mutaciones de *DDR2*¹¹⁴.

Por último, un campo prometedor emergente en el tratamiento del CP es la inmunoterapia, con la expresión de *PD-L1* como posible biomarcador inmune¹¹⁵.

2.7.2 Recomendaciones para la determinación de *EGFR* y *ALK* en el carcinoma de pulmón no célula pequeña

La determinación de las mutaciones en el gen *EGFR* y de los reordenamientos de *ALK* se debe realizar en todos los pacientes con CPNCP no escamoso (AC, CPNCP-NOS o CCG) estadio IV, independientemente del hábito tabáquico y en los no fumadores independientemente de la histología, según las guías internacionales CAP/IASLC/AMP 2013¹² y NCCN¹³ y la actualización del consenso nacional SEAP/SEOM¹⁴.

2.7.3 Tipo de muestra óptima y gestión de la misma para el estudio de *EGFR* y *ALK*

Respecto a la muestra óptima para el estudio molecular de biomarcadores predictivos, se recomienda utilizar muestras fijadas en formol e incluidas en parafina. Una muestra obtenida por cirugía, broncoscopia o biopsia/citología por punción es igual de válida siempre que tenga una cantidad suficiente de células tumorales. Las muestras citológicas se consideran adecuadas, prefiriéndose los bloques celulares^{116,14}. En centros altamente especializados, cualquier muestra citológica correctamente obtenida y procesada es válida para estudios moleculares convencionales (extensiones teñidas, líquidos, bloques celulares, citología líquida, etc.)^{14,117}. Se considera fundamental revisar todas las muestras tumorales (tanto biopsias como citologías) de un paciente a la hora de decidir sobre cuál se van a realizar los estudios de biomarcadores^{116,99}.

Con el objetivo de tratar de garantizar tanto el diagnóstico anatomopatológico como la determinación de múltiples biomarcadores predictivos se recomiendan protocolos de aprovechamiento tisular^{14,99}. Se recomienda determinar *EGFR* y *ALK* de forma simultánea. En los casos en los que no sea posible, se aconseja realizar las secciones para ambos biomarcadores al mismo tiempo, aunque el estudio de uno de ellos se active sólo en el caso de que el otro haya sido negativo¹⁴.

2.7.4 Mutaciones de *EGFR*

Las mutaciones en el gen *EGFR* se identifican en aproximadamente el 10-16% de los CPNCP en nuestro medio, siendo más frecuentes en AC de patrón lepidico, papilar o micropapilar, y en pacientes no fumadores^{109,110,111,118,119,120,121}. Las mutaciones más frecuentes y que se relacionan directamente con sensibilidad al tratamiento con inhibidores específicos afectan al exón 19, tratándose de deleciones que conservan la pauta de lectura (*in-frame deletions*) entre los codones 746 y 759 (45-50%), seguidas de mutaciones puntuales tipo “cambio de sentido” (*missense point mutations*) en el exón 21 [sustitución del aminoácido leucina por arginina en la posición 858 (L858R)] (35-45%). Otras mutaciones sin clara relación con la respuesta a fármacos inhibidores específicos comprenden inserciones y/o duplicaciones en el exón 20 y mutaciones puntuales en el exón 18^{109,110,111}.

En relación a la metodología, las pruebas clínicas para la determinación de *EGFR* deben ser capaces de detectar todas las mutaciones individuales que han sido

informadas con una frecuencia de al menos un 1% de los AC de pulmón *EGFR* mutados^{116,14}. Se recomienda utilizar, siempre que sea posible, un método de alta sensibilidad como los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real cobas *EGFR* Mutation Test (CE-marked, Roche Molecular Systems) o theascreen *EGFR* RGQ PCR Kit (CE-marked, Qiagen). Asimismo, se aconseja sólo utilizar la secuenciación directa cuando el porcentaje tumoral sea de al menos un 30%^{14,122,123}.

2.7.5 Reordenamientos de *ALK*

La presencia de la translocación de *ALK* se identifica en el 3-10% de los CPNCP^{124,125}, siendo más frecuente en AC de patrón cribiforme o con células “en anillo de sello”, en estadios avanzados, en pacientes más jóvenes y con escasa o nula historia de tabaquismo¹²⁶. La translocación de *ALK* no suele coexistir con las mutaciones de *EGFR*¹⁰⁴.

En cuanto a la metodología disponible, se recomienda su determinación mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas de rotura con color dual¹¹⁶, como por ejemplo la sonda comercial Vysis® *ALK* Break-Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Inc.), única aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) hasta la fecha, si bien existen otras sondas en el mercado disponibles en la actualidad. Por otra parte, la IHQ utilizando anticuerpos con alta sensibilidad, como por ejemplo D5F3 (Ventana) y 5A4 (Novocastra), se propone, según las guías internacionales y nacionales en uso hasta la fecha, como método de cribado^{116,14,127}, aunque las futuras actualizaciones de estas guías prevén incluirlas como método diagnóstico.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La punción aspiración con aguja fina (PAAF) de calibre 25G guiada por TC, realizada por radiólogos expertos y con la colaboración del citopatólogo *in situ*, permite en la mayor parte de los casos, obtener material suficiente y adecuado para el diagnóstico citopatológico y el estudio de dianas terapéuticas del carcinoma de pulmón no de células pequeñas (CPNCP), incluso con resultados comparables a la rentabilidad de la biopsia con aguja gruesa (BAG) de calibre 20G y con un porcentaje de complicaciones significativamente inferior.

3.2 Objetivo general

Analizar la eficacia del muestreo mediante PAAF con aguja calibre 25G y BAG con aguja de calibre 20G, ambas guiadas por TC, de lesiones pulmonares radiológicamente sospechosas de malignidad, para el diagnóstico citopatológico e histológico del cáncer de pulmón y para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP: mutaciones de *EGFR* y reordenamientos de *ALK*.

3.3 Objetivos específicos

1. Conocer la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN), la eficiencia y la exactitud diagnóstica de ambas técnicas de muestreo para el diagnóstico citológico/histológico de malignidad en lesiones pulmonares sospechosas por su aspecto radiológico en TC, considerando el diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica el patrón oro.
2. Comparar la sensibilidad, la especificidad, el VPP, el VPN y la eficiencia de ambas técnicas de muestreo para el diagnóstico de cáncer de pulmón en lesiones pulmonares sospechosas en TC, considerando el diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica el patrón oro.
3. Conocer el rendimiento diagnóstico de la PAAF y BAG guiadas por TC de lesiones pulmonares, es decir, la frecuencia de muestras concluyentes para diagnóstico citológico/histológico.

4. Evaluar el tipo y la frecuencia de complicaciones derivadas de PAAF y BAG guiadas por TC y analizar su posible asociación con características generales de la muestra (localización de la lesión, sexo y edad del paciente), y con diagnóstico citopatológico o histológico de lesión benigna y maligna.
5. Determinar el rendimiento diagnóstico de las muestras obtenidas con aguja 25G y con aguja 20G para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP no escamoso: mutaciones de *EGFR* y reordenamientos de *ALK*.
6. Estudiar la relación entre el número de marcadores de diagnósticos/predictivos empleados y el porcentaje de muestras con material insuficiente para el posterior estudio molecular de mutaciones de *EGFR* y reordenamientos de *ALK*.
7. Analizar la relación entre el porcentaje de celularidad tumoral en las muestras obtenidas mediante BAG y la obtención de resultados concluyentes en los estudios moleculares en CPNP no escamoso.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Selección de los casos

4.1.1 Criterios de inclusión

Se trata de un estudio retrospectivo observacional en el que se han incluido todas las muestras pequeñas de todos los pacientes en los que se realizó una PAAF con aguja de calibre 25G en el Hospital Universitario La Paz o una BAG con aguja de calibre 20G en el Hospital Universitario HM Sanchinarro, ambas guiadas por TC, de una lesión pulmonar sospechosa de malignidad. Se incluyeron todos los pacientes con PAAF o BAG guiada por TC realizada desde Enero del 2009 hasta Febrero del 2014.

En un primer paso se decidió la indicación de obtención de la muestra mediante esta técnica en un comité multidisciplinar de patología pulmonar, compuesto por radiólogos expertos en radiología torácica, patólogos con amplia experiencia en pulmón, neumólogos, broncoscopistas, cirujanos torácicos, oncólogos y radioterapeutas con experiencia en el tratamiento y manejo del cáncer de pulmón.

La indicación de la PTT-TC fue en la mayor parte de los casos la detección de una lesión pulmonar con criterios radiológicos de malignidad, es decir, con aspecto de tumor primario en TC y de localización periférica. En estos casos se detectó al paciente una lesión parenquimatosa sólida, de bordes espiculados o márgenes irregulares o una lesión subsólida, redondeada y de contorno liso, de al menos 1 cm de diámetro.

También se incluyeron pacientes con enfermedad oncológica conocida y presencia de nódulo/s pulmonares, con aspecto de posible tumor pulmonar primario o incluso, compatibles por las características radiológicas con metástasis, en los que se requería confirmación histológica.

En determinadas ocasiones, la indicación vino dada por ausencia de material suficiente en la muestra inicial para el estudio molecular de biomarcadores predictivos (por ejemplo, *EGFR* y/o *ALK*) en pacientes con CPNCP y enfermedad en estadio no quirúrgico, sin respuesta o con progresión de enfermedad tras completar tratamiento con una o varias líneas de quimioterapia. En la mayoría de estos casos se trataba de pacientes previamente diagnosticados en otros centros.

4.1.2 Criterios de exclusión

La imposibilidad de realizar el diagnóstico de la lesión pulmonar a estudio mediante PTT-TC puede venir dada por la localización o características de la lesión, por la comorbilidad y capacidad para colaborar durante el procedimiento del paciente o por alteraciones de la coagulación.

No se consideraron para PTT-TC aquellos pacientes que presentaban lesiones centrales, es decir, en el hilio o parahiliares por riesgo de lesión de grandes vasos, lesiones localizadas muy posteriores y a la altura de la escápula por imposibilidad técnica, lesiones en lóbulos superiores adyacentes a la línea pleural anterior, por su localización en plano posterior a los vasos mamarios internos y lesiones de 1-2 cm de diámetro en senos costofrénicos, por la proximidad al diafragma y la variación de la posición de la lesión con la respiración, siempre mayor en las bases pulmonares.

Aquellas lesiones con tamaño inferior a 1 cm de eje mayor, independientemente de su localización, se descartaron por la dificultad para posicionar la aguja de manera correcta con este tamaño, considerando las variaciones en la posición de la lesión por los movimientos respiratorios, dado que ambos procedimientos, BAG o PAAF, se realizaron sin modo fluoroscopia.

Lesiones de probable naturaleza vascular, contiguas a vasos pulmonares de mediano calibre o lesiones muy vascularizadas fueron descartadas para la BAG por el riesgo de sangrado.

Se desestimó el procedimiento en algunos pacientes que por su estado cognitivo o capacidad física, no pudiesen colaborar con el mantenimiento de la posición requerida según la localización de la lesión, o bien por la imposibilidad de colaborar con el ritmo de la respiración.

En aquellos pacientes con EPOC y signos radiológicos de enfisema severo en TC, se valoró en equipo multidisciplinar y/o con el neumólogo la relación beneficio/riesgo para la realización de la punción guiada por TC y especialmente, se consideró la posibilidad de obtener diagnóstico mediante PAAF en lugar de BAG para minimizar el riesgo de neumotórax postpunción.

Alteraciones de la coagulación no corregibles con INR $>1,5$ o < 50.000 plaquetas, se consideraron contraindicaciones absolutas, tanto para la BAG como para la PAAF.

4.2 Procedimiento radiológico

Como se ha mencionado con anterioridad, todos los pacientes fueron presentados en el comité multidisciplinar de patología pulmonar en el que se determinó la indicación de la PTT-TC, en base a la revisión del TC y pruebas anteriores realizadas en nuestro centro o en otros hospitales. En este grupo de trabajo multidisciplinar se decidió que la técnica más adecuada para la obtención de muestra en cada caso concreto era la PTT-TC por la localización de la lesión y su tamaño.

Los pacientes fueron informados de forma verbal en la consulta del clínico de la indicación del procedimiento, de los requerimientos para su realización y de forma resumida de los pasos del mismo y posibles complicaciones. Se les dio un documento redactado en el que se resume el procedimiento y posibles complicaciones del mismo, y en el que autorizan la realización de la punción, denominado consentimiento informado (anexos I y II). Todos los pacientes trajeron este documento firmado el día de la realización de la PTT-TC.

En todos los casos se descartaron alteraciones de la coagulación mediante análisis en las 24-48 horas previas a la punción.

Antes de iniciar el procedimiento, el radiólogo comentó con el paciente la dinámica de la punción, la importancia de la colaboración manteniendo la posición y el ritmo respiratorio y las posibles complicaciones más frecuentes.

Una vez revisadas las imágenes del TC previo para planificación de la punción, se colocó al paciente en decúbito supino, prono o lateral en la mesa del TC, siempre en una posición que permitiendo alcanzar la lesión, *a priori* el paciente afirmara que podía mantener todo el tiempo estimado para completar el procedimiento. En todas las punciones, PAAF o BAG, se realizó el procedimiento siguiendo los mismos pasos para la colocación de la aguja en la lesión, sin disponer de modo fluoroscopia para observar la posición de la punta de la aguja y el trayecto en tiempo real.

Una vez fue escogida la posición del paciente se hizo una TC de la lesión, para escoger el punto de entrada, el ángulo y la longitud de la aguja que se fuera a introducir, evitando estructuras óseas y vasculares interpuestas en el trayecto de la aguja. En base a este criterio, se escogió la posición de mesa más adecuada para la introducción de la aguja y se repitió el corte de TC con las coordenadas elegidas, comprobando la respiración del paciente, es decir, corroborando que estábamos en la posición de mesa

idónea. En esta posición de mesa se colocó un marcador radiopaco en la piel, y se comprobó de nuevo la posición y la respiración pausada del paciente.

A continuación guiándonos por este marcador en la piel se eligieron las segundas coordenadas: se escogió el punto de entrada medial o lateral a uno de los puntos radiopacos y se midió la distancia desde el punto escogido hasta la pleura y desde dicho punto al margen de la lesión, así como la angulación necesaria en caso de planificarse un trayecto oblicuo y no perpendicular a la mesa de TC. Seguidamente se marcó con un rotulador estéril el punto seleccionado en base a las coordenadas X e Y, posición de mesa y marcador en la piel, iluminando la línea del corte de TC en la piel del paciente con luz láser desde el *gantry*. Se retiró el marcador y se movió la mesa del TC dejando suficiente espacio desde el *gantry* para realizar cómodamente la punción. Se desinfectó la piel previo uso de guantes estériles, limpiando la zona con clorhexidina o povidona yodada (Betadine[®]) con cuidado de no borrar el punto marcado con rotulador. En el caso de las BAG se administró anestésico local y en el caso de optar por una PAAF se procedió a la colocación de la aguja directamente.

La anestesia administrada previa a la introducción de la aguja de biopsia fue mepivacaína al 2% (Mepivacaína Iny. Braun[®] 2%), realizando en primer lugar un habón intradérmico. Posteriormente se fue anestesiando en profundidad con una aguja intramuscular o intradérmica, según el espesor del plano subcutáneo y muscular, sin llegar a tocar la pleura (distancia conocida por la medida efectuada previamente).

En las PAAF, el procedimiento fue realizado en un TC helicoidal de 16 detectores (Somatom[®] 4 Plus, Siemens, Erlangen, Alemania). El protocolo de TC incluye primero un topograma de 120 kV y 25 mA y posteriormente una hélice de 120 kV, 50 mA, grosor de corte de 3 mm, pitch de 1 y reconstrucción de 1,5 mm.

La punción fue realizada por un residente de radiología bajo la supervisión de un radiólogo especialista en punciones de tórax si se trataba de una lesión en principio fácil de pinchar. En caso de punciones de cierto grado de dificultad, o de mayor riesgo por proximidad de la lesión a estructuras vasculares, así como en pacientes con comorbilidad asociada que aumentara el riesgo de neumotórax la punción fue realizada por un radiólogo con amplia experiencia (de al menos 8 años) en este tipo de procedimientos.

Se emplearon agujas de 25G BD Spinal Needle (Becton Dickinson S. A., San Agustín del Guadalix, Madrid, España) de 9, 11 ó 15 cm de longitud según la profundidad de la lesión, con marcas centimetradas (Figura 12).

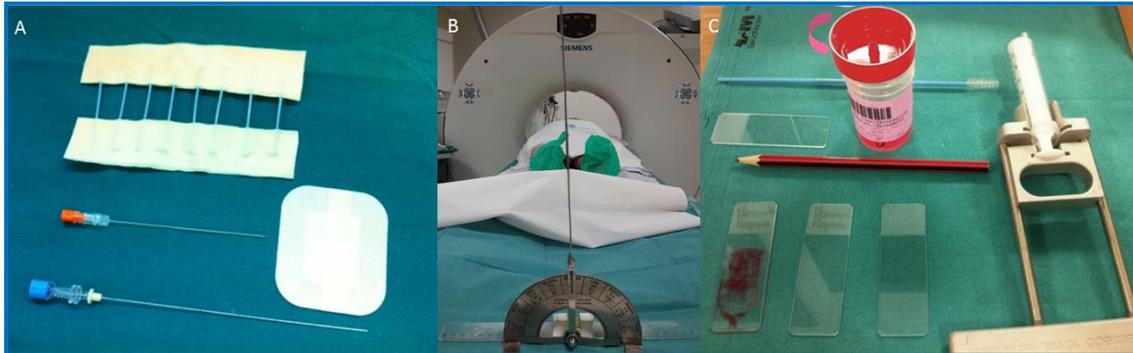


Figura 12. Material para PAAF guiada por TC: Marcador metálico, agujas de calibre 25G y apósito (A), goniómetro (B), portas, pistola Cameco® y solución CytoLyt® (flecha) (C).

Con la aguja escogida según el punto de entrada se procedió a la colocación en la dirección adecuada, con el ángulo necesario desde el punto seleccionado para la punción. Para ello se dispuso de la ayuda de dos técnicos del servicio de radiología, uno a los pies del paciente y otro frente al radiólogo que realiza la punción. En los casos en los que el trayecto de la aguja debía ser oblicuo, se dio la angulación adecuada para introducir la aguja utilizando un goniómetro colocado a los pies del paciente sobre la mesa del TC, según el ángulo medido previamente en el corte de TC seleccionado.

A continuación, previa apnea del paciente, se introdujo la aguja la longitud necesaria para dejar la punta en el borde de la lesión (distancia previamente calculada), ayudándonos de las marcas centimetradas de la aguja. Se comprobó la posición de la punta de la aguja mediante un corte de TC en la misma posición de mesa inicialmente seleccionada (Figura 13).

En caso de no estar la aguja en el borde de la lesión se retiró ésta y se realizó una nueva punción con las mismas coordenadas, angulación y longitud de aguja escogidos inicialmente. Una vez comprobada la correcta posición se introdujo la aguja la longitud adecuada hasta el centro de la lesión o hasta la zona que pareciera más sólida.

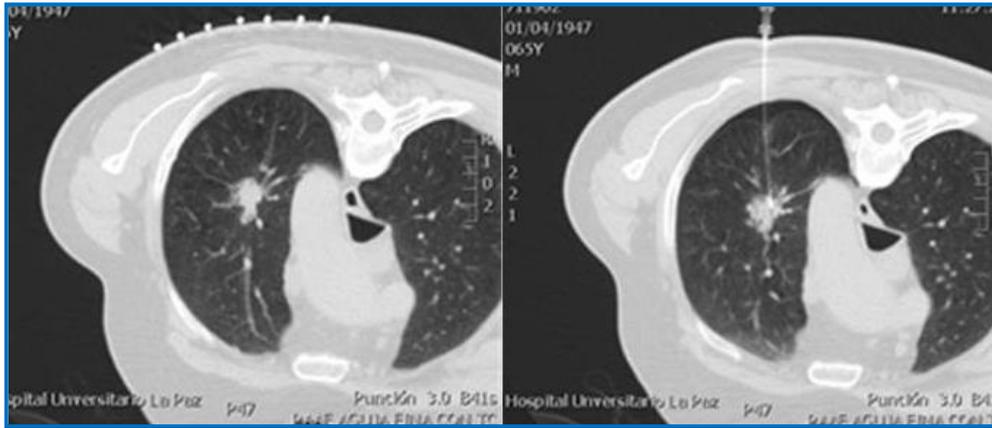


Figura 13. PAAF guiada por TC. Muestreo de nódulo pulmonar sospechoso en el lóbulo superior derecho en posición de decúbito prono. Colocación del marcador metálico para planificación del punto de entrada (izquierda) e introducción de la aguja comprobándose la posición de la punta en la lesión (derecha). Nótese la aparición de pequeño neumotórax inmediato.

Seguidamente el patólogo, experto en citología y presente en la sala de punciones realizó la aspiración con movimientos repetidos de avance y retirada de la aguja unos milímetros y empleando la pistola Cameco®. Extendió la muestra sobre un porta, en seco, lo tiñó con Diff-Quick® y evaluó *in situ* al microscopio óptico la validez de la muestra (Figura 14). El resto del material se incluyó en citología líquida (Cytolyt®) para su estudio posterior (Figura 15). En caso de frotis hemorrágico o insuficiente celularidad se realizó una segunda punción, normalmente desde el mismo punto en la piel y con otra aguja, hasta un máximo de tres pases, siempre y cuando el paciente lo tolerase.



Figura 14. Material para valoración *in situ* de las extensiones citológicas.

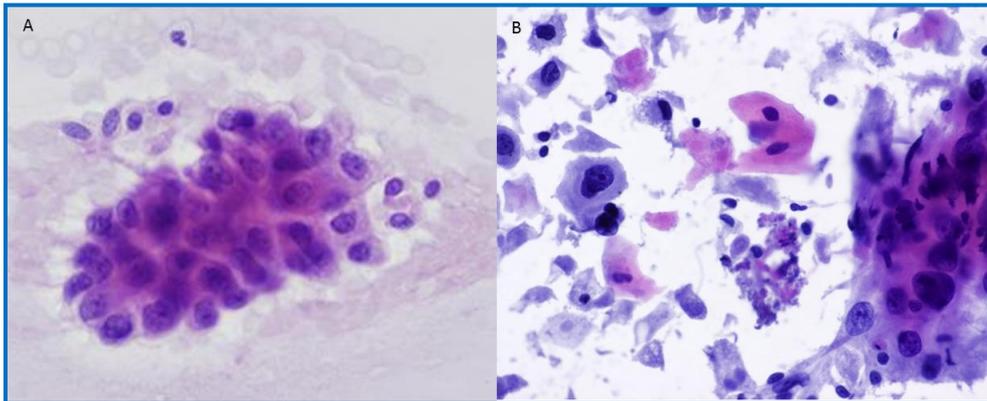


Figura 15. Muestra de PAAF con citología líquida. Tinción de Papanicolaou. A. Adenocarcinoma. Se observa un grupo tridimensional de células atípicas con citoplasmas claros, de bordes mal definidos, con núcleos redondeados de carioteca irregular con nucleolo. B. Carcinoma epidermoide. Células sueltas o en grupos con citoplasmas densos de bordes bien definidos en ocasiones queratinizados y núcleos grandes irregulares con cromatina tosca.

Las BAG se realizaron en un TC de 64 detectores (Aquilion® 64, Toshiba America Medical Systems) seleccionando el protocolo de punciones (120 kV, 300 mA, grosor de corte de 3mm, pitch de 1 y reconstrucción de 1,5 mm).

Todas las BAG las realizó un mismo radiólogo intervencionista experto en este procedimiento con más de 10 años de experiencia.

Se empleó una aguja localizadora-coaxial calibre 20G de 15 cm (SPEEDYBELL & INTRODUTTORE, biopsybell s.r.l., Mirandola (MO), Italia) (Figura 16).

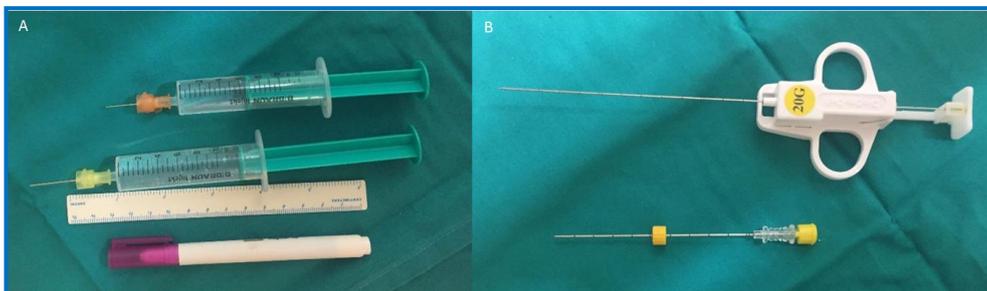


Figura 16. Material para BAG guiada por TC: Anestesia precargada, regla y rotulador estéril para marcar punto de entrada en la piel (A), aguja empleada: sistema coaxial semiautomático para obtención de cilindros de calibre 20G (B).

Una vez comprobada la posición de la punta de la aguja guía en la lesión (previo procedimiento similar al de las PAAF para su colocación) se extrajo el fiador metálico y a través de la aguja coaxial se introdujo la pistola de biopsia, obteniéndose muestras de 20 mm de longitud. En todos casos se obtuvieron 3-4 cilindros a diferentes profundidades si el tamaño de la lesión lo permitió. Tras la retirada de la aguja de biopsia, se comprobó siempre macroscópicamente la calidad del material al introducirlo en un bote con formaldehído al 10%. Tras la finalización de la punción, ya fuese PAAF o BAG, se realizó un control por TC de la lesión para descartar complicaciones inmediatas como neumotórax o hemorragia perilesional (Figura 17).

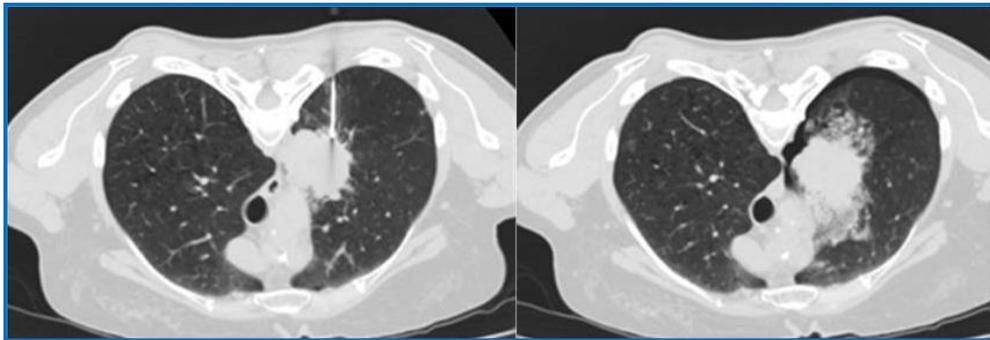


Figura 17. BAG guiada por TC. Biopsia de lesión pulmonar en el lóbulo superior derecho en posición de decúbito prono. Comprobación de la posición de la aguja en el margen de la lesión (izquierda). Aparición de pequeño neumotórax y hemorragia perilesional tras la retirada de la aguja (derecha).

En el caso de las BAG el patólogo no estaba presente *in situ* para validar la muestra dado que el diagnóstico histológico se hacía en diferido (24-48 horas después), tras la fijación e inclusión en parafina del material obtenido y tinción de H&E (Figura 18).

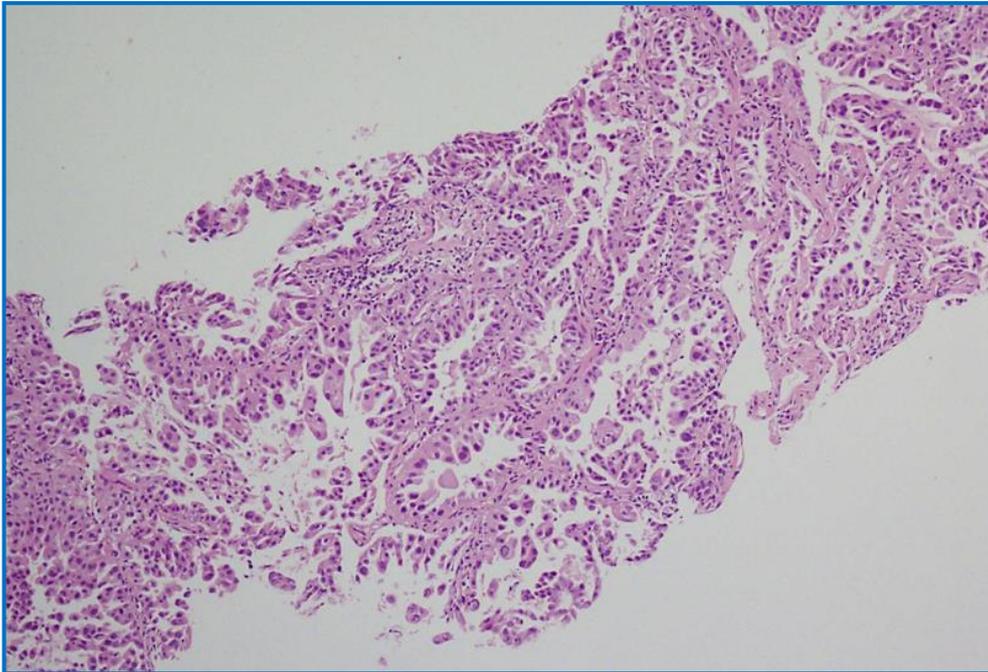


Figura 18. Muestra tisular obtenida mediante BAG. Tinción H&E, 40x. Muestra procedente de un paciente con diagnóstico de adenocarcinoma de crecimiento lepidístico.

En todas las punciones se redactó un informe en el PACS detallando la localización y el tamaño de la lesión, el tipo de procedimiento realizado, el calibre de la aguja empleada, el número de pases efectuados en las PAAF o de cilindros obtenidos en las BAG y si habían existido complicaciones inmediatas o no y cuáles.

En el caso de observarse neumotórax o hemoptisis franca en la sala de TC se comunicó telefónicamente la complicación al médico solicitante de la PTT. En el caso de observarse hemorragia perilesional, se comentó al paciente que podría presentar esputos hemoptoicos autolimitados. En el caso de neumotórax de cuantía importante y disnea el paciente fue valorado por el especialista en cirugía torácica para decidir la colocación o no de tubo de drenaje.

En todos los pacientes se recomendó reposo en decúbito lateral del lado de la punción y se realizó una radiografía de tórax en espiración forzada, 2-3 horas después del procedimiento, para descartar neumotórax tardío o evaluar la cuantía del neumotórax en los casos en los que se hubiese detectado ya en la sala de TC.

4.3 Variables consideradas

Se creó una base de datos con toda la información clínico-radiológica y anatomopatológica.

4.3.1 Variables clínico-radiológicas

A continuación, se mencionan las variables clínico-radiológicas recogidas más relevantes:

- Variables sociodemográficas: edad y sexo.
- Variables radiológicas: aspecto benigno o maligno por su morfología y localización de la lesión.
- Tipo de aguja de punción: calibre 25G ó 20G.
- Complicaciones derivadas del procedimiento: neumotórax, neumotórax que requirió colocación de tubo de drenaje, hemorragia perilesional, hemoptisis y parada cardiorrespiratoria.

4.3.2 Variables anatomopatológicas

A continuación, se mencionan las variables anatomopatológicas recogidas más relevantes:

- Tipo de muestra: PAAF o BAG.
- Resultado del procedimiento: muestra válida o no válida para diagnóstico, incluyéndose en este subgrupo las muestras con material o celularidad insuficiente, no representativas y sospechosas pero no concluyentes para descartar o confirmar malignidad, y todos los casos en los que se aconseja repetir la punción. Las muestras valorables se clasificaron inicialmente en dos subgrupos: ausencia de malignidad y lesión maligna.
 - Tipo histológico de lesiones malignas, tanto en las muestras citológicas (procedentes de PAAF) como tisulares (procedentes de BAG). Tras revisión, en las muestras con diagnóstico de cáncer de pulmón, la nomenclatura se adaptó a la última clasificación de tumores de pulmón de la OMS 2015.
- Porcentaje de celularidad tumoral presente en la muestra respecto al volumen total. Este dato se registró solamente en la serie de BAG.

- Número de marcadores (o determinaciones) realizados con la muestra de PAAF o de BAG mediante técnicas de inmunocitoquímica (ICQ), inmunohistoquímica (IHQ) o de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) con fines diagnósticos (por ejemplo, IHQ de AE1-AE3, TTF1, p63/p40, entre otros) y/o predictivos (por ejemplo, IHQ de pS6, ERCC1 o FISH de *EGFR*, *HER2*, entre otros). El número de marcadores, así como el tipo concreto de determinación, fue determinada por el patólogo (con fines diagnósticos) o por el oncólogo (con fines predictivos).
- Diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica en los pacientes con resección de la lesión posterior al diagnóstico mediante PTT-TC. Tras revisión, la nomenclatura se adaptó a la última clasificación de tumores de pulmón de la OMS 2015.
- Pacientes en los que se solicitó el estudio molecular de mutaciones de *EGFR* y reordenamientos de *ALK*.
- Resultados de los análisis moleculares de *EGFR* y *ALK*.

4.4 Estudio de dianas terapéuticas en los carcinomas de pulmón no de célula pequeña

En esta parte del trabajo se incluyeron todos aquellos pacientes diagnosticados de CPNCP no escamoso (AC, CPNCP-NOS o CCG) de ambas series, a los que se les había solicitado desde los respectivos servicios de Oncología Médica, el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* y de reordenamientos de *ALK*.

Antes del análisis molecular de *EGFR* y *ALK*, se realizó el control morfológico del material de partida (sobre una sección teñida con H&E del bloque de parafina o sobre las extensiones citológicas) por parte de un patólogo para asegurar que la muestra era óptima¹²⁸.

4.4.1 Estudio de las mutaciones de *EGFR*

La fase pre-analítica del estudio mutacional del gen *EGFR* difirió entre las dos series incluidas en el trabajo debido a que se partía de dos tipos de muestras diferentes: material tisular fijado en formaldehído al 10% e incluido en parafina en la serie de BAG y material citológico (frotis secos teñidos con Diff-Quick®, extensiones

directas fijadas en alcohol y teñidas con Papanicolaou, citología líquida o bloque celular) en la serie de PAAF.

En la serie de BAG, la extracción de ADN se realizó según protocolos previamente descritos¹²⁸. De cada uno de los tumores incluidos en esta serie, se realizaron, entre 1-20 cortes a 5-15µm según la metodología empleada. Los cortes fueron desparafinados con dos lavados de xilol y uno de etanol absoluto antes de proceder a su digestión con proteinasa K. La extracción de ADN se realizó, siguiendo las indicaciones del fabricante, con el kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen Manchester Ltd., Manchester, UK) de forma automatizada en el robot QIAcube (Qiagen). El volumen de elución se fijó en 50µl con el objetivo de asegurar una adecuada concentración de ADN para los estudios moleculares. Tras la extracción de ADN, se procedió a su cuantificación mediante medida de absorbancia en un espectrofotómetro NanoDrop. Los ratios A260/A280 y A260/A230 se registraron para verificar la pureza y la calidad de los ácidos nucleicos, respectivamente, considerándose los ratios A260/A280 ~ 1,8 y 260/A230 ~ 2 como valores de referencia para aceptar la muestra para su posterior análisis. El ADN extraído se conservó a -80°C. En la serie de PAAF, la extracción de ADN se realizó a partir del cytospin obtenido tras centrifugado de la citología líquida o del raspado directo de las extensiones teñidas con Diff-Quick® o Papanicolaou, utilizando el mismo kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen).

Las metodologías empleadas para realizar el estudio de mutaciones en el gen *EGFR* (exones 18-21) fueron:

a) en la serie de BAG, secuenciación directa del producto de PCR o PCR cuantitativa en tiempo real utilizando el kit Therascreen EGFR Mutation Test (Qiagen) o el kit cobas® EGFR Mutation Test (Roche Molecular Systems).

b) en la serie de PAAF, PCR cuantitativa en tiempo real con el kit Therascreen EGFR Mutation Test (Qiagen).

En relación a la secuenciación directa del producto de PCR, todas las reacciones de PCR se hicieron por duplicado y las reacciones de secuenciación se realizaron tanto en dirección directa como reversa según protocolos previamente descritos¹¹⁸. Los electroferogramas se analizaron de forma visual y cualquier alteración genética

identificada se confirmó por secuenciación de un producto de PCR independiente. En cuanto a la plataforma de PCR cuantitativa en tiempo real con el kit Therascreen EGFR Mutation Test (Qiagen), diseñada para la detección de 29 de las mutaciones más frecuentes en *EGFR*, la amplificación se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante en la plataforma ABI Prism 7300 (Applied Biosystems). El análisis de los resultados se basó en el cálculo de la diferencia de Cts, ΔCt , (del inglés, cycle threshold) entre el ensayo de la mutación correspondiente y el ensayo control, quedando definido el Ct como el ciclo de PCR a partir del cual se produce un incremento significativo de la señal de fluorescencia por encima del ruido de fondo. De esta manera, una muestra se clasificó como mutada o *wild-type* para una de las mutaciones cubiertas por el kit en función de si dicho valor ΔCt quedaba por debajo o por encima del punto de corte establecido en los parámetros analíticos del kit. Por otra parte, los análisis y la interpretación de los resultados utilizando el kit cobas[®] EGFR Mutation Test (Roche Molecular Systems), diseñado para detectar 41 mutaciones de *EGFR*, fueron completamente automatizados. A continuación se muestran ejemplos de las diferentes metodologías empleadas para el estudio mutacional de *EGFR* (Figuras 19 y 20).

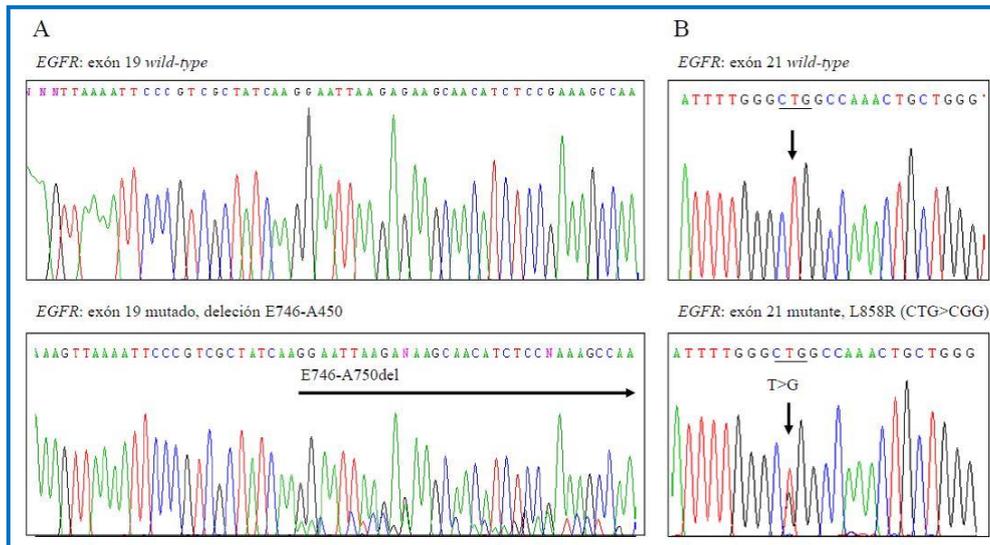


Figura 19. Análisis de mutaciones en el EGFR por secuenciación directa. Delección E746-A750 en el exón 19 (A), y mutación puntual L858R en el exón 21 (B). En ambos casos, en la parte superior se muestra el electroferograma correspondiente a la secuencia nativa o wild-type del exón y en la parte inferior se muestra el electroferograma correspondiente a la secuencia mutada. Obsérvese que la presencia de la mutación correspondiente se evidencia por la existencia de una doble secuencia y que en todos los casos el alelo wild-type predomina sobre el alelo mutado.

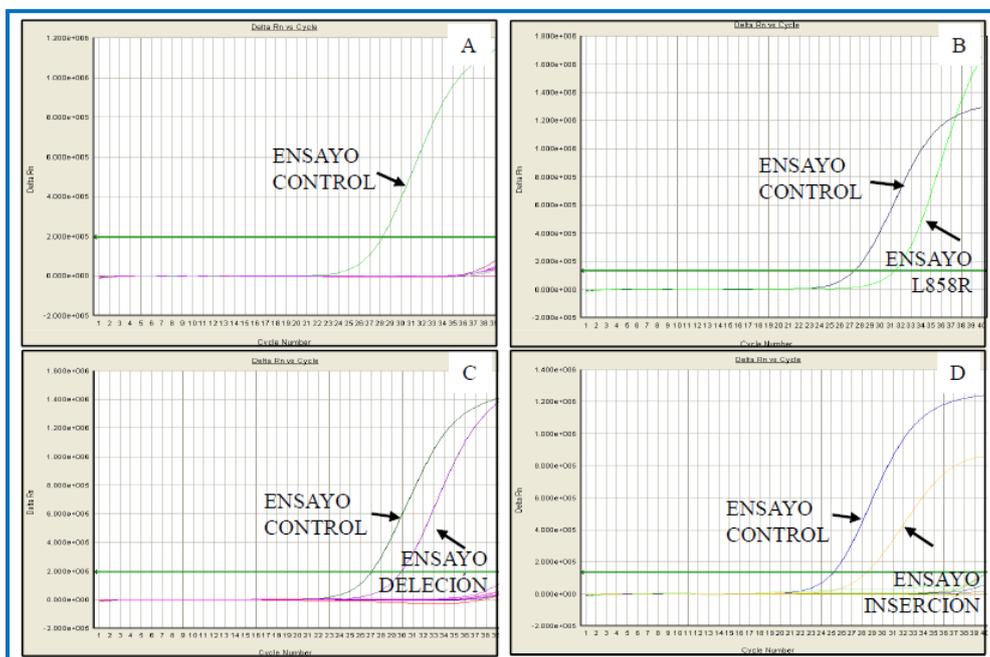


Figura 20. Análisis de mutaciones en el EGFR por el kit Therascreen EGFR Mutation Test. EGFR no mutado (A), mutación puntual L858R en el exón 21 (B), delección en el exón 19 (C), e inserción en el exón 20 (D). La mutación se evidencia por la presencia de amplificación en el ensayo de la mutación correspondiente además de la amplificación propia del ensayo control.

4.4.2 Estudio de los reordenamientos de ALK

El estudio de reordenamientos del gen *ALK* se llevó a cabo en secciones de 4 µm obtenidas a partir de los bloques de parafina de las BAG y de los bloques celulares obtenidos tras las PAAF. En ambas series, el análisis se realizó mediante FISH utilizando la sonda comercial Vysis® ALK Break-Apart FISH Probe Kit (Abbott Molecular, Inc. IL, USA), siguiendo protocolos previamente descritos^{125,129}. Se contó manualmente un mínimo de 50 núcleos tumorales. Se definió como: FISH *ALK* positivo, aquellos casos con más de 25 (50%) células tumorales con señal de separación (BA, del inglés *break-apart*) o con señal roja única (IRS, del inglés *isolated red signal*); FISH *ALK* negativo, casos con menos de 5 (10%) células tumorales con patrón BA o IRS; y FISH *ALK borderline*, muestras con entre 5-25 (10-50%) células positivas. En el caso de resultados *borderline*, se cuantificaron otras 50 células tumorales. Si el porcentaje de células positivas fue inferior al 15%, la muestra se consideró negativa. Si el porcentaje de células positivas fue mayor o igual al 15%, la muestra se consideró positiva (ver prospecto de Vysis® ALK Break Apart FISH Probe Kit, Cat. No. 06N38-020/30-608495/R2). En la serie de BAG, además de la interpretación manual, se llevó a cabo un análisis automatizado con el sistema BioView Duet scanning system (BioView, Rehovot, Israel)^{129,130}.

A continuación se muestran ejemplos de las diferentes metodologías empleadas para el estudio mutacional de *ALK* (Figura 21).

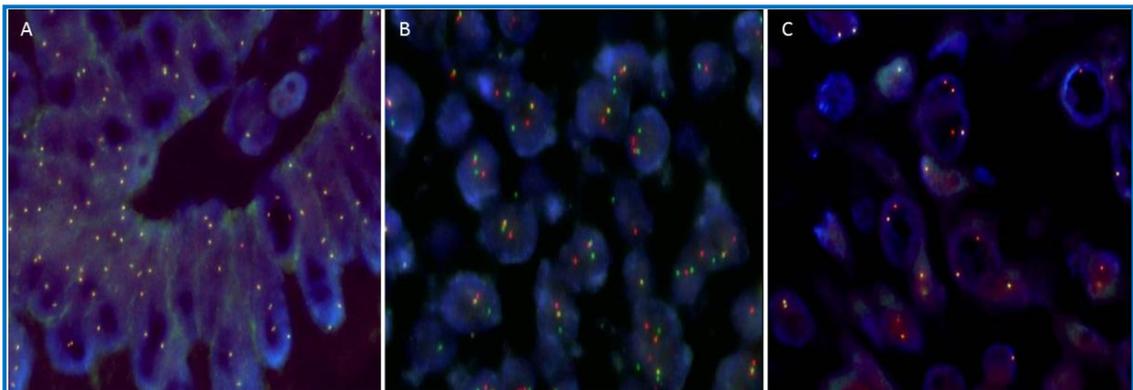


Figura 21. Estudio de la translocación de ALK mediante técnica de FISH utilizando la sonda comercial Vysis® ALK Break Apart (Abbott Molecular). Esta sonda de rotura es una sonda dual compuesta por un fragmento telomérico a ALK (extremo 3') marcado en rojo (SpectrumOrange) y un fragmento centromérico a ALK (extremo 5') marcado en verde (SpectrumGreen). Un caso se considera negativo cuando una señal roja y una verde están separadas por menos de dos veces el diámetro de una señal o están solapadas (señales de fusión) (A). Si las señales roja y verde están separadas por dos o más veces el diámetro de la señal se considera un caso positivo (patrón típico, de "rotura") (B). Así mismo, si se observan núcleos con una única señal roja, sin su correspondiente verde, junto con una señal de fusión, se considera también positivo (patrón atípico, de "señal roja única") (C).

4.5 Análisis estadístico

Todos los análisis a los que se hace referencia están descritos en Sokal & Rohlf, 1995¹³¹. Las diferencias en sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y eficiencia entre PAAF y BAG tanto para la detección de malignidad como de cáncer de pulmón se analizaron mediante análisis de contingencia, utilizando la corrección de Yates cuando el tamaño muestral fue pequeño (número de muestras asignadas a una categoría menor del 5%). Este test se utilizó también para comparar entre PAAF y BAG: (i) el rendimiento diagnóstico para la detección de cáncer de pulmón, (ii) la frecuencia de complicaciones, (iii) el rendimiento diagnóstico para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP no escamoso, (iv) la relación entre el número de marcadores de IHQ/ICQ y el porcentaje de muestras con material suficiente para estudios moleculares, y (v) la relación entre el porcentaje de celularidad y la obtención de resultados concluyentes en estudios moleculares. En todos estos análisis se empleó el paquete estadístico SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, EEUU).

Para el análisis del efecto de las características generales de la muestra (edad, sexo, localización de la lesión, tipo de lesión y tipo de procedimiento) en la frecuencia de complicaciones después de procedimiento de PAAF o BAG, se utilizaron modelos de regresión logística múltiple ya que la variable a predecir era categórica. Dicha regresión logística se expresó como la razón de verosimilitud para las clases dentro de cada variable predictora de las complicaciones. La razón de verosimilitud indica cuantas veces es más probable tener complicaciones con respecto a no tenerlas dependiendo de la clase a la que pertenezca la muestra dentro de una variable predictora. Por tanto, la razón de verosimilitud se podría expresar como: razón de verosimilitud para la clase i de la variable x = probabilidad de complicaciones/1-probabilidad de complicaciones. De este modo, una razón de verosimilitud de 1 indica que la probabilidad de complicaciones es igual tanto si se pertenece a la clase i de la variable x como si se pertenece a otra clase (por ejemplo, la clase j). Cuando la razón es mayor de 1 indica que la probabilidad de complicaciones es mayor si se pertenece a la clase i que si se pertenece a la clase j de la misma variable x . La razón de verosimilitud se calcula como e^{β} , siendo por tanto el coeficiente β el que determina el valor de dicha razón: cuanto mayor es el coeficiente β , mayor es la razón de verosimilitud. También se calculó la probabilidad de que dicha razón fuera significativamente mayor de 1. Este análisis se realizó considerando tanto todas las complicaciones en conjunto, independientemente del tipo de las mismas, como considerando cada tipo de complicación (neumotórax, neumotórax con tubo,

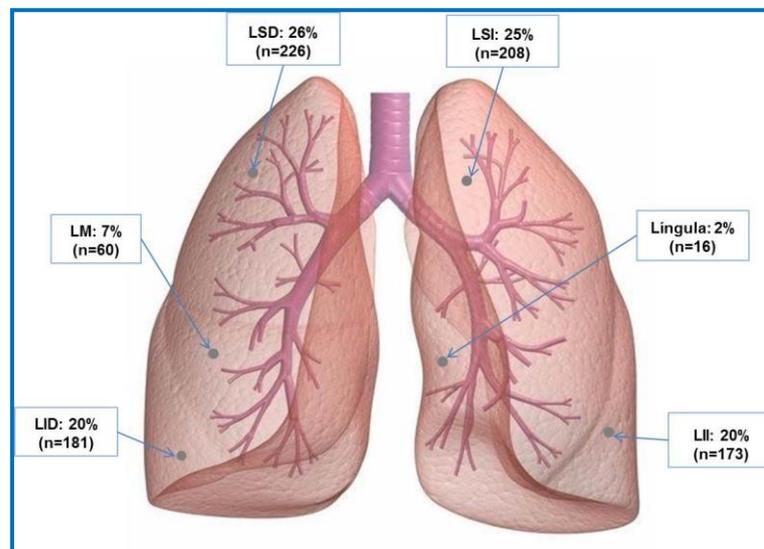
hemorragia perilesional y hemoptisis) por separado. Para estos análisis se empleó el paquete estadístico R (R Core Team 2014)¹³².

V. RESULTADOS

5.1 Características generales de la muestra

Se trata de un estudio retrospectivo observacional en el que se han incluido 864 muestras pequeñas de 795 pacientes en los que se realizó una PAAF con aguja de calibre 25G en el Hospital Universitario La Paz o una BAG con aguja de calibre 20G en el Hospital Universitario HM Sanchinarro, ambas guiadas por TC, de una lesión pulmonar sospechosa de malignidad. Del total de muestras, 617 se obtuvieron mediante PAAF y 247 eran BAG. De las 864 muestras, 576 eran de hombres y 288 de mujeres, con una media de edad de 64,87 años (66,12 en las PAAF y 63,63 en las BAG). En las PAAF, 423 fueron de varones (68,55%) y 194 fueron de mujeres (31,44%), mientras que en las BAG 153 fueron de varones (61,94%) y 94 de mujeres (38,05%).

La localización más frecuente de las lesiones fueron los lóbulos superiores: 434 (50%) muestras, de éstas 226 se localizaban en el lóbulo superior derecho (158 PAAF y 68 BAG) y 208 en el lóbulo superior izquierdo (143 PAAF y 65 BAG). La frecuencia de la distribución de las lesiones en las que se realizó PTT-TC se detalla en la Figura 22.



LSD: lóbulo superior derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo, LM: lóbulo medio, LID: lóbulo inferior derecho, LII: lóbulo inferior izquierdo.

Figura 22. Localización de las lesiones diagnosticadas mediante PTT-TC.

El 84,37% (729) de las muestras eran de lesiones que presentaban características sospechosas de malignidad por TC, 7,75% (67) de lesiones de aspecto radiológico indeterminado y 7,87% (68) de lesiones probablemente benignas según el radiólogo, siendo no obstante necesario descartar malignidad en el contexto clínico del paciente.

De las 864 muestras, 108 (12,5%) fueron no diagnósticas, es decir, no representativas o material insuficiente para diferenciar lesión benigna o maligna, de las cuales 18 eran BAG (7,28% del total de BAG) y 90 eran PAAF (14,58% del total de PAAF).

En 57 pacientes se realizó más de una PTT-TC. En concreto, en 41 se hicieron más de una PAAF y en 16 más de una BAG. En el caso de las PAAF generalmente se repitieron por material no representativo o insuficiente o bien por ser diagnosticadas de “sin evidencia de malignidad” y tener alta sospecha de malignidad. Las BAG que se repitieron, sin embargo, fue a menudo por requerirse material para estudios moleculares en pacientes con cáncer de pulmón ya diagnosticado.

De las 756 (87,5%) punciones diagnósticas, 577 (76,32%) fueron de lesiones malignas y 179 (23,67) sin evidencia de malignidad.

De las 577 punciones con resultado de malignidad, 495 (85,78%) se tipificaron como carcinoma de pulmón, 75 (12,99%) como metástasis, 5 (0,86%) como otros tumores malignos y en 2 casos (0,34%) no fue posible diferenciar carcinoma primario o metástasis.

De las 495 muestras con diagnóstico de carcinoma de pulmón en PAAF o BAG, la frecuencia de muestras de CPNCP fue del 92,92% (460/495).

El número de muestras de PAAF y BAG de los distintos tipos de lesiones malignas y subtipos histológicos de CP se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Diagnósticos de malignidad en muestras de PAAF y BAG			
Diagnóstico	PAAF	BAG	N
Adenocarcinoma	124	89	213
Carcinoma epidermoide	97	24	121
CPNCP-NOS	92	34	126
Neoplasias neuroendocrinas	26	9	35
Metástasis	59	16	75
Linfoma	0	4	4
Sarcoma	1	0	1
Carcinoma*	2	0	2

**Citología sugestiva de carcinoma sin poder diferenciar si se trata de tumor de origen pulmonar o de una metástasis de otro origen.*

De las 460 muestras con diagnóstico de CPNCP, 145 fueron confirmados como verdaderos positivos al comparar con el diagnóstico en la pieza de resección, es decir, que la frecuencia de diagnóstico de CPNCP en estadio operable en nuestra serie de PTT-TC es del 31,52%.

De las 756 muestras diagnósticas, se pudo comparar el diagnóstico con la pieza quirúrgica en 249 casos, 198 PAAF y 51 BAG. De las 495 muestras con diagnóstico de CP se comparó el diagnóstico con la pieza de resección en 168. Considerando el diagnóstico en pieza quirúrgica como el patrón oro, los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. PAAF y BAG con resultados positivos o negativos verdaderos o falsos según el diagnóstico en pieza quirúrgica					
PTT-TC	N	VP	VN	FP	FN
PAAF	198	154	20	5	19
BAG	51	34	5	0	12

Abreviaturas: N: número de muestras pequeñas diagnósticas con correlación con anatomía patológica de la pieza de resección, VP: verdaderos positivos, VN:

En 12 muestras de BAG sin evidencia de malignidad correspondientes a 9 pacientes no operados, se hizo el diagnóstico de CPNCP con anterioridad, siendo el objetivo de la nueva toma de muestra el realizar el estudio molecular de *EGFR* y/o *ALK*, pues el material de muestreo anterior fue insuficiente para dicho objetivo.

En 7 muestras de PAAF sin evidencia de malignidad correspondientes a 6 pacientes no operados, se confirmó malignidad en una segunda punción de la misma lesión.

La frecuencia de los diagnósticos en pieza quirúrgica, considerando el total de muestras con correlación con histología de la pieza de resección (n=289) se recogen en la tabla 9.

Diagnóstico histológico	N
Lesión benigna	43
Adenocarcinoma pulmonar	126
Carcinoma epidermoide pulmonar	51
CPNCP-NOS / CCG	10
Neoplasia neuroendocrina	20
Metástasis	34
Linfoma	3
Sarcoma	2

De las 108 punciones con diagnóstico no concluyente, en 40 se conoció el diagnóstico final tras cirugía: 13 fueron lesiones benignas (12 PAAF y 1 BAG), 23 cáncer de pulmón (18 PAAF y 5 BAG), 3 metástasis (PAAF) y 1 linfoma (PAAF).

De las 179 muestras sin evidencia de malignidad, 56 casos se compararon con el diagnóstico en pieza de resección y de éstas 25 fueron lesiones benignas y 31 fueron falsos negativos: 13 fueron AC de pulmón (7 PAAF y 6 BAG), 3 CE de pulmón (2 PAAF y 1 BAG), 1 CPNCP-NOS (PAAF), 2 neoplasias pulmonares neuroendocrinas (BAG), 10 metástasis (7 PAAF y 3 BAG) y 2 linfomas (PAAF).

De las 577 punciones con resultado de malignidad, se comparó el diagnóstico en muestra pequeña con la pieza de resección en 193 casos, de los cuales 5, todos en muestras de PAAF, fueron falsos positivos: 2 AC, 1 CE, 1 CPNCP-NOS y 1 metástasis. La concordancia entre los 188 verdaderos positivos (154 PAAF y 34 BAG) según los subtipos histológicos en muestra pequeña y pieza quirúrgica se detalla en la tabla 10.

Diagnóstico	PAAF	BAG	Dx C	PAAF con Dx NC	BAG con Dx NC
Lesión benigna	39	17	25	19	12
Adenocarcinoma pulmonar	49	26	67	6	2
Carcinoma epidermoide pulmonar	37	2	30	9	0
CPNCP-NOS / CCG	40	4	39	5	0
Neoplasia neuroendocrina	10	0	10	0	0
Metástasis	21	2	16	6	1
Sarcoma	1	0	1	0	0
Adenocarcinoma	1	0	1	0	0

Abreviaturas: Dx: diagnóstico, Dx C: diagnóstico concordante, Dx NC: diagnóstico no concordante.

Las lesiones clasificadas como malignas mal tipificadas en muestra pequeña fueron:

- 8 AC: 2 fueron CE, 2 eran metástasis de AC de otro origen y 2 lesiones benignas en muestras procedentes de PAAF. En muestras de BAG 1 era un CE y otro era un tumor neuroendocrino en la pieza de resección.

- 9 CE: 6 fueron AC, 1 tumor neuroendocrino, 1 metástasis de carcinoma epidermoide de otro origen en la pieza de resección y 1 lesión benigna, todas las muestras procedentes de PAAF.

- 5 CPNCP-NOS: 2 fueron tumores neuroendocrinos, 2 metástasis y 1 lesión benigna en la pieza de resección. Las 5 muestras eran de PAAF.

- 7 metástasis: 3 fueron AC de pulmón, 1 fue un CCG, 1 lesión benigna y otra un sarcoma en la pieza de resección, de las 6 muestras de PAAF. Una muestra de BAG con diagnóstico de metástasis fue un AC pulmonar primario en la pieza quirúrgica.

En el caso de los CPNCP-NOS en PAAF y BAG, 25 fueron AC en pieza quirúrgica, 8 CE y 6 CCG, es decir, 39 diagnósticos concordantes y 5 casos no fueron correctamente clasificados en la muestra pequeña, tal y como hemos detallado en el párrafo anterior. En un caso de PAAF, se hizo el diagnóstico de AC sin poder confirmar el origen de la tumoración, se operó y fue un AC primario pulmonar.

En el subgrupo de muestras de CP no operado (n=327), se solicitó estudio de biomarcadores predictivos *EGFR* y *ALK* desde los servicios de Oncología Médica o Neumología en 97 y 40 muestras respectivamente. La frecuencia de petición de estos dos estudios moleculares en las PAAF y en las BAG se detalla en la figura 23.

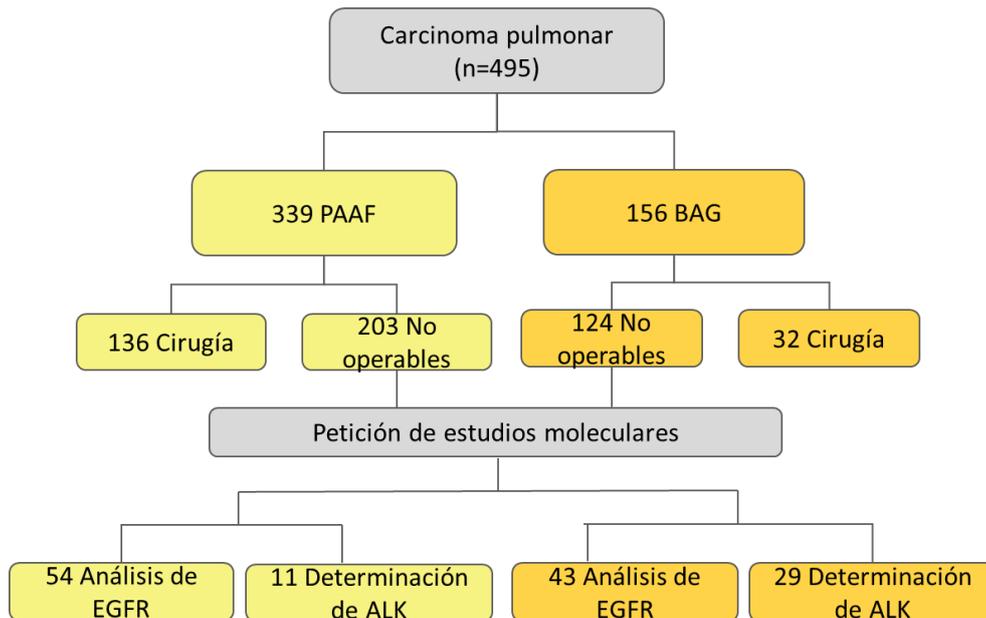


Figura 23. Frecuencia de solicitud de estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP no escamoso.

Los resultados de los estudios de *EGFR* y *ALK* solicitados se muestran en la figura 24.

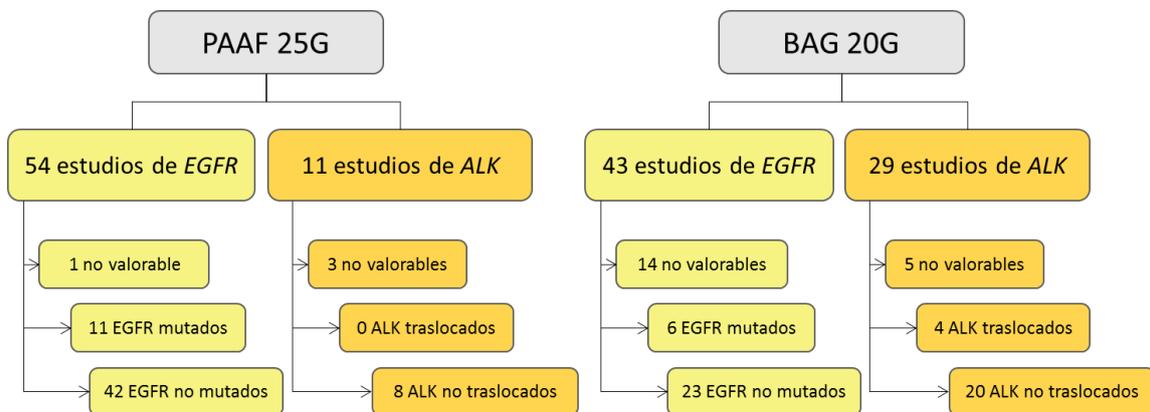


Figura 24. Resultados de los estudios moleculares de *EGFR* y *ALK* en muestras de PAAF y de BAG.

Según los datos moleculares, 17 muestras tenían CPNCP *EGFR* mutado (de las 82 en las que se obtuvo resultado concluyente del estudio de mutaciones de *EGFR*) y 4 presentaron translocación de *ALK* (de las 32 en las que se obtuvo resultado válido del estudio molecular de *ALK*), es decir, que la frecuencia de CPNCP *EGFR* mutado en nuestra serie fue del 20,48% y la frecuencia de CPNCP *ALK* translocado del 12,90%.

5.2 Resultados por objetivos específicos

5.2.1 Eficacia de los dos métodos de muestreo empleados: punción-aspiración con aguja fina (PAAF) y biopsia con aguja gruesa (BAG).

5.2.1.1- Conocer la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN), la eficiencia y la exactitud diagnóstica de ambas técnicas de muestreo para el diagnóstico citológico/histológico de malignidad en lesiones pulmonares sospechosas por su aspecto radiológico en TC, considerando el diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica el patrón oro.

Para este análisis se excluyeron las PTT-TC con diagnóstico “no concluyente” y aquellas punciones de lesiones en las que no se disponía de diagnóstico anatomopatológico en pieza de resección, por lo que el análisis se realizó con 249 muestras: 198 muestras de PAAF y 51 muestras de BAG. Con estas muestras, se analizó el número de casos en los que PAAF y BAG coincidían con el diagnóstico de “malignidad o ausencia de malignidad” en el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica (Tabla 11).

		Pieza quirúrgica	
		+	-
PAAF	+	154	5
	-	19	20
BAG	+	34	0
	-	12	5

Utilizando los datos de la Tabla 11, se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la PAAF y de la BAG para el diagnóstico de malignidad. La comparación de estos valores mediante análisis de contingencia indicó que la PAAF y la BAG presentaron el mismo VPP ($\chi^2 < 2,29$; $P > 0,130$). Aunque la BAG tendió a tener mayor especificidad y menor VPN que la PAAF, esta diferencia no fue significativa ($\chi^2 < 2,29$; $P > 0,130$). Por otro lado, la sensibilidad y la eficiencia de la PAAF fue significativamente mayor que la de la BAG ($\chi^2 > 4,27$; $P < 0,039$) (Tabla 12).

Para el cálculo de la exactitud diagnóstica de la PAAF y de la BAG se utilizaron los datos de la Tabla 10, incluida en la descripción de las características generales de la muestra. Se consideraron los diagnósticos concordantes en muestras de PAAF o de BAG y en la pieza quirúrgica, en las 198 PAAF y 51 BAG de pacientes posteriormente operados. La PAAF mostró mayor exactitud global, es decir, considerando los diagnósticos de lesiones benignas y malignas.

	S	E	VPP	VPN	Eficiencia	Exactitud
PAAF	0,89	0,80	0,97	0,51	0,88	0,77
BAG	0,74	1,00	1,00	0,29	0,76	0,70

Abreviaturas: S: Sensibilidad, E: Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

La BAG y la PAAF guiadas por TC tienen por tanto una eficacia alta para el diagnóstico de lesiones malignas, puesto que todos los parámetros medidos presentaron valores mayores al 74%. Ambas técnicas mostraron un VPP similar, con una tendencia de la BAG a ser más específica que la PAAF. Por el contrario, la sensibilidad, eficiencia y exactitud de la PAAF fue mayor que la de BAG.

5.2.1.2- Comparar la sensibilidad, la especificidad, el VPP, el VPN y la eficiencia de ambas técnicas de muestreo para el diagnóstico de carcinoma de pulmón en lesiones pulmonares sospechosas en TC, considerando el diagnóstico anatomopatológico de la pieza quirúrgica el patrón oro.

Para este análisis se consideraron las punciones con diagnóstico de “ausencia de malignidad o de carcinoma de pulmón” en las que se disponía de diagnóstico anatomopatológico en pieza quirúrgica y además las punciones de lesiones reseadas con diagnóstico de “carcinoma de pulmón o de benignidad” en la pieza de resección, por lo que el análisis se realizó con 207 muestras: 161 procedentes de PAAF y 46 procedentes de BAG. Con estas muestras se analizó el número de casos en los que la PAAF y la BAG coincidían con el diagnóstico de “carcinoma de pulmón o ausencia de malignidad” en el análisis anatomopatológico de la pieza quirúrgica (Tabla 13).

Tabla 13. Tabla de contingencia para el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante PAAF y BAG			
		Pieza quirúrgica	
		+	-
PAAF	+	129	2
	-	10	20
BAG	+	32	0
	-	9	5

Utilizando los datos de la Tabla 13, se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y eficiencia para PAAF y BAG. La comparación de estos valores mediante análisis de contingencia indicó que la PAAF y la BAG presentaron un VPP similar ($\chi^2 < 0,55$; $P > 0,457$). Además, la PAAF mostró una tendencia a tener mayor eficiencia y menor especificidad para el diagnóstico de carcinoma pulmonar que la BAG, aunque estas diferencias no fueron significativas ($\chi^2 < 0,55$; $P > 0,457$). Por otro lado, la sensibilidad y el VPP de la PAAF fue mayor que el de la BAG ($\chi^2 > 3,73$; $P < 0,050$) (Tabla 14).

Tabla 14. Valores de eficacia de los procedimientos de punción transtorácica para el diagnóstico de cáncer de pulmón					
	S	E	VPP	VPN	Eficiencia
PAAF	0,93	0,91	0,98	0,67	0,93
BAG	0,78	1,00	1,00	0,36	0,80

Abreviaturas: S: Sensibilidad, E: Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

Por tanto la BAG y la PAAF guiadas por TC tienen una eficacia alta para el diagnóstico de cáncer de pulmón, ya que todos los parámetros calculados, excepto el VPN, mostraron valores superiores al 78%. Ambas técnicas mostraron la misma especificidad, eficiencia y el mismo VPP pero la PAAF mostró mayor sensibilidad y VPN que la BAG.

5.2.1.3- Conocer el rendimiento diagnóstico de la PAAF y de la BAG guiadas por TC de lesiones pulmonares, es decir, la frecuencia de muestras concluyentes para diagnóstico.

La Figura 25 muestra la frecuencia de casos en los que se pudo realizar un diagnóstico citológico o histológico de “malignidad o ausencia de malignidad”, es decir, cáncer o no cáncer (concluyente), a partir de muestras obtenidas por PAAF y BAG respectivamente, y la frecuencia de casos en los que la muestra obtenida no permitió realizar un diagnóstico por material escasamente representativo (no concluyente), datos que hemos citado en anteriormente en el desglose de las características generales de la muestra.

El porcentaje de casos con resultados no concluyentes fue bajo con ambos métodos (<12,50%). Además, un análisis de contingencia indicó que el porcentaje de casos con resultado no concluyente fue significativamente mayor en las muestras obtenidas mediante PAAF (14,6%, 90/617) que en las muestras de BAG (7,3% 18/247) ($\chi^2=9,65$; $P=2\times 10^{-3}$).

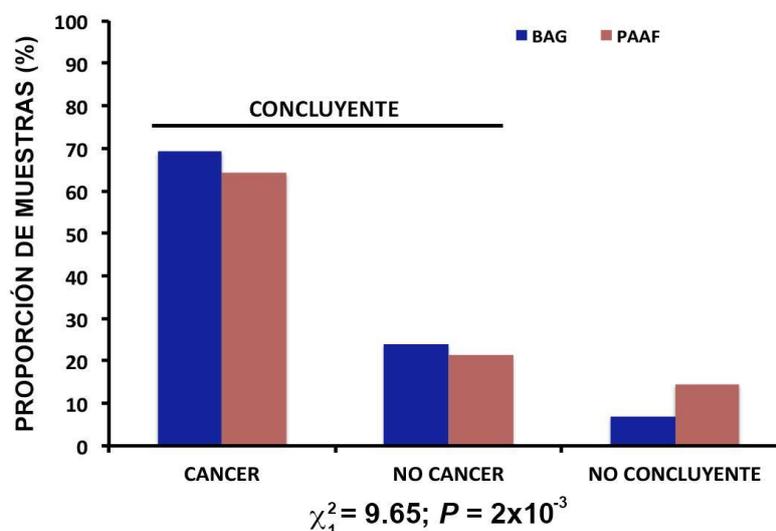


Figura 25. Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de pacientes en la que el resultado de PAAF y BAG fue concluyente (cáncer, no cáncer) y no concluyente. χ^2 indica el valor del estadístico chi-cuadrado con los grados de libertad en el subíndice. P indica el valor de probabilidad asociado al estadístico.

El rendimiento de la PTT-TC fue alto tanto en la BAG como en la PAAF ($\geq 85\%$), siendo mayor en la BAG (92,7%) que en la PAAF (85,4%).

5.2.2 Complicaciones derivadas de PAAF y BAG guiadas por TC

5.2.2.1- Evaluación del tipo y la frecuencia de complicaciones derivadas de la PAAF y de la BAG guiadas por TC.

La Figura 26 muestra la frecuencia de cada tipo de complicación en pacientes sometidos a los procedimientos PAAF o BAG. Un análisis de contingencia indicó que la frecuencia de complicaciones (cualquiera que sea su tipo) fue mayor cuando se realizó una BAG (52,2%, 129/247) que cuando se hizo una PAAF (14,1%, 87/617) ($\chi^2=133,73$; $P<1,0\times 10^{-5}$). En las PAAF, la complicación más frecuente fue el neumotórax ($\chi^2>45,23$; $P<1,0\times 10^{-5}$), mientras que en las BAG fue la hemorragia perilesional ($\chi^2>8,38$; $P<0,004$). Todos los tipos de complicaciones fueron más frecuentes en las BAG que en las PAAF ($\chi^2>3,82$; $P<0,050$), excepto el neumotórax con tubo que tendió a ser más frecuente en las BAG que en las PAAF aunque esta diferencia no fue significativa ($\chi^2=0,37$; $P=0,544$).

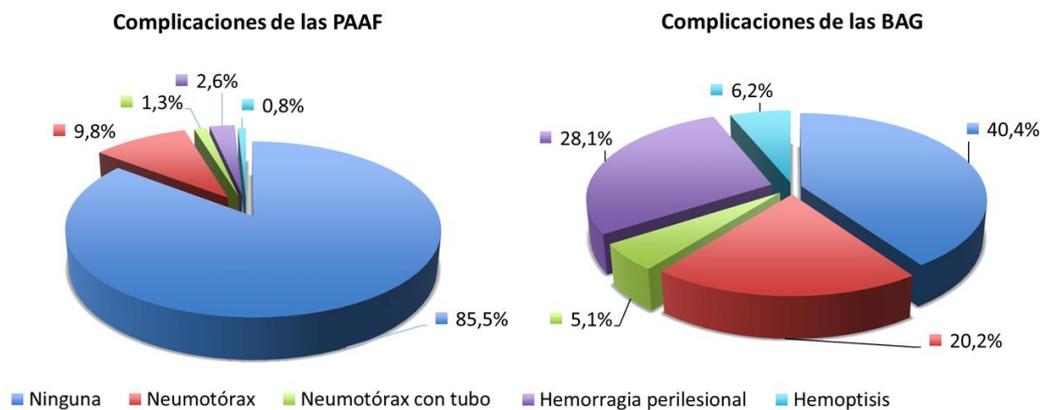


Figura 26. Proporción de complicaciones después de un procedimiento de PAAF y de BAG. Cada color indica los tipos de complicaciones más frecuentes y la ausencia de éstas.

5.2.2.2 Análisis de la posible asociación de los distintos tipos de complicaciones con características de la muestra y diagnóstico de benignidad o malignidad.

A continuación, se analizó si las características generales de la muestra (edad del paciente, sexo, localización de la lesión y diagnóstico cito/histológico) influyeron en la aparición de complicaciones derivadas de PAAF y BAG. La Tabla 15 muestra la

distribución de pacientes considerados para este análisis en cada característica del paciente

Tabla 15. Distribución de complicaciones en las categorías de cada característica del paciente usada como predictor de complicaciones de PAAF y BAG								
	PAAF				BAG			
	Neumo	Neumo + Hemor	Hemor	Hemop	Neumo	Neumo + Hemor	Hemor	Hemop
Edad								
≤65	28	2	5	2	21	8	18	8
>65	38	0	9	3	23	20	21	10
Sexo								
Varón	49	2	8	3	23	16	26	11
Mujer	15	0	6	2	21	12	13	9
Localización								
LSD	17	7	9	9	6	1	1	1
LM	4	0	4	1	6	3	5	2
LID	17	1	5	4	4	4	4	1
LSI	26	4	6	1	8	1	1	0
Língula	1	0	2	0	1	0	0	0
LII	11	7	12	3	8	3	4	1
Lesión								
Benigna	8	0	1	0	2	2	1	0
Maligna	20	2	7	2	10	11	12	2
No concluyente	38	0	6	3	32	15	26	16

Abreviaturas: Neumo: neumotórax, Neumo + Hemor: neumotórax + hemorragia perilesional, Hemor: hemorragia perilesional, Hemop: hemoptisis. LSD: lóbulo superior derecho, LM: lóbulo medio; LID: lóbulo inferior derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo, LII: lóbulo inferior izquierdo.

El análisis de asociación entre complicaciones y características del paciente se realizó mediante análisis de regresión logística múltiple, en el cual se utilizaron cuatro características de la muestra (edad del paciente, sexo, localización de la lesión y diagnóstico cito/histológico), y el tipo de procedimiento (PAAF o BAG) como predictores y la frecuencia de complicaciones (cualquiera que fuera su tipo) como variable a predecir (Tabla 16). Este análisis permitió calcular la razón odds, que indica cuantas veces es más probable tener complicaciones en función de la presencia/ausencia de cada predictor.

El mismo análisis se realizó para cada uno de los diferentes tipos de complicaciones según la clasificación de la Figura 26. Los resultados se resumen en las Tablas 17 y 18.

Tabla 16. Parámetros de los modelos obtenidos para predecir el riesgo de sufrir complicaciones usando como predictores sexo, edad, malignidad de la lesión y localización			
	Complicaciones		
	Coefficiente β	Razón de Odds	<i>P</i>
Edad			
≤65			
>65	0,009	1,009	0,226
Sexo			
Varón			
Mujer	-0,023	0,977	0,902
Localización			
LSD			
LM	-0,071	0,931	0,849
LID	0,083	1,086	0,747
LSI	0,113	1,12	0,642
Língula	-1,264	0,282	0,263
LII	0,192	1,212	0,455
Lesión			
Benigna			
Maligna	0,521	1,684	0,009
Procedimiento			
PAAF			
BAG	2,04	7,693	<10 ⁻⁴
<i>Abreviaturas: LSD: lóbulo superior derecho, LM: lóbulo medio; LID: lóbulo inferior derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo, LII: lóbulo inferior izquierdo.</i>			

Los resultados de la Tabla 16 indicaron que tener una lesión maligna aumenta 1,7 veces la probabilidad de sufrir complicaciones de cualquier tipo ($P=0.009$). Además, el procedimiento BAG aumenta 7,7 veces la probabilidad de sufrir complicaciones en comparación con el procedimiento PAAF ($P<1 \times 10^{-4}$).

Tabla 17. Parámetros de los modelos obtenidos para predecir el riesgo de sufrir neumotórax y neumotórax con tubo usando como predictores las variables: sexo, edad, malignidad de la lesión y localización						
	Neumotórax			Neumotórax con tubo		
	Coefficiente β	Razón de Odds	<i>P</i>	Coefficiente β	Razón de Odds	<i>P</i>
Edad						
≤ 65						
> 65	0,006	1,006	0,491	0,002	1,002	0,924
Sexo						
Varón						
Mujer	-0,109	0,897	0,622	0,113	1,12	0,802
Localización						
LSD						
LM	0,376	1,457	0,361	-16,11	0	0,99
LID	-0,06	0,942	0,85	-0,297	0,743	0,647
LSI	0,124	1,132	0,669	-0,101	0,904	0,861
Língula	-0,535	0,586	0,619	-15,94	0	0,995
LII	0,363	1,438	0,219	0,204	1,227	0,725
Lesión						
Benigna						
Maligna	0,424	1,528	0,065	-0,362	0,697	0,531
Procedimiento						
PAAF						
BAG	1,154	3,172	$<10^{-4}$	1,696	5,452	$<10^{-4}$

Abreviaturas: LSD: lóbulo superior derecho, LM: lóbulo medio; LID: lóbulo inferior derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo, LII: lóbulo inferior izquierdo.

Tabla 18. Parámetros de los modelos obtenidos para predecir el riesgo de sufrir hemorragia perilesional y hemoptisis usando como predictores las variables: sexo, edad, malignidad de la lesión y localización						
	Hemorragia perilesional			Hemoptisis		
	Coefficiente β	Razón de Odds	<i>P</i>	Coefficiente β	Razón de Odds	<i>P</i>
Edad						
≤65						
>65	0,019	1,019	0,11	0,021	1,022	0,301
Sexo						
Varón						
Mujer	0,209	1,232	0,42	0,245	1,277	0,588
Localización						
LSD						
LM	-0,493	0,611	0,381	-0,075	0,927	0,928
LID	0,242	1,273	0,493	0,052	1,053	0,93
LSI	-0,037	0,964	0,912	-0,129	0,879	0,824
Língula	-14,973	0	0,986	-15,005	0	0,995
LII	-0,289	0,749	0,443	-0,975	0,377	0,235
Lesión						
Benigna						
Maligna	0,953	2,594	0,001	-0,342	0,71	0,55
Procedimiento						
PAAF						
BAG	3,175	23,934	<10 ⁻⁴	2,205	9,071	<10 ⁻⁴

Abreviaturas: LSD: lóbulo superior derecho, LM: lóbulo medio; LID: lóbulo inferior derecho, LSI: lóbulo superior izquierdo, LII: lóbulo inferior izquierdo

Los resultados que se resumen en las Tablas 17 y 18 indicaron que el tipo de procedimiento BAG aumenta 3 veces la probabilidad de sufrir neumotórax en comparación al procedimiento PAAF ($P < 1 \times 10^{-4}$). Además, el tipo de procedimiento BAG aumenta 5,5 veces la probabilidad de sufrir neumotórax con tubo en comparación al procedimiento PAAF ($P < 1 \times 10^{-4}$). Por otro lado, tener una lesión maligna aumenta 2.5 veces la probabilidad de sufrir hemorragia perilesional en comparación a tener una lesión benigna ($P < 1 \times 10^{-4}$). El tipo de procedimiento BAG aumenta 24 veces la probabilidad de sufrir hemorragia perilesional en comparación al procedimiento PAAF ($P < 1 \times 10^{-4}$). Finalmente, el tipo de procedimiento BAG aumenta 9 veces la probabilidad de sufrir hemoptisis en comparación al procedimiento PAAF ($P < 1 \times 10^{-4}$).

Por tanto la BAG dio lugar a complicaciones con mucha mayor frecuencia que la PAAF (54% y 14% respectivamente). Realizar una BAG en lugar de una PAAF aumentó la probabilidad de producir neumotórax que requirió drenaje (hasta en 5,5 veces) y especialmente aumentó la probabilidad de sangrado, tanto de hemorragia perilesional como de hemoptisis (hasta 24 y 9 veces, respectivamente). Tener lesión maligna sólo aumentó la probabilidad de sufrir hemorragia perilesional (2,5 veces).

5.2.3- Relación de aspectos metodológicos con el rendimiento de ambos tipos de muestreo para el estudio molecular de *EGFR* y *ALK* en los carcinomas no de célula pequeña de pulmón.

5.2.3.1- Determinar el rendimiento de la PAAF y de la BAG para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP no escamoso: mutaciones de *EGFR* y reordenamientos de *ALK*.

Para este análisis se seleccionaron aquellas muestras con diagnóstico de “carcinoma de pulmón” (156 BAG y 339 PAAF) que tuvieran solicitado estudio molecular de *EGFR* y/o *ALK* (50 con procedimiento BAG y 57 con procedimiento PAAF). Utilizando estos datos, se comparó la frecuencia de resultados de *EGFR* y *ALK* concluyentes en las muestras obtenidas mediante BAG y mediante PAAF. La distribución de muestras en cada categoría analizada se muestra en la Figura 27.

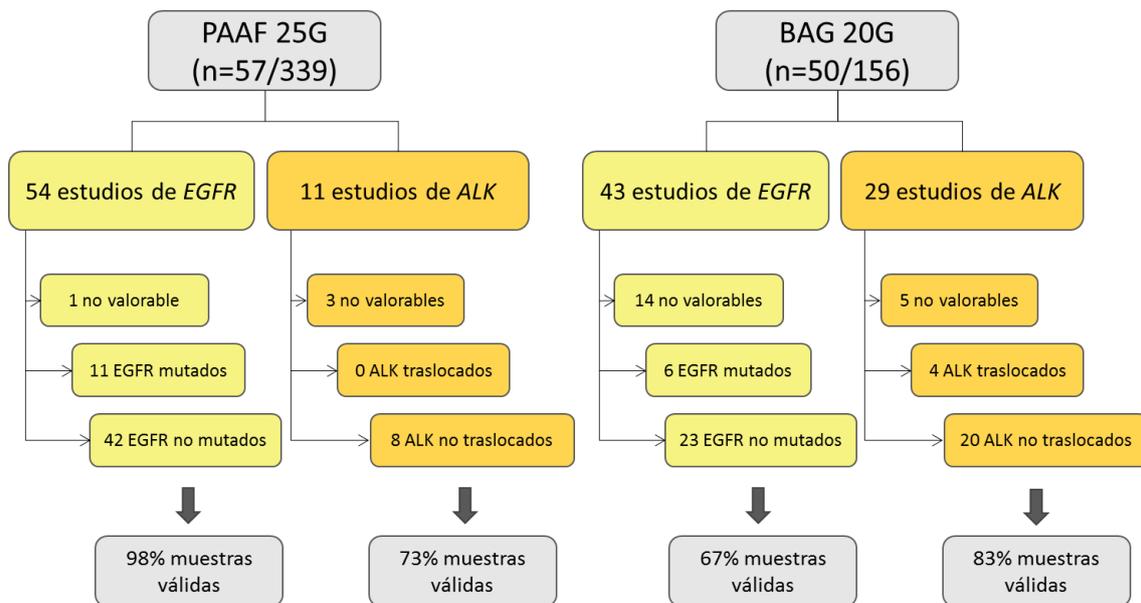


Figura 27. Distribución de muestras en las categorías analizadas para el rendimiento diagnóstico de *EGFR* y *ALK* en PAAF y en BAG, en 57 citologías y 50 muestras histológicas con diagnóstico de CPNCP no escamoso.

La Figura 28 muestra la frecuencia de casos en los que se pudo realizar un análisis de *EGFR* a partir de las muestras obtenidas por PAAF y BAG (valorable), y la frecuencia de casos en los que la muestra obtenida no permitió realizar dicho análisis (no valorable). Un análisis de contingencia indicó que el porcentaje de casos con resultado

EGFR no valorable fue significativamente mayor en las muestras obtenidas mediante BAG (32,6%, 14/43) que en las obtenidas por PAAF (1,9%, 1/54) ($\chi^2=17,27$; $P<1\times 10^{-3}$).

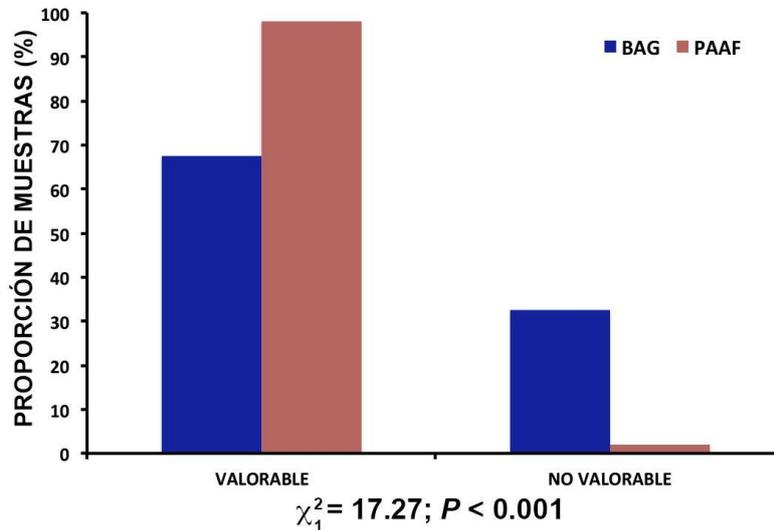


Figura 28. Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de muestras en la que el estudio de *EGFR* a partir de PAAF y BAG fue valorable y no valorable. χ^2 indica el valor del estadístico chi-cuadrado con los grados de libertad en el subíndice. P indica el valor de probabilidad asociado al estadístico.

La Figura 29 muestra la frecuencia de casos en los que se pudo realizar un análisis de *ALK* a partir de las muestras obtenidas por PAAF y BAG (valorable), y la frecuencia de casos en los que la muestra obtenida no permitió realizar dicho análisis (no valorable). Un análisis de contingencia indicó que no había diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de casos con resultado no valorable en las muestras obtenidas mediante PAAF (27,3%, 3/11) y mediante BAG (17,2%, 5/29) ($\chi^2=0,50$; $P=0,479$), aunque el porcentaje de casos no valorables fue mayor en las PAAF que en las BAG.

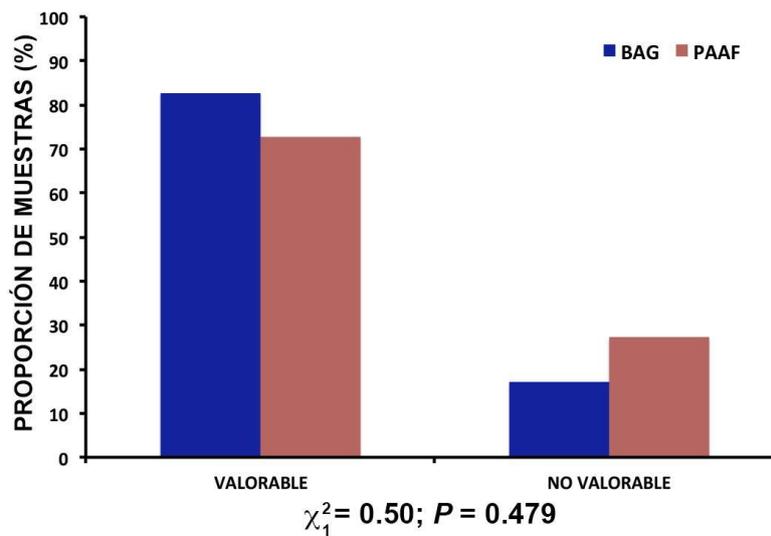


Figura 29. Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de muestras en la que el resultado del estudio de *ALK* a partir de PAAF y BAG fue valorable y no valorable. χ^2 indica el valor del estadístico chi-cuadrado con los grados de libertad en el subíndice. P indica el valor de probabilidad asociado al estadístico.

La técnica de muestreo no parece influir por tanto en el rendimiento de las muestras para el estudio de reordenamientos de *ALK*. Sin embargo, el rendimiento del material procedente de PTT-TC para el estudio de las mutaciones del *EGFR* fue mayor cuando se realizó PAAF que cuando se hizo BAG ($P < 1 \times 10^{-3}$).

5.2.3.2- Estudiar la relación entre el número de marcadores diagnósticos/predictivos empleados y el porcentaje de muestras con material insuficiente para el posterior estudio molecular de mutaciones de *EGFR* y reordenamientos de *ALK*.

Para este análisis se usaron las muestras de las que se disponía de datos moleculares y de marcadores diagnósticos/predictivos empleados previos al análisis molecular ($n=107$, 57 PAAF y 50 BAG, realizándose 72 peticiones de estudios moleculares en muestras de BAG y 65 en muestras de PAAF). Utilizando los datos de estos pacientes, se comparó la frecuencia de pacientes en los que se pudo realizar el estudio molecular en función del número de marcadores. La distribución de muestras en cada categoría analizada se muestra en la Figura 30.



Figura 30. Distribución de muestras en las categorías analizadas para el rendimiento de los estudios moleculares en función del número de marcadores empleados.

Para el análisis se comparó la frecuencia de muestras válidas para el estudio molecular de *EGFR* y/o *ALK* en función de si se hizo análisis de 2 o menos marcadores frente a si se hicieron tres o más marcadores. La Figura 31 representa la frecuencia de muestras no válidas para el estudio molecular en función del número de marcadores utilizados. En las muestras de BAG, el porcentaje de muestras válidas para el estudio molecular fue mayor cuando se usaron dos marcadores o menos que cuando se usaron tres o más marcadores (81% vs. 47%, $\chi^2=7,31$; $P=0,007$). Sin embargo, en las PAAF el porcentaje de muestras válidas no dependió del número de marcadores (90% vs. 100%, $\chi^2=1,17$; $P=0,107$).

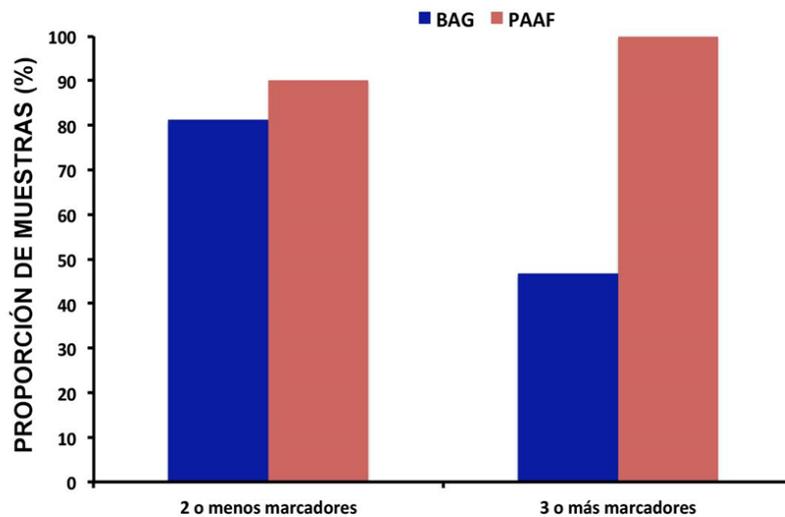


Figura 31. Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de PAAF y BAG con muestras válidas para estudio molecular en función del número de marcadores utilizados. χ^2 indica el valor del estadístico chi-cuadrado con los grados de libertad en el subíndice. P indica el valor de probabilidad asociado al estadístico.

Por tanto, el número de marcadores diagnósticos/predictivos influyó en el porcentaje de muestras válidas para el estudio de mutaciones de *EGFR* y reordenamientos de *ALK* en las muestras de BAG pero no en las de PAAF.

5.2.3.3- Analizar la relación entre el porcentaje de celularidad tumoral en las muestras obtenidas mediante BAG y la obtención de muestras válidas para estudios moleculares en CPNCP no escamoso.

Para este análisis se consideraron las 50 muestras de BAG en las que se solicitó estudio molecular de *EGFR* y/o *ALK*. En estos 50 casos se conocía el porcentaje de celularidad tumoral en la muestra inicial. Se comparó la frecuencia de pacientes en los que se pudo realizar el estudio molecular en función del porcentaje de celularidad tumoral. La distribución de muestras en cada categoría analizada se muestra en la Figura 32.

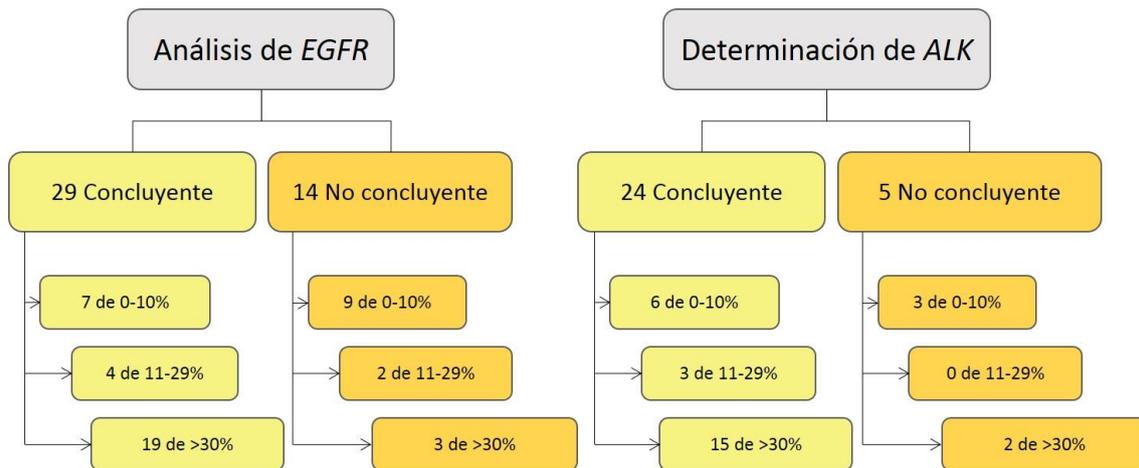


Figura 32. Distribución de muestras de BAG en las categorías de estudio de *EGFR* y *ALK* en función del porcentaje de celularidad tumoral en las muestras de BAG.

La Figura 33 muestra la frecuencia de muestras en las que se pudo realizar el estudio molecular en función del porcentaje de celularidad tumoral. Para analizar si existían diferencias significativas en dicha frecuencia las muestras se subdividieron en tres categorías atendiendo a los valores del porcentaje de celularidad tumoral: 0-10%, 11-29% y >30%.

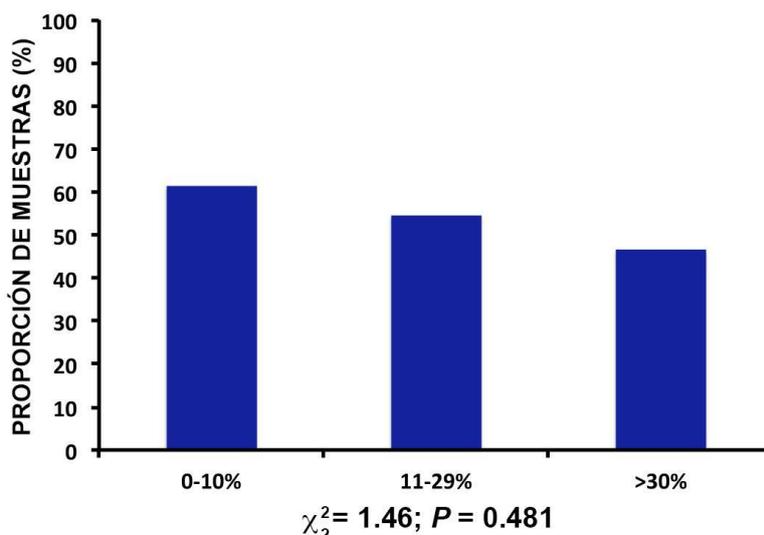


Figura 33. Comparación mediante análisis de contingencia de la proporción de muestras de BAG en las que se solicitó estudio de *EGFR* y/o *ALK* en función del porcentaje de celularidad tumoral de la muestra de BAG. χ^2 indica el valor del estadístico chi-cuadrado con los grados de libertad en el subíndice. P indica el valor de probabilidad asociado al estadístico.

Un análisis de contingencia indicó que el porcentaje de celularidad tumoral no afectó significativamente en la frecuencia de muestras en las que se solicitaron estudios de *EGFR* y/o *ALK* ($\chi^2=1,46; P=0,481$).

A continuación se analizó mediante análisis de contingencia si, en aquellas muestras en las que se habían solicitado estudios moleculares, el porcentaje de celularidad tumoral influía en la obtención de resultados. Dicho análisis se realizó por separado para aquellas muestras en las cuales se hizo estudio de mutaciones de *EGFR* (n=43) y para los que se hizo la determinación de *ALK* (n=29). En las muestras en los que se realizó el estudio de *EGFR*, el porcentaje de muestras válidas aumentó a medida que lo hacía el porcentaje de celularidad tumoral ($\chi^2=7,76; P=0,020$) (Figura 34A). Sin embargo, en las muestras en los que se realizó el estudio de *ALK*, el porcentaje de muestras válidas no se vio influenciado por el porcentaje de celularidad tumoral ($\chi^2=2,62; P=0,270$) (Figura 34B). Cuando se compararon los porcentajes de muestras válidas para los estudios *EGFR* y *ALK* en función de la celularidad tumoral, se observó que dicho porcentaje tendió a ser mayor en estudios de *ALK* que en análisis de *EGFR* cuando la celularidad tumoral fue de entre 0 y 20%. Sin embargo, las diferencias entre estos porcentajes no fueron estadísticamente significativas ($\chi^2<1,29; P>0,257$) debido a que la potencia del análisis se vio limitada por el bajo número de muestras en cada

categoría. Sólo se obtuvieron porcentajes similares de muestras válidas para ambos estudios moleculares cuando la celularidad tumoral fue mayor del 30% ($\chi^2 < 0,05$; $P > 0,819$).

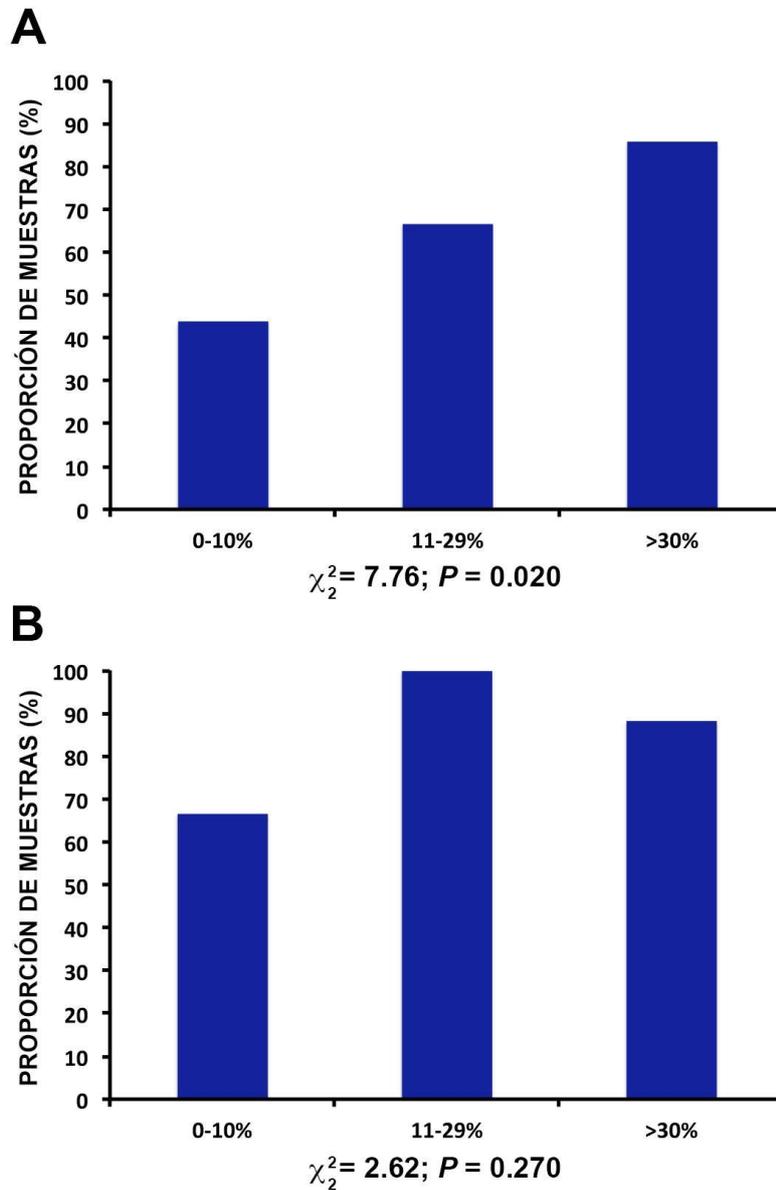


Figura 34. Comparación de la frecuencia de muestras válidas para estudios de *EGFR* (A) y/o de *ALK* (B) en función del porcentaje de celularidad tumoral de la muestra de BAG. χ^2 indica el valor del estadístico chi-cuadrado con los grados de libertad en el subíndice. P indica el valor de probabilidad asociado al estadístico

Un mayor porcentaje de celularidad tumoral en las muestras de BAG favoreció la obtención de resultados en el estudio mutacional de *EGFR* pero no influyó en el rendimiento de las muestras para la determinación de *ALK*. Cualquier porcentaje de celularidad tumoral permitió la obtención de resultados concluyentes en el estudio de *ALK* en al menos el 70% de los casos, mientras que en el estudio de *EGFR* se necesitó un porcentaje de celularidad tumoral mayor al 30% para obtener resultados concluyentes en más del 70% de los pacientes.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Discusión del método

Consideramos que algunos aspectos metodológicos de nuestro estudio requieren un comentario específico.

6.1.1 Calibre de la aguja en el diagnóstico del CP mediante punción guiada por TC y otros factores relacionados con la rentabilidad del procedimiento.

Como hemos mencionado en la introducción, la PTT-TC es la técnica de elección para el muestreo y diagnóstico histológico de lesiones pulmonares periféricas^{133,134}. Sin embargo, el calibre de la aguja a emplear para lograr la mayor eficacia es un tema continuamente debatido en la literatura. Es incluso controvertida la definición de aguja fina y aguja gruesa, pues encontramos publicaciones en las que consideran PAAF punciones realizadas con agujas del calibre 20G, e incluso de 18G^{135,136,137,138} con las que se obtienen cilindros histológicos. En general, la terminología más aceptada emplea el término PAAF o FNAB (del inglés, *fine needle aspiration biopsy*) para obtención de muestras con agujas del calibre $\leq 22G$ ^{139,140} y el término BAG o CNB (del inglés, *core needle biopsy*) para agujas de calibre $\geq 20G$ ^{139,135,141,142,143}. Por lo tanto, probablemente sea más correcto considerar para la comparación de la eficacia de las PTT-TC en lugar de aguja fina o gruesa, muestras citológicas frente a muestras tisulares.

En el trabajo realizado cuya metodología ya hemos detallado anteriormente, todas las PAAF se hicieron con aguja del calibre 25G y extensiones citológicas, incorporando en la mayor parte de los casos citología líquida. Las BAG se realizaron con aguja coaxial del calibre 20G, obteniéndose cilindros para estudio histológico. En relación a la metodología de procesado de las muestras pequeñas, hay que tener en cuenta que el material obtenido con aguja de 22G, considerada mayoritariamente aguja fina, puede procesarse como bloque celular en los centros en los que se dispone de los medios necesarios¹³⁸.

Sin embargo, la rentabilidad de la muestra pequeña en las PTT-TC, ya sea citología o muestra histológica, es muy variable. La calidad y cantidad de material depende de múltiples factores, como el tamaño de la lesión, la distancia a la pleura y cambios necróticos o fibrosis en la lesión entre otros⁸⁴. El diámetro del nódulo parece ser un factor decisivo en el rendimiento y exactitud diagnóstica de las punciones^{135,144,145,146}. Un diámetro $\leq 15-10mm$ se considera el principal factor asociado a un mayor número de FN^{147,148}. Algunos autores observaron que la PAAF es mejor para lesiones pequeñas y

la BAG ofrece mejores resultados en el diagnóstico de lesiones de mayor tamaño¹³⁵. En cualquier caso, la experiencia del radiólogo en intervencionismo y la colaboración del paciente serán factores determinantes del éxito del procedimiento. En nuestro estudio, las PAAF fueron realizadas por un residente de radiología en el caso de punciones fáciles, pero siempre bajo la supervisión de un radiólogo experto, el cuál realizó directamente las punciones con cierto grado de dificultad o con mayor riesgo de complicaciones. En cambio las BAG fueron todas realizadas por una misma radióloga con más de 10 años de experiencia.

Por otro lado, es determinante en el rendimiento de la PAAF la presencia del citopatólogo *in situ* para evaluar calidad del material y en caso de muestra insuficiente o no representativa realizar otro pase de punción^{149,150}. Hay que considerar que esta posibilidad no siempre existe, pues en determinados centros no se dispone de citopatólogos para colaborar durante el procedimiento. En cualquier caso, la evaluación inmediata de la muestra no es factible cuando se obtienen cilindros histológicos, en los que puede existir escasa celularidad tumoral y esto no se confirma hasta que no se completa el procesado y análisis de los bloques de parafina. En estudios que comparan la eficacia de PAAF y BAG en el diagnóstico de malignidad, afirman que las PAAF sin citopatólogo *in situ* tienen una mayor frecuencia de FN que las BAG¹⁵¹.

También es discutido en la literatura si aguja fina o aguja gruesa pueden ser mejores en el diagnóstico de lesiones benignas o malignas. Así, Staroselsky y colaboradores que analizaron una serie de 220 pacientes a los que realizaron PAAF y BAG guiadas por TC de la misma lesión pulmonar, observaron que la BAG sumada a la PAAF no ofrece un mejor rendimiento para el diagnóstico de malignidad, pero sí en lesiones benignas¹⁵².

Es de interés señalar en relación a la eficacia de la PTT-TC en pacientes EPOC, que Sangha y colaboradores, que analizaron el rendimiento diagnóstico con agujas de 22G y de 20G, observaron que a mayor grado de enfisema, mejor rendimiento empleando la aguja de menor calibre¹⁴⁶.

Por lo tanto, el procedimiento de elección, PAAF o BAG dependerá de múltiples factores: características de la lesión, factores de riesgo para la aparición de complicaciones, posibilidad de evaluación de la citología *in situ*, grado de sospecha de malignidad, experiencia del radiólogo y por supuesto preferencias de los patólogos de cada centro.

6.1.2 La necesidad de técnicas de inmunocito/histoquímica para la subclasificación del CP.

El desarrollo de dianas terapéuticas en el CPNCP no escamoso ha supuesto una mejora de la supervivencia de los enfermos con enfermedad diseminada al diagnóstico. Sin embargo, para indicar estos tratamientos específicos es necesario realizar una adecuada diferenciación del CPNCP subtipo AC o CE en muestras pequeñas. Travis y Rekhtman comentan en una revisión del 2011 que hasta un 22% de los CPNCP se clasificaban como CPNCP-NOS en muestras pequeñas. Sin embargo, este porcentaje se reduce con el empleo de IHQ a sólo el 3%. Además la subclasificación del CPNCP utilizando marcadores diagnósticos permite una mayor precisión o exactitud diagnóstica y estos diagnósticos son más reproducibles que los morfológicos¹⁵³.

Numerosos grupos de trabajo proponen cuál puede ser el panel de anticuerpos más adecuado para diferenciar entre AC y CE cuando los criterios morfológicos son insuficientes. Como ya hemos comentado en la introducción de este trabajo, los marcadores más utilizados son: TTF1 y napsin A como marcadores de AC y p63, p40 (isoforma Δ Np63) y CK5/6 como marcadores escamosos^{99,100,101}. Con esta combinación de anticuerpos se consigue clasificar más del 90% de las biopsias pequeñas y citologías de CPNCP, evitándose el diagnóstico de CPNCP-NOS⁹⁸. Se han propuesto paneles de IHQ aún más reducidos, como la combinación de Δ Np63, CK5/6, TTF-1 y napsin A, o solamente napsin A, TTF-1 y p63 para reducir el porcentaje de CPNCP-NOS cuando se ha muestreado un área escasamente diferenciada^{154,155,156}. Incluso realizando únicamente dos: TTF-1 y p63, ya se observa una reducción de la frecuencia de CPNCP-NOS¹⁵⁷.

Da Cuhna Santos y colaboradores, revisaron una serie de 602 PAAF y describen que las muestras en las que se realizó ICQ diagnóstica (n=157) el promedio de marcadores empleados fue de 3 (los más frecuentes TTF-1, CK7, queratina de alto peso molecular y p63) y que el número de anticuerpos no influyó en la correcta subclasificación de AC y CE, considerando el patrón oro la pieza quirúrgica¹⁵⁸.

La reducción del número de marcadores diagnósticos es fundamental en las muestras pequeñas, puesto que es imprescindible realizar los estudios moleculares de *EGFR* y *ALK* en el CPNCP no escamoso para la selección de candidatos a tratamientos personalizados. Travis y colaboradores subrayan la necesidad de preservar siempre la mayor cantidad de muestra posible para estos estudios y comentan que la mayoría de los CPNCP se pueden subclasificar empleando un único

marcador de AC (TTF-1 o mucina) y un solo marcador escamoso (p40 o p63)⁴. En muestras con escasas características morfológicas para diferenciar CE y AC en nuestra serie de PTT-TC, se intentó reducir al máximo el número de marcadores empleados, no obstante en el 20,8% (15/72) de las muestras de BAG y en el 36,9% (24/65) de las muestras de PAAF en las que se solicitó estudio de *EGFR* y/o *ALK* se hicieron 3 o más marcadores (AE1-AE3, TTF1, p63/p40 entre otros). En algunas PAAF se emplearon más de 2 marcadores diagnósticos para tratar de diferenciar el origen de la tumoración en pacientes con antecedentes oncológicos y en las muestras histológicas, en determinados casos, se realizaron marcadores predictivos con fines de investigación solicitados desde el servicio de Oncología Médica.

6.1.3 Papel del citopatólogo *in situ* en la PAAF guiada por TC.

Las ventajas de la evaluación inmediata (*ROSE*, del inglés *Rapid on Site Evaluation*) de las muestras obtenidas mediante PAAF por un citopatólogo experto en las PTT-TC, han sido comentadas desde hace décadas en la literatura, confirmándose que aumenta la S para el diagnóstico de CP^{159,160}. En el estudio actual hemos recogido 617 PAAF guiadas por TC de lesiones pulmonares sospechosas, en las cuales siempre se ha realizado *ROSE*. En base a los resultados obtenidos, consideramos que esta actuación del citopatólogo ha sido fundamental para optimizar el diagnóstico, pues al examinar de inmediato la idoneidad de la muestra, ha permitido reducir el número de procedimientos no diagnósticos por material insuficiente así como los FN, lo cual también se menciona en la literatura^{135,160,149,150,161,162}. En relación a este punto, destaca por la metodología empleada un artículo de Tachibana y colaboradores, en el que comparan la eficacia de la PAAF guiada por TC sin y con *ROSE*, obteniendo exactitud diagnóstica del 79,6% (78/98) y 94,8% (163/172) y S del 74% y 94,1%, respectivamente¹⁶⁰.

La *ROSE* permite en ocasiones confirmar el diagnóstico de CP ya en ese momento, incluso diferenciar AC o CE, lo cual supone un paso importante para la toma de decisiones y permite agilizar la planificación del tratamiento¹⁴⁹. En el caso de material no valorable en muestras con extensa necrosis, frotis hemorrágicos, predominio de material inflamatorio o de fibrosis, se puede obtener en el momento una segunda muestra. Al evitar la repetición de la PAAF en otra cita, se reduce el coste sanitario del proceso diagnóstico y el retraso del inicio del tratamiento.

Por último, la *ROSE* permite reducir el riesgo de complicaciones de la PTT-TC cuando no se emplea aguja coaxial, pues se puede evitar un segundo pase de punción innecesario cuando el radiólogo al extender el material pudiera sospechar que fuese

insuficiente¹⁶¹. Tachibana y colaboradores observaron una considerable diferencia en la frecuencia de complicaciones sin (n=98) o con *ROSE* (n=172) del 14,3% y del 2,9%, respectivamente¹⁶⁰.

6.1.4 La importancia del equipo multidisciplinar en el manejo clínico actual del cáncer de pulmón.

Como se ha recalcado en la justificación de este trabajo, el desarrollo de tratamientos específicos que bloquean vías de proliferación celular en CPNCP no escamoso, eficaces únicamente en tumores que expresan determinadas alteraciones moleculares, ha llevado a la necesidad de seleccionar pacientes para terapias dirigidas, es decir, permite tratamientos personalizados pero con la consecuente complejidad sobreañadida en el proceso diagnóstico. La necesidad de identificar las mutaciones de *EGFR* y los reordenamientos de *ALK* en el CPNCP al diagnóstico de la enfermedad, ha impulsado el desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular y de IHQ y la comunidad científica ha propuesto distintos algoritmos de manejo de la muestra para realizar no sólo diagnóstico histológico sino también subclasificación molecular del CPNCP^{99,163}. El problema no sería tal si se tratase de diagnóstico en pieza quirúrgica, pero considerando que estos tratamientos están indicados en pacientes con enfermedad diseminada al diagnóstico, la realidad es que el patólogo va a disponer de muestras pequeñas. Por tanto, la dificultad radica en la obtención de material suficiente para realizar estudios moleculares tras el diagnóstico histológico y para lograr este objetivo, es fundamental trabajar en un equipo multidisciplinar. Cada especialista, consciente de la necesidad de realizar estudios moleculares, debe desempeñar adecuadamente su papel en el proceso diagnóstico del CP. Los radiólogos que realizan el muestreo mediante PTT-TC, los neumólogos que hacen FBC y los cirujanos torácicos que serán los que tomen la muestra en el caso de que no sea posible mediante las dos técnicas anteriores, deben de intentar obtener la mayor cantidad de material y de la mejor calidad posible, siempre, con el menor daño para el paciente^{164,165,166}.

Para rentabilizar el material de las muestras pequeñas, es necesario establecer unos estándares de manejo de la muestra en el laboratorio de dianas terapéuticas y priorizar la realización de estudios moleculares^{98,99,167,168,169,153}. La priorización de la muestra debe ser de gran importancia para los patólogos, concedores de la necesidad clínica de la subclasificación molecular del CPNCP.

Los oncólogos por otro lado, tienen un papel fundamental en el equipo multidisciplinar, puesto que conocen las indicaciones de los nuevos tratamientos y dirigen el manejo del paciente desde que se confirma la malignidad de la lesión. Son ellos los que deberán recordar a todos los especialistas implicados en el diagnóstico del CP, la importancia de conocer las alteraciones moleculares de *EGFR* y *ALK* en el CPNP no escamoso.

Por tanto, colaboración entre los neumólogos y los especialistas implicados en la toma de muestra, como son los radiólogos, los broncoscopistas y los cirujanos torácicos, y la comunicación entre éstos y los patólogos y oncólogos, es una necesidad indiscutible para realizar el manejo adecuado y un tratamiento personalizado en CP^{97,164,167,153,170,171}.

6.2 Discusión de los resultados

6.2.1 Características generales de la muestra.

La proporción de muestras procedentes de mujeres (33%) y varones (67%) en nuestra serie de 795 pacientes sometidos a PTT-TC para el diagnóstico de una lesión pulmonar sospechosa de malignidad, así como la media de edad (64,87 años) y localización más frecuente de las lesiones en lóbulos superiores (50%) son datos muy similares a los detallados en la literatura. Podemos afirmarlo tras haber realizado una revisión de artículos que incluyen entre 400 y 1000 pacientes para valorar la eficacia de la PTT-TC y las complicaciones derivadas del procedimiento^{141,147,172,173}.

La frecuencia de malignidad en la muestra global de nuestro trabajo (76%; 577 lesiones malignas/756 muestras valorables) es bastante similar a los artículos revisados, así como la frecuencia de CP en el total de muestras con resultado de malignidad (86%; 495/577)^{147,172,173}. La frecuencia del subtipo histológico de CPNP en el total de CP confirmado mediante PAAF o BAG (93%; 460/495) fue igualmente comparable a la registrada en otras series^{147,173}.

De los 495 pacientes de este trabajo en los que se diagnosticó CP mediante PTT-TC, 168 fueron operados, es decir, que la frecuencia de CP en estadio operable al diagnóstico fue de al menos un 34%, dato acorde a la literatura, en la que se repite que el CP se diagnostica en un 70% de los casos en estadio de enfermedad avanzada^{2,3,98}.

Según los datos moleculares de los que disponemos, 17 pacientes de nuestra serie tenían CPNP *EGFR* mutado, 6 de muestras de BAG y 11 de PAAF (de los 82

en los que se obtuvieron resultados concluyentes del estudio de mutación de *EGFR*), es decir, que la frecuencia de *EGFR* mutado fue del 20,5%, también acorde a la literatura (20-25%)¹². Respecto a la traslocación de *ALK*, ésta se detectó en 4 CPNCP diagnosticados mediante BAG (de las 32 muestras en los que se obtuvieron resultados válidos del estudio de *ALK*), por lo que la frecuencia de esta alteración molecular fue casi del 13%, ligeramente superior a la descrita por Lindeman y colaboradores (2-7%)¹², aunque similar a la citada por Conde y colaboradores (10,5%)¹²⁵.

6.2.2 Rendimiento diagnóstico y eficacia de la PAAF frente a la BAG de lesiones pulmonares.

Tras una exhaustiva revisión de la literatura para conocer el rendimiento y la exactitud diagnóstica de la PTT-TC en lesiones pulmonares, se comprueba que las cifras son muy variables, especialmente considerando la falta de consenso en la literatura en los calibres de la aguja para hablar de PAAF o BAG, ya comentado en la discusión del método y motivo por el cual hemos comparado nuestros resultados considerando siempre el calibre de la aguja empleada, independientemente de que los autores especifiquen PAAF o BAG.

A penas existe literatura de PTT-TC con aguja de calibre <22G, a diferencia de estudios en los que analizan la eficacia del procedimiento con aguja de 18-20G. Nuestros resultados de la PAAF de 25G podemos compararlos únicamente con una serie de PTT-TC con aguja ultrafina, en el que comentan S, E, VPP y VPN del 93,6%, 100%, 100% y 70%, respectivamente¹⁷⁴. Por tanto, según este trabajo la PTT-TC con aguja de 25G tiene mayor eficacia en el diagnóstico de lesiones pulmonares malignas que según nuestros resultados (S, E, VPP y VPN del 89%, 80%, 97% y 51%, respectivamente). Sin embargo, el análisis de Oikonomou y colaboradores se realizó considerando 125 muestras, de las cuales sólo en 20 se consideró el diagnóstico en pieza quirúrgica, siendo el seguimiento clínico–radiológico el patrón oro en 105 pacientes (pues en un caso de los 126 iniciales no se disponía de seguimiento)¹⁷⁴. En cambio, en nuestra serie de PAAF 198 muestras fueron comparadas con el diagnóstico en pieza de resección y es este subgrupo el que se ha considerado para el análisis de eficacia. No hemos revisado las historias clínicas para incluir las muestras de pacientes no operados porque consideramos que progresión de enfermedad, no siempre traduce un diagnóstico inicial erróneo, incluso excluyendo aquellos casos en los que se hubiera dado patología concomitante y/o enfermedades intercurrentes que pudieran explicar el empeoramiento clínico o radiológico. La progresión tumoral puede deberse a aparición

de resistencia al tratamiento debido a la aparición de nuevas alteraciones moleculares en las células tumorales, a pesar de haberse realizado un correcto diagnóstico citopatológico o histológico inicial. Por tanto, estos casos no pueden ser considerados FN sin una segunda biopsia para estudio molecular, y ésta no se ha realizado en la mayoría de las series publicadas.

Comparar los parámetros de eficacia denominados exactitud diagnóstica y eficiencia en PAAF y BAG de nuestra serie de PTT-TC con la literatura de manera estricta es realmente complicado, debido a cierta confusión en la terminología en los artículos. En muchas de las referencias seleccionadas para comentar los resultados, la exactitud (del inglés, *accuracy*) se considera sinónimo de eficiencia. Sin embargo, la eficiencia de un test diagnóstico se define como la probabilidad de que un paciente sea correctamente clasificado por la prueba (sano o enfermo)¹⁷⁵, que en el contexto de este trabajo se traduce a clasificación de la lesión pulmonar como benigna o maligna. La exactitud diagnóstica en cambio, se refiere al número de casos con diagnóstico específico o subclasificación concordante con el diagnóstico en pieza quirúrgica. A pesar de que se trata de dos conceptos ligeramente diferentes, dada la confusión en la literatura se discuten ambos de manera conjunta.

En relación a la exactitud diagnóstica con aguja de 21-23G según la literatura es de hasta un 93% y 95%^{173,176}, mientras que en nuestra serie con aguja de 25G fue ligeramente inferior, del 77%, así como la eficiencia, que fue del 88%. En este caso deben ser mencionadas diferencias en el procesado de las muestras, pues la mayoría de las muestras obtenidas con agujas de calibre ≤ 22 G se procesan como bloque celular¹⁷³, y no se hace el diagnóstico en extensiones citológicas, que ha sido la metodología empleada en las PAAF de nuestro trabajo.

El rendimiento o proporción de muestras diagnósticas de las PTT-TC con aguja de 25G obtenido por Oikonomou y colaboradores fue del 100%, mientras que en nuestra serie obtuvimos un rendimiento del 85%, pero debe ser mencionada la gran diferencia en el tamaño muestral, siendo nuestra serie de 617 PAAF casi 5 veces mayor que la serie con la que nos comparamos ($n=126$)¹⁷⁴. El rendimiento de la PAAF en nuestro trabajo es sólo ligeramente inferior al de la PTT-TC con aguja de calibre 21-23G (90%–95%)^{173,176} o con aguja de 20G (de hasta el 90%)^{177,146} y la proporción de muestras diagnósticas en nuestra serie de PTT-TC con aguja 20G es acorde a la literatura actual (93%). Poulou y colaboradores, los cuales publican resultados de la PTT-TC en una serie de tamaño muy similar a la nuestra, obtuvieron mayor rendimiento diagnóstico con

aguja de 22G (97%) que con 18G (90%), al contrario que en nuestro trabajo en el que un 85% de las PAAF y un 93% de las BAG fueron diagnósticas. Estos autores especifican además que la BAG presenta menor rendimiento que la PAAF para el diagnóstico de lesiones de pequeño tamaño, factor que no ha sido analizado en nuestro trabajo¹⁴¹.

En la serie más amplia publicada de PTT-TC con aguja de 20G (n=1000), obtuvieron S, E y exactitud del 94%, 99% y 95%, respectivamente¹⁷², mientras que en nuestro trabajo (n=247) la S fue notablemente menor (74%) y la eficiencia también (76%), pero Hiraki y colaboradores emplearon fluoro-TC, no siendo así en nuestro trabajo, lo que seguramente haya influido en la menor eficacia del procedimiento. Sin embargo, si comparamos los resultados que hemos obtenido en las BAG con otras series de PTT-TC con aguja de 20G, llama la atención que la S y el VPN, del 74% y del 29%, respectivamente, es inferior a las cifras publicadas, pues la S es de hasta el 90%-92% y el VPN del 74%-83%, siendo la E y VPP inmejorables (100%)^{178,179}. Aunque nuestro análisis de eficacia se ha realizado con menor número de muestras (51) al considerar únicamente los pacientes operados, también es importante señalar que muchos de los pacientes sometidos a BAG eran candidatos a ensayos clínicos, por lo que el material obtenido podía corresponder con mayor probabilidad a áreas del tumor con cambios necróticos o de fibrosis secundarios a tratamientos previos. Choi y colaboradores utilizaron aguja coaxial de 20G, para aspiración y análisis citológico y para obtener muestra histológica y vieron que con muestras histológicas la eficacia diagnóstica era mejor (S, E y exactitud del 89%, 97% y 93% y del 94%, 100% y 95%, en muestra citológica e histológica, respectivamente)¹⁷⁷.

En estudios planteados con la finalidad de determinar qué aguja, si 22G o 20G, es mejor en la PTT-TC y si es necesario emplear ambas, se publican resultados comparables para establecer un diagnóstico específico en los carcinomas, salvo rendimiento con aguja 20G ligeramente superior¹⁸⁰. Sangha y colaboradores obtuvieron mayor S en el muestreo con aguja de 22G (95% vs 89%) pero mayor E con aguja de 20G (100% vs 81%)¹⁴⁶, resultados muy similares a los de nuestro trabajo en el que la PAAF mostró mayor S que la BAG (89% vs 74%) pero menor E para el diagnóstico de malignidad (80% vs 100%). Takeshita y colaboradores realizaron doble muestreo, con agujas de 20G y 22G en 740 lesiones y obtuvieron S y E global para detección de malignidad del 91% y 99%¹³⁹. En nuestro estudio no consideramos la posibilidad de obtener directamente dos muestras de la misma lesión con distintas agujas, pues se duplica el riesgo de complicaciones y según los resultados que presentamos el

rendimiento tanto de la PAAF como de la BAG empleadas por separado fue alto, especialmente en las BAG (93%).

En artículos que comparan PTT-TC con agujas de 22G y de 18G, afirman que la exactitud diagnóstica de la PAAF supera a la de la BAG (94 % vs 81%)¹³⁵, al igual que en nuestro trabajo, en el que obtuvimos exactitud del 77% en las PAAF y del 70% en las BAG, 88% y 76% de eficiencia de la PAAF y de la BAG, respectivamente, para el diagnóstico de lesión maligna, y 93% y 80% de eficiencia de PAAF y BAG para el diagnóstico de cáncer de pulmón, siendo un factor fundamental en los resultados de PAAF la presencia del citopatólogo en la sala de punciones.

Por último, podríamos incluir para finalizar la discusión de la eficacia de las PTT, un breve comentario sobre las PTT-US^{162,181,182} y series en las que se compara PTT-TC con aguja de 20 ó 22G frente a aguja de 14G^{138,183}, pero consideramos suficiente incluir los parámetros de eficacia y detalles de la metodología empleada en estos artículos en el anexo III, en el que se especifica además el tamaño muestral y resultados de toda la literatura comentada en este apartado.

6.2.3 Complicaciones de la punción guiada por TC y su correlación con el calibre de la aguja.

Las complicaciones derivadas de la PTT-TC de lesiones pulmonares es un tema ampliamente comentado en la literatura. Un metaanálisis del 2017 que incluye 32 artículos de BAG (8.133 procedimientos) y 17 de PAAF (4.620 procedimientos) se detalla una frecuencia de complicaciones del 39% en las BAG y del 24% en las PAAF y refieren una disminución de la odd ratio de complicaciones del 0,30 (95% IC: 0,15-0,59 %; $p < 0,001$) en las punciones con aguja de calibre $\geq 22G$ ¹⁸⁴. La aparición de cualquier tipo de complicación en las BAG según nuestra experiencia es mucho más frecuente, de hasta el 52%, y aún menos habitual en las PAAF, del 14%. Sin embargo, estas diferencias deben ser matizadas, puesto que en el metaanálisis, de los 36 artículos de PTT con agujas de 18-20G comentados, 26 son clasificados como BAG y 10 como PAAF.

En la única serie publicada de PTT-TC de lesiones pulmonares con aguja de 25G, la cual incluye 126 procedimientos, se analiza sólo la frecuencia de neumotórax, que fue del 20%¹⁷⁴. En cambio en nuestra serie de 617 PAAF fue sólo del 11%. Sin embargo, Oikonomou y colaboradores correlacionan esta complicación con la función respiratoria. En pacientes con función respiratoria normal o levemente alterada se dio neumotórax en

el 11%, en cambio en enfermos con moderada o severa alteración en las pruebas funcionales en el 30%. Por otro lado, la aparición de neumotórax está relacionada no sólo con el enfisema pulmonar, sino con otros factores, algunos obvios como la experiencia del radiólogo y el número de pases, y otros más discutidos como el tamaño de la lesión, el ángulo de entrada, atravesar cisuras, o la profundidad de la lesión desde la pared torácica^{135,185,186,187,188}, si bien el análisis de correlación entre estos factores y la aparición de neumotórax u otras complicaciones no ha sido considerado un objetivo específico en este trabajo.

En nuestro estudio el neumotórax se dio en el 30% de las BAG (24% que no requirió drenaje y 6% que sí lo requirió). La frecuencia de neumotórax en PTT-TC con aguja de 20G, seleccionando artículos que incluyan más de 200 procedimientos es del 13%-42%¹⁸⁴, es decir, muy variable. Estas cifras del 13% y del 42% curiosamente se citan en el mismo trabajo, en el que observaron una importante disminución de la frecuencia de neumotórax realizando la PTT-TC en decúbito lateral sobre el lado de la lesión, frente al procedimiento clásico¹⁸⁹. La frecuencia de neumotórax con aguja de 20G en series de punciones con técnica convencional es del 15%-38%¹⁸⁴, siendo por tanto la frecuencia de esta complicación en nuestra serie de BAG, del 30%, acorde a la literatura. El porcentaje de neumotórax que requirió colocación de drenaje de nuestra serie fue del 6%, lo cual también es comparable con las publicaciones de PTT-TC con 20G (3%-9%)¹⁸⁴.

Es importante subrayar en nuestro estudio la diferencia en la aparición de neumotórax en BAG y en PAAF (30% y 11%, respectivamente), así como de neumotórax que requirió drenaje (6% y 1%, respectivamente, incluidos los casos que requirieron tubo de drenaje), y en el análisis de regresión logística múltiple observamos que la BAG aumentó 3 veces la probabilidad de sufrir neumotórax en comparación a la PAAF y 5,5 veces la probabilidad de neumotórax que requiera tubo. En referencia a esta cuestión, destaca una revisión de 4.262 PTT-TC, 2.304 con aguja de 18G y 1.958 con aguja de 19G, en la que se registró neumotórax en el 35% y en el 24%, respectivamente, y éste requirió drenaje en el 17% y 13%, respectivamente. El uso de aguja de 18G frente a 19G se asoció a una tasa de neumotórax y neumotórax con drenaje mayor con $p < 0.0001$ y $p = 0.0003$, respectivamente¹⁸⁵. Hiraki y colaboradores observaron incidencia de neumotórax en una serie de 1.098 pacientes sometidos a BAG guiada por fluoro-TC con aguja de 19G del 42%, aconsejando tras analizar factores relacionados con esta complicación elegir siempre el punto de entrada que permita el trayecto más corto hasta llegar a la lesión¹⁸⁶.

En publicaciones en las que se revisa la frecuencia de hemorragia perilesional y de hemoptisis con aguja de 20G, la hemorragia se da en un 19%-29% y la hemoptisis en un 0,5%-1%¹⁸⁴. Sin embargo, la frecuencia de estas complicaciones observada en nuestra serie de BAG fue mayor: la hemorragia perilesional apareció en el 33% y la hemoptisis en el 7% de los procedimientos, es decir, fueron más frecuentes, en especial la hemoptisis, la cual se da hasta en un 14% de las PTT-TC con aguja de 18G¹⁸⁴, es decir, que el riesgo de sangrado y hemoptisis aumenta a mayor grosor de aguja. La diferencia en la frecuencia de aparición de hemoptisis entre las BAG y las PAAF en nuestra serie de PTT-TC fue también importante (1% y 7%, respectivamente) y vimos que la BAG aumenta 9 veces la probabilidad de hemoptisis frente a la PAAF. El porcentaje de hemorragia perilesional también fue bastante superior en las BAG que en las PAAF (33% y 3%, respectivamente), si bien esta complicación puede no tener ningún significado clínico y por tanto esta diferencia es menos destacable. Además, hemos observado que la hemoptisis secundaria a la BAG es una hemoptisis franca, mientras que en las PAAF es generalmente una leve expectoración con esputos hemoptoicos.

Por tanto, tal y como se refleja en nuestros resultados y en la literatura, el calibre de la aguja empleada en las PTT-TC influye significativamente en la probabilidad de aparición de cualquier tipo de complicación. Según nuestro análisis la BAG aumenta 7,7 veces la probabilidad de sufrir complicaciones respecto a la PAAF, pero además del calibre de la aguja otros factores también influyen en la frecuencia de complicaciones. Sangha y colaboradores observaron que la hemorragia y el neumotórax eran más frecuentes a menor tamaño de la lesión, tanto en la PAAF como en la BAG y que en pacientes con grado severo de enfisema, la BAG asocia mayor riesgo de neumotórax y de neumotórax que requiera drenaje que la PAAF¹⁴⁶. Capalbo y colaboradores observaron diferencias significativas en la aparición de hemorragia según la edad, más frecuente en mayores que en jóvenes (31% y 10%, respectivamente) y en la aparición de neumotórax, más frecuente en jóvenes que en mayores (30% y 17%, respectivamente), estableciendo el punto de corte para subdividir la muestra por edad en 65 años¹³⁵. En nuestro análisis en cambio, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la aparición de complicaciones según la edad. Tampoco según sexo del paciente o localización de la lesión. Sin embargo, en el caso de lesiones malignas observamos que la probabilidad de sufrir complicación de cualquier tipo aumenta 1,7 veces ($p=0.009$) y la de hemorragia perilesional aumenta 2,5 veces ($P<1\times 10^{-4}$) respecto a las PTT-TC de lesiones benignas.

Por último, otras complicaciones menos frecuentes como diseminación en el trayecto de la aguja, hemotórax, embolismo aéreo o infección (cutánea, empiema o neumonía), no fueron recogidas en nuestra revisión, sin embargo, sí que anotamos entrada en parada cardiorrespiratoria durante el procedimiento de dos pacientes sometidos a BAG mayores de 65 años y con pluripatología asociada.

6.2.4 Rendimiento de PAAF y BAG para el estudio de biomarcadores predictivos en CPNCP.

Actualmente existe evidencia científica para afirmar que los estudios de mutaciones de *EGFR* y de reordenamientos de *ALK* pueden realizarse a partir de cualquier tipo de muestras pequeñas, citológicas o histológicas, siempre y cuando el material que queda tras el diagnóstico histológico sea suficiente o haya sido reservado con anterioridad para dicho fin^{117,122,190,191,192,193,194,195,104,196}. Sin embargo, no hay consenso sobre qué método de muestreo inicial en el caso de las PTT-TC, si la PAAF o la BAG, tiene mayor rendimiento para realizar ambos estudios moleculares en el CPNCP no escamoso. Ésta ha sido la cuestión inicial que ha motivado la realización de este estudio retrospectivo cuyos resultados ya hemos detallado.

En nuestra serie de muestras registradas con la finalidad de determinar si la PTT-TC con aguja de 25G puede ser igual o más eficaz para el estudio molecular de *EGFR* y *ALK* que la PTT-TC con aguja de 20G, se incluyeron 107 muestras. En 97 muestras se solicitó estudio mutacional de *EGFR* y en 40 análisis de *ALK* (en la mayoría de los casos se solicitaron ambas).

La mayor parte de las publicaciones en las que se analiza el rendimiento de la muestra pequeña en CPNCP para el estudio de dianas terapéuticas, agrupan los estudios de mutaciones de *EGFR*, reordenamientos de *ALK* e incluso el estudio mutacional de *KRAS*^{117,163,180,192,197}. En este trabajo no se ha considerado el estudio mutacional de *KRAS*, porque que según las guías internacionales y nacionales^{198,13} no se consideraba un biomarcador predictivo cuando se diseñaron los objetivos del trabajo, si bien se ha realizado éste, además de *EGFR* y *ALK* en algunas de las muestras de BAG, incluyéndose como “otros marcadores” analizados.

En una primera revisión de la literatura actual, sorprende el escaso número de artículos en los que se analiza la rentabilidad de la PAAF guiada por TC para el estudio de biomarcadores en CPNCP, pues es cierto que existen numerosas publicaciones en las que se discute el rendimiento de la citología, pero consideran diferentes tipos de muestras y de diversa procedencia, es decir, citología del líquido pleural, PAAF de la lesión pulmonar mediante PTT o mediante FBC con o sin EBUS,

PAAF de adenopatías mediastínicas por FBC o transesofágica, o incluso muestreo de metástasis extratorácicas, guiado por TC o por US, sin desglosar el rendimiento obtenido según los tipos de muestra. Por tanto, comparamos nuestros resultados con series que analizan el rendimiento de un conjunto de distintas muestras citológicas con diagnóstico de CPNCP no escamoso, en las que se incluye material obtenido mediante PAAF guiada por TC de la lesión pulmonar entre otros. Además, existe también heterogeneidad en el procesado de la muestra citológica, en algunos trabajos se trabaja con bloque celular, en otros se utiliza citología líquida y en algunos se parte de las extensiones en cristales para el estudio mutacional de *EGFR* y *ALK*^{168,195,199,200,201,202}.

En nuestro trabajo se ha considerado el total de muestras de PTT-TC de los pacientes en los que se solicitó estudio de los biomarcadores *EGFR* y *ALK*, independientemente del material de partida. En el caso de las BAG se utilizó siempre material fijado en formol e incluido en parafina para el estudio molecular, es decir, el material de partida es homogéneo puesto que las muestras se han procesado para diagnóstico histológico siempre de la misma manera. En cambio en las PAAF, el material de partida para el estudio de *EGFR* se hizo tanto con citología líquida como con frotis secos teñidos con Diff-Quick® o extensiones directas fijadas en alcohol y teñidas con Papanicolaou, y para *ALK* se utilizó sobre todo bloque celular, pero también citología líquida. Esta es una limitación de este trabajo, pues seguramente el rendimiento diagnóstico no sea el mismo según se parta de un tipo de muestra de PAAF u otro, es decir, extensiones, bloque celular o citología líquida. Sin embargo, para el análisis de resultados no hemos considerado estas diferencias, puesto que no era inicialmente el objetivo del estudio y no quedó registrado por tanto el tipo de material de partida.

De las 107 muestras con diagnóstico de CPNCP y solicitud de estudios moleculares de *EGFR* y/o *ALK* de nuestra serie, 57 procedían de PAAF y 50 de BAG de lesiones pulmonares muestreadas mediante PTT-TC. De las 57 PAAF, en 54 se solicitó estudio mutacional de *EGFR* y en 11 análisis de *ALK*. De las 50 BAG, se solicitó análisis de *EGFR* en 43 y estudio de *ALK* en 29. Mencionamos de nuevo el tamaño muestral porque no hemos encontrado publicaciones que analicen el rendimiento de la PTT-TC para estudio molecular en CPNCP con un número de PTT comparable, en especial si consideramos que el calibre de la aguja fina empleado en nuestra serie es 25G.

En relación a los métodos utilizados para el estudio molecular existe mayor homogeneidad en nuestro trabajo, pues para el estudio mutacional de *EGFR* se han

empleado técnicas de PCR y para la detección de reordenamientos de *ALK*, técnica de FISH, tanto en las muestras de PAAF como en las de BAG. No obstante, en relación al estudio de *EGFR*, en las muestras de BAG se emplearon diferentes tipos de PCR (secuenciación directa y PCR cuantitativa en tiempo real con dos plataformas [Therascreen y cobas]), mientras que en la serie de PAAF este análisis se llevó a cabo siempre con PCR cuantitativa en tiempo real con la plataforma Therascreen. Dado el diseño inicial de este trabajo, no se ha desglosado el tipo concreto de PCR y se ha considerado como una técnica en conjunto, pudiendo ser este hecho una limitación de este estudio. Siguiendo este enfoque, se ha comparado el rendimiento de ambas técnicas de muestreo para el estudio de *EGFR* y *ALK* con series publicadas donde se ha empleado una metodología similar en el estudio molecular.

El mejor rendimiento global para estudio de estas dianas *EGFR* y *ALK* en muestra histológica obtenida con aguja de calibre 18-20G, según revisión de la literatura actual, es de hasta el 100% (n=43)¹³⁷ o el 98,5% (n=134)¹⁷⁹. En muestra citológica, el rendimiento global más elevado para estos 2 biomarcadores alcanza el 89,4%¹⁶³. En nuestro estudio no se ha analizado el rendimiento global, puesto que en primer lugar se trata de dos alteraciones moleculares diferentes que se estudian también con distinta metodología. En segundo lugar, en nuestro estudio el rendimiento de la PAAF y de la BAG para el estudio de *EGFR* y de *ALK* considerados por separado es muy variable, es decir, hay diferencia llamativa. Así, la PAAF mostró rendimiento del 98% y del 73% para el estudio de *EGFR* y de *ALK*, respectivamente, y la BAG mostró rendimiento del 67% y del 83% para dichos estudios. Por ambos motivos, consideramos más adecuado la comparación del rendimiento de la PAAF y de la BAG por un lado para estudio de mutaciones de *EGFR* y por otro para el análisis de *ALK*, que el análisis del rendimiento global.

En nuestra serie obtuvimos un 98% de muestras de PAAF valorables para el estudio de mutaciones de *EGFR* frente a un 67% de muestras valorables de BAG. Llama la atención esta diferencia, algo superior al 30%, pero respecto a este dato debemos de recordar que las muestras de PAAF y BAG no proceden de los mismos pacientes ni de los mismos hospitales. En el caso de las BAG, los pacientes proceden en gran parte del Centro de Investigación Oncológica Clara Campal (CIOCC), anexo al Hospital Universitario HM Sanchinarro, donde se realiza la obtención de la muestra y los posteriores diagnóstico histológico y estudio molecular en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas (LDT) de este hospital. Una parte de estos pacientes vienen ya diagnosticados de otros centros y requieren otra muestra para realizar el estudio molecular dado que son potenciales candidatos a entrar en ensayos clínicos, es decir,

que se trata de enfermos que ya han sido tratados sin respuesta a una o incluso varias líneas de tratamiento, lo que puede influir en la calidad de la muestra. Por otro lado, en el LDT se realizaron a menudo otros biomarcadores en el contexto de ensayos clínicos o proyectos de investigación. Sin embargo, en la recogida de datos no hemos tenido en cuenta el orden de realización del conjunto de marcadores, y esta secuencia puede haber influido en el rendimiento de las BAG.

Tras una revisión exhaustiva de la literatura, el rendimiento de las muestras citológicas para el estudio mutacional de *EGFR* oscila desde un 92,2% (n=129)¹⁹⁵ hasta el 100% (n=114)¹⁹⁹, es decir, que los resultados obtenidos en este trabajo para la serie con aguja 25G y estudio de *EGFR*, con un rendimiento del 98% (n=54), son comparables a los descritos.

El rendimiento de las punciones con aguja 25G para realizar el estudio de reordenamientos de *ALK* fue del 73% en las PAAF y del 83% en las BAG, es decir, se obtuvieron resultados bastante similares, sin embargo, el número de muestras de BAG en las que se solicitó estudio de *ALK* (n=29) fue más del doble que el de PAAF (n=11).

Según datos de la literatura actual, el rendimiento de la muestra citológica para el estudio de reordenamientos de *ALK* mediante FISH es muy variable, desde el 80% (n=180)²⁰¹ hasta el 100%¹¹⁷. En nuestro trabajo se obtuvo un rendimiento inferior de la citología (73%), sin embargo todas las muestras proceden de PTT-TC, mientras que en las publicaciones citadas las muestras proceden de PTT, LBA o citología del líquido pleural, por lo que los resultados no son estrictamente comparables. Además, no siempre se especifica en la metodología el calibre de la aguja empleada en las PTT. Por otro lado, cabe de nuevo mencionar el reducido tamaño muestral en nuestro trabajo para el análisis de este objetivo específico (n=11), considerando necesario incluir un mayor número de muestras para tener resultados más robustos.

Por último, en el subgrupo de BAG con diagnóstico de CPNCP no escamoso contabilizamos un total de 24 muestras valorables para el estudio de *ALK* de las 29 en las que fue solicitado, correspondiente a un rendimiento del 83%. Este resultado es comparable con la literatura actual, puesto que el mejor rendimiento de las BAG para estudio de *ALK* publicado es del 86% (n=313)²⁰¹, si bien no se especifica en la metodología el calibre de la aguja empleada y se incluyen muestras de biopsia bronquial, transbronquial y transtorácica, y de lesiones pulmonares, pleurales y metastásicas, lo que de nuevo demuestra la heterogeneidad en la procedencia de las muestras, no sólo en las citológicas sino también en las histológicas.

6.2.5 Relación entre el número de marcadores empleados y el rendimiento de la muestra para posterior estudio molecular de *EGFR* y *ALK*.

Como se ha comentado anteriormente (ver apartado 5.1.2 de la discusión), la importancia de preservar tejido para estudios moleculares en las muestras pequeñas de lesiones pulmonares sospechosas de malignidad, es ampliamente comentada en la literatura, especialmente desde la aprobación del gefitinib o del erlotinib para los AC *EGFR* mutado^{169,4}. Incluso en determinados artículos, en los que se analiza la influencia de las guías *CAP/IASLC/AMP* en el rendimiento de las muestras pequeñas para estudios moleculares en CPNCP, se aconseja priorizar la realización de estudios de *EGFR* y *ALK*, frente a marcadores diagnósticos de IHQ. Ferretti y colaboradores observaron una reducción del número promedio de marcadores de 2,6 a 1 al comparar el rendimiento de la BAG antes y después de la publicación de estas guías²⁰³. Por otra parte, Rafael y colaboradores, observaron que el 5,3% de las muestras de PAAF fueron insuficientes para el estudio molecular debido al extenso panel de ICQ empleado para subclasificar el tumor, habiéndose realizado un promedio de 3,46 marcadores en 13 casos con ADN insuficiente¹⁶³.

Por otro lado, el porcentaje de CPNCP-NOS ha disminuido de manera considerable desde que surgió la necesidad clínica de diferenciar AC y CE para el estudio de biomarcadores. Esto ha sido fundamentalmente a expensas de la realización de IHQ/ICQ cuando las características morfológicas son insuficientes para diferenciarlos. Sin embargo, en un estudio de Da-Cunha y colaboradores, en el que analizan la capacidad del citopatólogo para diferenciar AC y CE tras la realización de ICQ, observaron que el número de marcadores no influía, tras revisar el diagnóstico de 602 PAAF con un promedio de 3 marcadores empleados¹⁵⁸.

En nuestra serie de PTT-TC, se registró el número de marcadores realizados con técnicas de ICQ/IHQ o FISH no sólo con fines diagnósticos sino también predictivos, solicitados en el contexto de ensayos clínicos o proyectos de investigación. Estas solicitudes fueron especialmente relevantes en la serie de BAG dado, como se ha comentado anteriormente, el contexto hospitalario de centro oncológico de esta cohorte de pacientes.

De forma resumida y como se ha comentado brevemente con anterioridad (ver apartado 5.1.2 de la discusión), la realización de marcadores fue necesaria en 34 de los 72 casos en los que se solicitaron estudios moleculares en muestras de BAG y en 48 de los 65 casos en los que se solicitaron estudios moleculares (de *EGFR* y/o *ALK*) en muestras de PAAF. En el caso de las BAG se realizaron más de dos marcadores

en el 21% (15/72) de las muestras con posterior solicitud de estudio de estas dianas y en las PAAF en el 37% (24/65). A pesar de ser un escaso número de muestras en cada subgrupo, se trata de grupos homogéneos en relación proporcional de tamaño muestral. La realización de marcadores influyó significativamente en el rendimiento de las muestras para el estudio molecular en la BAG, pues el rendimiento de las muestras para la realización de estas dianas fue del 81% cuando se hicieron menos de 3 marcadores y bajó al 47% cuando se hicieron 3 o más. Por el contrario, el número de marcadores empleados no influyó en el número de muestras válidas para el estudio molecular en las PAAF, al contrario de lo que observaron Rafael y colaboradores, puesto que en nuestro estudio el rendimiento de la PAAF para estudios moleculares fue del 90% cuando se emplearon hasta 2 marcadores y del 100% cuando se realizaron más de 2¹⁶³.

Tras una revisión exhaustiva de la literatura, no han sido hallados artículos en los que un objetivo principal sea concretamente analizar el rendimiento de las muestras de PTT-TC para el estudio de biomarcadores predictivos, en función del número de marcadores realizados. Sin embargo, nuestros resultados en este objetivo específico en relación al rendimiento para el estudio molecular de las muestras de BAG parecen concordantes con la literatura actual, observándose una correlación inversa entre el número de marcadores y el porcentaje de muestras válidas para la subclasificación molecular²⁰³. Nuestros resultados apoyan la necesidad de establecer algoritmos de priorización de la muestra para la realización de estudios moleculares, tal y como ya se ha discutido en este manuscrito^{4,99,153,169}.

6.2.6 Relación entre la celularidad tumoral y el rendimiento de las muestras de BAG para el estudio molecular de *EGFR* y *ALK*

El método más utilizado por los patólogos para cuantificar la calidad de una muestra para el estudio de biomarcadores predictivos es la estimación del porcentaje de celularidad tumoral (CT) analizado sobre las preparaciones histológicas teñidas con H&E²⁰⁴. Esta aproximación metodológica es la empleada en el presente trabajo.

El rendimiento de las muestras con una CT <10% fue del 44% para el estudio mutacional de *EGFR* y del 67% para la determinación de *ALK*, mientras que en las muestras con >30% de células tumorales, el rendimiento para el estudio de ambos biomarcadores superó el 80%. Acorde a la literatura actual²⁰³, en nuestra serie de CPNCP en BAG se observó que un bajo porcentaje de CT puede limitar el rendimiento de la muestra para el estudio mutacional de *EGFR*, siendo menos relevante en el

estudio de *ALK*, si bien el tamaño muestral es muy diferente, pues se solicitó estudio de *EGFR* en 43 BAG y de *ALK* en 29 BAG.

Diversos autores han analizado la validez de las muestras de BAG para el estudio mutacional de *EGFR* cuantificando el material según el tamaño de la muestra (adecuado en cilindros de entre 1,5 cm y 0,5 cm de longitud)¹³⁷. Otros autores incluso han comparado la calidad y cantidad de material en biopsias con agujas de 18G y de 20G según el peso de la muestra y la concentración de ADN, observando que, a pesar de que las muestras son de mayor peso cuando se emplea una aguja de 18G, la densidad óptica fue más constante en las BAG de 20G, si bien el estudio molecular pudo realizarse en el total de las muestras (n=47)¹⁴².

Otro método de cuantificación de la calidad de la muestra que se puede correlacionar con el rendimiento para dianas terapéuticas de la BAG es el área de tejido tumoral. Scarpino y colaboradores comentan que un área tumoral de 0.12mm² con 140±34 células tumorales es material suficiente para el estudio de mutaciones de *EGFR* (n=120), y que generalmente el material en muestras pequeñas es válido para detectar *EGFR* mutado mediante PCR y secuenciación directa cuando la muestra es suficiente para hacer el diagnóstico histológico de AC²⁰⁵.

Siguiendo la aproximación metodológica de la estimación del CT, Angulo y colaboradores reflejan la necesidad de estudiar, en cada laboratorio, el límite de detección de cada técnica de PCR empleada para el estudio mutacional de *EGFR*¹²¹. Así mismo, concluyen que las plataformas de PCR cuantitativa en tiempo real tienen un límite de detección inferior a la secuenciación directa, es decir, necesitan menos CT de partida (5% aproximadamente) que la secuenciación directa (30% aproximadamente) para detectar la presencia de mutaciones en el gen *EGFR* con una buena sensibilidad y especificidad. Este trabajo refleja además que el límite de detección varía en función del tipo concreto de mutación.

En nuestra serie de CPNCP en BAG con solicitud de estudio mutacional de *EGFR* 14 de las 43 muestras resultaron no válidas (32,5%). Una posible explicación de este resultado es que el promedio de CT en estas 14 muestras fue inferior al 20%. Por otra parte, como se ha referido con anterioridad, en el presente trabajo no se ha desglosado el tipo concreto de PCR y se ha considerado como una técnica en conjunto, pudiendo ser este hecho una limitación de este estudio.

Scarpino y colaboradores afirman que en el 42% de las muestras en las que detectaron mutaciones de *EGFR* (n=26) la CT era <20%, recomendando la PCR en tiempo real para el estudio mutacional de *EGFR* en este contexto. En este sentido,

otros autores consideran necesario al menos un 40% de CT en muestras pequeñas para que el estudio de las mutaciones de *EGFR* mediante el método de secuenciación directa sea fiable²⁰⁶. Ferreti y colaboradores obtuvieron para un porcentaje de CT del 42% de media en dos subgrupos de 43 y 48 pacientes, rendimiento para estudiar las mutaciones típicas de *EGFR* (exones 19 y 21) del 85% y del 72% y 92% para estudiar otras mutaciones de *EGFR* en los exones 18 y 20, respectivamente. En nuestro trabajo no se ha desglosado tipo concreto de mutación de *EGFR*. Nos centramos en una valoración global de la validez para la detección de mutaciones de *EGFR* de la metodología detallada con anterioridad, en función de la CT en las muestras de BAG, que se cuantifico en todos los casos en los que se solicitó este estudio molecular. Los resultados indican una evidente influencia del porcentaje de CT, tal y como se ha descrito en los resultados, quedando limitada la validez de las muestras en el 56% de los casos con CT <10% y en el 33% de las muestras con CT 11-29%.

El rendimiento de las muestras pequeñas de BAG para el estudio de reordenamientos de *ALK*, es menos dependiente del porcentaje de CT, tal y como hemos mencionado. Ferreti y colaboradores realizaron esta determinación por IHQ en el total de 91 muestras, confirmando mediante FISH únicamente 3 casos dudosos²⁰³. Just y colaboradores, los cuales analizan la exactitud de 5 métodos distintos para el estudio de *ALK*, mencionan como factores determinantes de la eficacia de estos test: la calidad del ARN, la calidad de la fijación y el tipo de reordenamiento de *ALK*, según la técnica empleada²⁰⁷. En nuestro estudio, observamos un menor rendimiento (67%) de las muestras con <10% de CT para la determinación de *ALK* mediante FISH, frente a un rendimiento >88% en muestras con >10% de CT. En cualquier caso, la interpretación de estos resultados debe hacerse con precaución, dado que únicamente se solicitó estudio de *ALK* en 29 muestras de BAG (20 con CT del >10% y en 9 muestras con <10% de células tumorales).

En base a la literatura y a nuestros resultados, se puede concluir que existe una correlación inversa entre el porcentaje de CT en las muestras histológicas pequeñas y el rendimiento de la muestra para el estudio mutacional de *EGFR*, mientras que el número de células tumorales no parece ser un factor determinante para la detección de reordenamientos de *ALK*.

VII. CONCLUSIONES

1. Las dos técnicas de muestreo analizadas, es decir, la biopsia con aguja gruesa de calibre 20G (BAG) y la punción-aspiración con aguja fina de 25G (PAAF), tienen una eficacia alta para el diagnóstico de lesiones pulmonares malignas. Ambas técnicas diagnósticas tienen similar valor predictivo positivo (alto), con una tendencia de la BAG a ser más específica que la PAAF. Por el contrario, la sensibilidad y la eficiencia de la PAAF para detectar malignidad son mayores que las de la BAG.

2. Las técnicas BAG y PAAF tienen una eficacia alta para el diagnóstico de cáncer de pulmón. Ambas técnicas tienen la misma especificidad, eficiencia y el mismo valor predictivo positivo pero la PAAF tiene mayores sensibilidad y valor predictivo negativo que la BAG en el diagnóstico de cáncer de pulmón.

3. El rendimiento diagnóstico de la punción transtorácica guiada por TC es alto tanto en la BAG como en la PAAF, siendo mayor en la BAG que en la PAAF.

4. La técnica BAG da lugar a complicaciones con mayor frecuencia que la PAAF. Realizar una BAG en lugar de una PAAF aumenta la probabilidad de producir neumotórax, neumotórax que requiera drenaje y especialmente la probabilidad de hemorragia perilesional y de hemoptisis.

5. La técnica de muestreo no parece influir en el rendimiento del estudio de reordenamientos de *ALK*. Sin embargo, el rendimiento para el estudio de las mutaciones de *EGFR* es mayor si el muestreo se hace con PAAF que con BAG.

6. El número de marcadores empleados influye en el porcentaje de muestras válidas para el posterior estudio de mutaciones de *EGFR* y de reordenamientos de *ALK* en las muestras de BAG pero no en las de PAAF.

7. En las muestras de BAG, un mayor porcentaje de celularidad tumoral favorece la obtención de resultados concluyentes en el estudio mutacional de *EGFR* pero no parece relevante en la determinación de *ALK*.

8. En resumen, la PTT-TC con aguja de 25G presenta al igual que la PTT-TC con aguja de 20G una alta eficacia para el diagnóstico de malignidad de lesiones pulmonares y de cáncer de pulmón, así como para su clasificación histológica, si bien las complicaciones son mucho más frecuentes en la BAG. Además, el rendimiento de

las muestras de PAAF de 25G para la realización de los estudios moleculares de EGFR y ALK en el CPNCP no escamoso es alto, comparable al de las muestras de BAG de 20G e incluso superior para el estudio mutacional de EGFR.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65:5–29.
2. Adamson RT. Biomarkers and molecular profiling in non-small cell lung cancer: an expanding role and its managed care implications. *Am J Manag Care* 2013;19:s398-404.
3. Río Ramírez MT, Jiménez Hiscock L. Actualización en el carcinoma broncogénico. 2012. Neumomadrid. [Internet]. [cited 2017 Apr 15]; Available from: http://neumomadrid.org/descargas/monog_neumomadrid_xix.pdf
4. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, et al. Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:668–84.
5. Sánchez de Cos J, Hernández JH, López MFJ, Sánchez SP, Gratacós AR, Porta RR, et al. SEPAR guidelines for lung cancer staging. *Arch Bronconeumol* 2011;47:454–65.
6. Las Cifras del Cáncer en España 2016. [Internet]. [cited 2017 Apr 15]; Available from: http://www.seom.org/seomcms/imagenes/stories/recursos/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESP_2016.pdf.
7. Travis, W.D., Brambilla, E., Burke, A.P., Marx, A., Nicholson AG. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Fourth edition - WHO - OMS -. Lyon: International Agency for Research on Cancer: 2015.
8. Kris MG, Johnson BE, Berry LD, Kwiatkowski DJ, Iafrate AJ, Wistuba II, et al. Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs. *JAMA* 2014;311:1998.
9. Morgensztern D, Campo MJ, Dahlberg SE, Doebele RC, Garon E, Gerber DE, et al. Molecularly Targeted Therapies in Non–Small-Cell Lung Cancer Annual Update 2014. *J Thorac Oncol* 2015;10:S1–63.
10. Tsao AS, Scagliotti G V., Bunn PA, Carbone DP, Warren GW, Bai C, et al. Scientific Advances in Lung Cancer 2015. *J Thorac Oncol* 2016;11:613–38.

11. 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.
12. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2013;137:828–60.
13. National Comprehensive Cancer Network [Internet]. [cited 2017 Apr 15]; Available from: https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf
14. Felip E, Concha Á, de Castro J, Gómez-Román J, Garrido P, Ramírez J, et al. Biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol* 2015;17:103–12.
15. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143.
16. Lung Cancer [Internet]. [cited 2017 Apr 15]; Available from: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer.html>
17. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 2013;49:1374–403.
18. Leiro-Fernández V, Mouronte-Roibás C, Ramos-Hernández C, Botana-Rial M, González-Piñeiro A, García-Rodríguez E, et al. Cambios en el estadio y presentación clínica del cáncer de pulmón a lo largo de dos décadas. *Arch Bronconeumol* 2014;50:417–21.
19. Thun MJ, Carter BD, Feskanich D, Freedman ND, Prentice R, Lopez AD, et al. 50-year trends in smoking-related mortality in the United States. *N Engl J Med* 2013;368:351–64.

20. Jha P, Ramasundarahettige C, Landsman V, Rostron B, Thun M, Anderson RN, et al. 21st-century hazards of smoking and benefits of cessation in the United States. *N Engl J Med* 2013;368:341–50.
21. Peto J. That lung cancer incidence falls in ex-smokers: misconceptions 2. *Br J Cancer* 2011;104:389.
22. Barone-Adesi F, Chapman RS, Silverman DT, He X, Hu W, Vermeulen R, et al. Risk of lung cancer associated with domestic use of coal in Xuanwei, China: retrospective cohort study. *BMJ* 2012;345:e5414–e5414.
23. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol* 2013;14:813–22.
24. Lorigan P, Radford J, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: a systematic review. *Lancet Oncol* 2005;6:773–9.
25. Kaufman EL, Jacobson JS, Hershman DL, Desai M, Neugut AI. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:392–8.
26. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeböller H, Rosenberger A, McCormack V, et al. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *Am J Epidemiol* 2012;176:573–85.
27. Herbst RS, Heymach J V., Lippman SM. Lung Cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1367–80.
28. Gould MK, Donington J, Lynch WR, Mazzone PJ, Midthun DE, Naidich DP, et al. Evaluation of individuals with pulmonary nodules: when is it lung cancer? Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143:e93S–120S.
29. Galea A, Dubbins P, Riordan R, Adlan T, Roobottom C, Gay D. The value of digital tomosynthesis of the chest as a problem-solving tool for suspected pulmonary nodules and hilar lesions detected on chest radiography. *Eur J Radiol*

- 2015;84:1012–8.
30. Ferreirós J, Cabeza B, Gayete Á, Sánchez M, Torres MI, Cobo M, et al. Recomendaciones para el diagnóstico radiológico y la valoración de la respuesta terapéutica en el cáncer de pulmón. Consenso nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica y la Sociedad Española de Oncología Médica. *Radiologia* 2014;57:66–78.
 31. Gould MK, Fletcher J, Iannettoni MD, Lynch WR, Midthun DE, Naidich DP, et al. Evaluation of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:108S–130S.
 32. Li F, Sone S, Abe H, Macmahon H, Doi K. Malignant versus benign nodules at CT screening for lung cancer: comparison of thin-section CT findings. *Radiology* 2004;233:793–8.
 33. Ginsberg MS, Grewal RK, Heelan RT. Lung cancer. *Radiol Clin North Am* 2007;45:21–43.
 34. Saito H, Kameda Y, Masui K, Murakami S, Kondo T, Ito H, et al. Correlations between thin-section CT findings, histopathological and clinical findings of small pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer* 2011;71:137–43.
 35. Suzuki K, Kusumoto M, Watanabe S, Tsuchiya R, Asamura H. Radiologic Classification of Small Adenocarcinoma of the Lung: Radiologic-Pathologic Correlation and Its Prognostic Impact. *Ann Thorac Surg* 2006;81:413–9.
 36. Chu Z, Yang Z, Shao H, Zhu Z, Deng W, Tang S, et al. Small peripheral lung adenocarcinoma: CT and histopathologic characteristics and prognostic implications. *Cancer Imaging* 2011;11:237–46.
 37. Swensen SJ, Viggiano RW, Midthun DE, Müller NL, Sherrick A, Yamashita K, et al. Lung nodule enhancement at CT: multicenter study. *Radiology* 2000;214:73–80.
 38. Jeong YJ, Lee KS, Jeong SY, Chung MJ, Shim SS, Kim H, et al. Solitary Pulmonary Nodule: Characterization with Combined Wash-in and Washout Features at Dynamic Multi-Detector Row CT. *Radiology* 2005;237:675–83.

39. Hayes SA, Pietanza MC, O'Driscoll D, Zheng J, Moskowitz CS, Kris MG, et al. Comparison of CT volumetric measurement with RECIST response in patients with lung cancer. *Eur J Radiol* 2016;85:524–33.
40. Delgado Sánchez-Gracián, Martínez Rodríguez C TLC. Dual-energy computed tomography: what is it useful for? *Radiologia* 2013;55:346–52.
41. Lu GM, Zhao Y, Zhang LJ, Schoepf UJ. Dual-Energy CT of the Lung. *Am J Roentgenol* 2012;199:S40–53.
42. Tacelli N, Santangelo T, Scherpereel A, Duhamel A, Deken V, Klotz E, et al. Perfusion CT allows prediction of therapy response in non-small cell lung cancer treated with conventional and anti-angiogenic chemotherapy. *Eur Radiol* 2013;23:2127–36.
43. Miles KA, Lee T-Y, Goh V, Klotz E, Cuenod C, Bisdas S, et al. Current status and guidelines for the assessment of tumour vascular support with dynamic contrast-enhanced computed tomography. *Eur Radiol* 2012;22:1430–41.
44. Wielpütz M, Kauczor H-U. MRI of the lung: state of the art. *Diagn Interv Radiol* 2011;18:344–53.
45. Nishino M, Hatabu H, Johnson BE, McLoud TC. State of the art: response assessment in lung cancer in the era of genomic medicine. *Radiology* 2014;271:6–27.
46. Regier M, Schwarz D, Henes FO, Groth M, Kooijman H, Begemann PG, et al. Diffusion-weighted MR-imaging for the detection of pulmonary nodules at 1.5 Tesla: intraindividual comparison with multidetector computed tomography. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2011;55:266–74.
47. Ohno Y, Koyama H, Onishi Y, Takenaka D, Nogami M, Yoshikawa T, et al. Non-Small Cell Lung Cancer: Whole-Body MR Examination for M-Stage Assessment—Utility for Whole-Body Diffusion-weighted Imaging Compared with Integrated FDG PET/CT. *Radiology* 2008;248:643–54.
48. Broncano J, Luna A, Sánchez-González J, Alvarez-Kindelan A, Bhalla S. Functional MR Imaging in Chest Malignancies. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2016;24:135–55.

49. Razek AAKA, Fathy A, Gawad TA. Correlation of apparent diffusion coefficient value with prognostic parameters of lung cancer. *J Comput Assist Tomogr* 2011;35:248–52.
50. Tondo F, Saponaro A, Stecco A, Lombardi M, Casadio C, Carriero A. Role of diffusion-weighted imaging in the differential diagnosis of benign and malignant lesions of the chest-mediastinum. *Radiol Med* 2011;116:720–33.
51. Baysal T, Mutlu DY, Yologlu S. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in differentiation of postobstructive consolidation from central lung carcinoma. *Magn Reson Imaging* 2009;27:1447–54.
52. Liu H, Liu Y, Yu T, Ye N. Usefulness of diffusion-weighted MR imaging in the evaluation of pulmonary lesions. *Eur Radiol* 2010;20:807–15.
53. Hochegger B, Marchiori E, Sedlacek O, Irion K, Heussel CP, Ley S, et al. MRI in lung cancer: a pictorial essay. *Br J Radiol* 2011;84:661–8.
54. Reischauer C, Froehlich JM, Pless M, Binkert CA, Koh D-M, Gutzeit A. Early treatment response in non-small cell lung cancer patients using diffusion-weighted imaging and functional diffusion maps--a feasibility study. *PLoS One* 2014;9:e108052.
55. Choyke PL, Dwyer AJ, Knopp M V. Functional tumor imaging with dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging* 2003;17:509–20.
56. Yokoi K, Kamiya N, Matsuguma H, Machida S, Hirose T, Mori K, et al. Detection of brain metastasis in potentially operable non-small cell lung cancer: a comparison of CT and MRI. *Chest* 1999;115:714–9.
57. Czernin J, Benz MR, Allen-Auerbach MS. PET/CT imaging: The incremental value of assessing the glucose metabolic phenotype and the structure of cancers in a single examination. *Eur J Radiol* 2010;73:470–80.
58. Kapoor V, McCook BM, Torok FS. An introduction to PET-CT imaging. *Radiographics* 2004;24:523–43.
59. Jeong YJ, Yi CA, Lee KS. Nódulos pulmonares solitarios: detección, caracterización y guías para su diagnóstico y tratamiento. *Radiologia*

- 2008;50:183–95.
60. Mak RH, Digumarthy SR, Muzikansky A, Engelman JA, Shepard J-AO, Choi NC, et al. Role of 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in predicting epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Oncologist* 2011;16:319–26.
 61. Park E-A, Lee HJ, Kim YT, Kang CH, Kang KW, Jeon YK, et al. EGFR gene copy number in adenocarcinoma of the lung by FISH analysis: investigation of significantly related factors on CT, FDG-PET, and histopathology. *Lung Cancer* 2009;64:179–86.
 62. Hicks RJ. Role of 18F-FDG PET in assessment of response in non-small cell lung cancer. *J Nucl Med* 2009;50 Suppl 1:31S–42S.
 63. Pozo-Rodríguez F, Martín de Nicolás JL, Sánchez-Nistal MA, Maldonado A, García de Barajas S, Calero-García R, et al. Accuracy of helical computed tomography and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography for identifying lymph node mediastinal metastases in potentially resectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:8348–56.
 64. Schmidt-Hansen M, Baldwin DR, Hasler E, Zamora J, Abaira V, Roqué i Figuls M. PET-CT for assessing mediastinal lymph node involvement in patients with suspected resectable non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 13:CD009519.
 65. Birim O, Kappetein AP, Stijnen T, Bogers AJJC. Meta-analysis of positron emission tomographic and computed tomographic imaging in detecting mediastinal lymph node metastases in nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005;79:375–82.
 66. De Leyn P, Lardinois D, Van Schil PE, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M, et al. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:1–8.
 67. Alonso Moralejo R, Sayas Catalán J, García Luján R, Coronado Poggio M, Monsó Molas E, López Encuentra Á. Utilidad de la tomografía por emisión de positrones en la detección de metástasis ocultas extratorácicas en el carcinoma broncogénico no células pequeñas. *Arch Bronconeumol* 2010;46:238–43.

68. Kligerman S, Digumarthy S. Staging of non-small cell lung cancer using integrated PET/CT. *AJR Am J Roentgenol* 2009;193:1203–11.
69. Fischer B, Lassen U, Mortensen J, Larsen S, Loft A, Bertelsen A, et al. Preoperative staging of lung cancer with combined PET-CT. *N Engl J Med* 2009;361:32–9.
70. Maziak DE, Darling GE, Inculet RI, Gulenchyn KY, Driedger AA, Ung YC, et al. Positron emission tomography in staging early lung cancer: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2009;151:221–8, NaN-48.
71. De Wever W. Role of integrated PET/CT in the staging of non-small cell lung cancer. *JBR-BTR* 92:124–6.
72. Subedi N, Scarsbrook A, Darby M, Korde K, Mc Shane P, Muers MF. The clinical impact of integrated FDG PET–CT on management decisions in patients with lung cancer. *Lung Cancer* 2009;64:301–7.
73. Kremer R, Peysakhovich Y, Dan L-F, Guralnik L, Kagna O, Nir R-R, et al. FDG PET/CT for assessing the resectability of NSCLC patients with N2 disease after neoadjuvant therapy. *Ann Nucl Med* 2016;30:114–21.
74. Cerfolio RJ, Bryant AS, Ojha B. Restaging patients with N2 (stage IIIa) non-small cell lung cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy: a prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:1229–35.
75. Lee P, Weerasuriya DK, Lavori PW, Quon A, Hara W, Maxim PG, et al. Metabolic tumor burden predicts for disease progression and death in lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;69:328–33.
76. Liao S, Penney BC, Zhang H, Suzuki K PY. Prognostic value of the quantitative metabolic volumetric measurement on 18F-FDG PET/CT in Stage IV nonsurgical small-cell lung cancer. - PubMed - NCBI. *Acad Radiol* 2012;19:69–77.
77. Graham MM, Badawi RD, Wahl RL. Variations in PET/CT methodology for oncologic imaging at U.S. academic medical centers: an imaging response assessment team survey. *J Nucl Med* 2011;52:311–7.
78. Mankoff DA, Eary JF, Link JM, Muzi M, Rajendran JG, Spence AM, et al. Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F]

- fluorodeoxyglucose and beyond. *Clin Cancer Res* 2007;13:3460–9.
79. Memon AA, Weber B, Winterdahl M, Jakobsen S, Meldgaard P, Madsen HHT, et al. PET imaging of patients with non-small cell lung cancer employing an EGF receptor targeting drug as tracer. *Br J Cancer* 2011;105:1850–5.
 80. Huellner MW, de Galiza Barbosa F, Husmann L, Pietsch CM, Mader CE, Burger IA, et al. TNM Staging of Non-Small Cell Lung Cancer: Comparison of PET/MR and PET/CT. *J Nucl Med* 2016;57:21–6.
 81. Heusch P, Buchbender C, Kohler J, Nensa F, Gauler T, Gomez B, et al. Thoracic Staging in Lung Cancer: Prospective Comparison of 18F-FDG PET/MR Imaging and 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med* 2014;55:373–8.
 82. Heusch P, Köhler J, Wittsack H-J, Heusner TA, Buchbender C, Poeppel TD, et al. Hybrid [¹⁸F]-FDG PET/MRI including non-Gaussian diffusion-weighted imaging (DWI): preliminary results in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Eur J Radiol* 2013;82:2055–60.
 83. Fraioli F, Screatton NJ, Janes SM, Win T, Menezes L, Kayani I, et al. Non-small-cell lung cancer resectability: diagnostic value of PET/MR. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42:49–55.
 84. López C, González Y, Frómeta A, Miller E. Biopsia transtorácica con aguja guiada por imágenes. *Medwave* 2011;11:e4831.
 85. DiBardino DM, Yarmus LB, Semaan RW. Transthoracic needle biopsy of the lung. *J Thorac Dis* 2015;7:S304-16.
 86. Ohno Y, Hatabu H, Takenaka D, Imai M, Ohbayashi C, Sugimura K. Transthoracic CT-guided biopsy with multiplanar reconstruction image improves diagnostic accuracy of solitary pulmonary nodules. *Eur J Radiol* 2004;51:160–8.
 87. Rotolo N, Floridi C, Imperatori A, Fontana F, Ierardi AM, Mangini M, et al. Comparison of cone-beam CT-guided and CT fluoroscopy-guided transthoracic needle biopsy of lung nodules. *Eur Radiol* 2016;26:381–9.
 88. Sconfienza LM, Mauri G, Grossi F, Truini M, Serafini G, Sardanelli F, et al. Pleural and Peripheral Lung Lesions: Comparison of US- and CT-guided Biopsy. *Radiology* 2013;266:930–5.

89. van 't Westeinde SC, Horeweg N, Vernhout RM, Groen HJM, Lammers J-WJ, Weenink C, et al. The Role of Conventional Bronchoscopy in the Workup of Suspicious CT Scan Screen-Detected Pulmonary Nodules. *Chest* 2012;142:377–84.
90. Binesh F, Pirdehghan A, Mirjalili MR, Samet M, Majomerd ZA, Akhavan A. Comparative assessment of the diagnostic value of transbronchial lung biopsy and bronchoalveolar lavage fluid cytology in lung cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;16:201–4.
91. Steinfort DP, Leong TL, Laska IF, Beaty A, Tsui A, Irving LB. Diagnostic utility and accuracy of rapid on-site evaluation of bronchoscopic brushings. *Eur Respir J* 2015;45:1653–60.
92. Oikawa T, Ohira T, Matsubayashi J, Konaka C, Ikeda N. Factors Influencing the Diagnostic Accuracy of Identifying the Histologic Type of Non--Small-Lung Cancer With Small Samples. *Clin Lung Cancer* 2015;16:374–8.
93. Bugalho A, Ferreira D, Eberhardt R, Dias SS, Videira PA, Herth FJ, et al. Diagnostic value of endobronchial and endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for accessible lung cancer lesions after non-diagnostic conventional techniques: a prospective study. *BMC Cancer* 2013;13:130.
94. Zhang R, Ying K, Shi L, Zhang L, Zhou L. Combined endobronchial and endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for mediastinal lymph node staging of lung cancer: a meta-analysis. *Eur J Cancer* 2013;49:1860–7.
95. Chen C-H, Liao W-C, Wu B-R, Chen C-Y, Chen W-C, Hsia T-C, et al. Endobronchial Ultrasound Changed the World of Lung Cancer Patients: A 11-Year Institutional Experience. *PLoS One* 2015;10:e0142336.
96. Micames CG, McCrory DC, Pavey DA, Jowell PS, Gress FG. Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration for Non-small Cell Lung Cancer Staging. *Chest* 2007;131:539–48.
97. Vansteenkiste J, Crino L, Dooms C, Douillard JY, Faivre-Finn C, Lim E, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014;25:1462–74.

98. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015;10:1243–60.
99. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Paz-Ares L, Belda-Iniesta C, Hidalgo M, et al. Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clin Transl Oncol* 2013;15:503–8.
100. Bishop JA, Teruya-Feldstein J, Westra WH, Pelosi G, Travis WD, Rekhtman N. p40 (Δ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 2012;25:405–15.
101. Whithaus K, Fukuoka J, Prihoda TJ, Jagirdar J. Evaluation of Napsin A, Cytokeratin 5/6, p63, and Thyroid Transcription Factor 1 in Adenocarcinoma Versus Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *Arch Pathol Lab Med* 2012;136:155–62.
102. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2011;12:175–80.
103. Oxnard GR, Binder A, Jänne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:1097–104.
104. Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 2014;511:543–50.
105. Devarakonda S, Morgensztern D, Govindan R. Genomic alterations in lung adenocarcinoma. *Lancet Oncol* 2015;16:e342–51.
106. Gandara DR, Hammerman PS, Sos ML, Lara PN, Hirsch FR, Hirsch FR. Squamous cell lung cancer: from tumor genomics to cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2015;21:2236–43.
107. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015;524:47–53.
108. Lyman GH, Moses HL. Biomarker Tests for Molecularly Targeted Therapies — The Key to Unlocking Precision Medicine. *N Engl J Med* 2016;375:4–6.

109. Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:13306–11.
110. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129–39.
111. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* (80-) 2004;304:1497–500.
112. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4–ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561–6.
113. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients – Revision 2016 Draft Recommendations – CONFIDENTIAL. 2016. [Internet]. [cited 2017 Apr 15]; Available from: https://www.iaslc.org/sites/default/files/wysiwyg-assets/5-20160616capiaslcamplungguideline-2016draftrecommendations_ocpfinal.pdf
114. Drilon A, Rekhtman N, Ladanyi M, Paik P. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *Lancet Oncol* 2012;13:e418–26.
115. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* 2016;17:e542–51.
116. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Mol Diagnostics* 2013;15:415–53.
117. Li W, Zhang Z, Guo L, Qiu T, Ling Y, Cao J, et al. Assessment of cytology based molecular analysis to guide targeted therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2016;7:8332–40.
118. Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, Lopez-Encuentra A, et

- al. Molecular Context of the EGFR Mutations: Evidence for the Activation of mTOR/S6K Signaling. *Clin Cancer Res* 2006;12:710–7.
119. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29:633–9.
120. Motoi N, Szoke J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW, et al. Lung Adenocarcinoma: Modification of the 2004 WHO Mixed Subtype to Include the Major Histologic Subtype Suggests Correlations Between Papillary and Micropapillary Adenocarcinoma Subtypes, EGFR Mutations and Gene Expression Analysis. *Am J Surg Pathol* 2008;32:810–27.
121. 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.
122. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, Marchetti A, Mok T, Novello S, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014;25:1681–90.
123. EGFR-TK mutation testing in adults with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer | Guidance and guidelines | NICE. [Internet]. [cited 2017 Apr 15]; Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/dg9>
124. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009;27:4247–53.
125. Conde E, Angulo B, Izquierdo E, Muñoz L, Suárez-Gauthier A, Plaza C, et al. The ALK translocation in advanced non-small-cell lung carcinomas: preapproval testing experience at a single cancer centre. *Histopathology* 2013;62:609–16.
126. Fan L, Feng Y, Wan H, Shi G, Niu W. Clinicopathological and demographical characteristics of non-small cell lung cancer patients with ALK rearrangements: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e100866.
127. Thunnissen E, Bubendorf L, Dietel M, Elmberger G, Kerr K, Lopez-Rios F, et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with

- recommendations. *Virchows Arch* 2012;461:245–57.
128. Angulo B, García-García E, Martínez R, Suárez-Gauthier A, Conde E, Hidalgo M, et al. A commercial real-time PCR kit provides greater sensitivity than direct sequencing to detect KRAS mutations: a morphology-based approach in colorectal carcinoma. *J Mol Diagn* 2010;12:292–9.
 129. 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.
 130. Conde E, Taniere P, Lopez-Rios F. The anaplastic lymphoma kinase testing conundrum. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15:161–3.
 131. Sokal RR, Rohlf FJ. *Biometry : the principles and practice of statistics in biological research*. 3ª ed. New York: W.H. Freeman & Co; 1995.
 132. R Core Team (2014). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [Internet]. [cited 2017 Apr 17]; Available from: <https://www.r-project.org/>
 133. Bozzetti C, Nizzoli R, Guazzi A, Franciosi V, Cattelani L, Crafa P, et al. Biological parameters on computed tomography guided fine needle aspiration biopsy from peripheral primary non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002;35:243–7.
 134. de Margerie-Mellon C, de Bazelaire C, de Kerviler E. Image-guided biopsy in primary lung cancer: Why, when and how. *Diagn Interv Imaging* 2016;97:965–72.
 135. Capalbo E, Peli M, Lovisatti M, Cosentino M, Mariani P, Berti E, et al. Trans-thoracic biopsy of lung lesions: FNAB or CNB? Our experience and review of the literature. *Radiol Med* 2014;119:572–94.
 136. Zhuang Y-P, Wang H-Y, Zhang J, Feng Y, Zhang L. Diagnostic accuracy and safety of CT-guided fine needle aspiration biopsy in cavitary pulmonary lesions. *Eur J Radiol* 2013;82:182–6.
 137. Zhuang Y-P, Wang H-Y, Shi M-Q, Zhang J, Feng Y. Use of CT-guided fine needle aspiration biopsy in epidermal growth factor receptor mutation analysis in patients with advanced lung cancer. *Acta Radiol* 2011;52:1083–7.

138. Beslic S, Zukic F, Milisic S. Percutaneous transthoracic CT guided biopsies of lung lesions; fine needle aspiration biopsy versus core biopsy. *Radiol Oncol* 2012;46:19–22.
139. Takeshita J, Masago K, Kato R, Hata A, Kaji R, Fujita S, et al. CT-Guided Fine-Needle Aspiration and Core Needle Biopsies of Pulmonary Lesions: A Single-Center Experience With 750 Biopsies in Japan. *Am J Roentgenol* 2015;204:29–34.
140. Ng YL, Patsios D, Roberts H, Walsham A, Paul NS, Chung T, et al. CT-guided percutaneous fine-needle aspiration biopsy of pulmonary nodules measuring 10 mm or less. *Clin Radiol* 2008;63:272–7.
141. Poulou LS, Tsagouli P, Ziakas PD, Politi D, Trigidou R, Thanos L. Computed tomography-guided needle aspiration and biopsy of pulmonary lesions: a single-center experience in 1000 patients. *Acta Radiol* 2013;54:640–5.
142. Cheung Y-C, Chang JW-C, Hsieh J-J, Lin G, Tsai Y-H. Adequacy and complications of computed tomography-guided core needle biopsy on non-small cell lung cancers for epidermal growth factor receptor mutations demonstration: 18-gauge or 20-gauge biopsy needle. *Lung Cancer* 2010;67:166–9.
143. Heyer CM, Reichelt S, Peters SA, Walther JW, Müller K-M, Nicolas V. Computed Tomography–Navigated Transthoracic Core Biopsy of Pulmonary Lesions. *Acad Radiol* 2008;15:1017–26.
144. Chiappetta M, Rosella F, Dall’armi V, Pomes LM, Petracca Ciavarella L, Nachira D, et al. CT-guided fine-needle ago-biopsy of pulmonary nodules: predictive factors for diagnosis and pneumothorax occurrence. *Radiol Med* 2016;121:635–43.
145. Ohno Y, Hatabu H, Takenaka D, Higashino T, Watanabe H, Ohbayashi C, et al. CT-Guided Transthoracic Needle Aspiration Biopsy of Small (≤ 20 mm) Solitary Pulmonary Nodules. *Am J Roentgenol* 2003;180:1665–9.
146. Sangha BS, Hague CJ, Jessup J, O’Connor R, Mayo JR. Transthoracic Computed Tomography–Guided Lung Nodule Biopsy: Comparison of Core Needle and Fine Needle Aspiration Techniques. *Can Assoc Radiol J* 2016;67:284–9.

147. Montaudon M, Latrabe V, Pariente A, Corneloup O, Begueret H, Laurent F. Factors influencing accuracy of CT-guided percutaneous biopsies of pulmonary lesions. *Eur Radiol* 2004;14:1234–40.
148. Kothary N, Lock L, Sze DY, Hofmann L V. Computed tomography-guided percutaneous needle biopsy of pulmonary nodules: impact of nodule size on diagnostic accuracy. *Clin Lung Cancer* 2009;10:360–3.
149. Mazza E, Maddau C, Ricciardi A, Falchini M, Matucci M, Ciarpallini T. On-site evaluation of percutaneous CT-guided fine needle aspiration of pulmonary lesions. A study of 321 cases. *Radiol Med* 2005;110:141–8.
150. Küçük CU, Yilmaz A, Yilmaz A, Akkaya E. Computed tomography-guided transthoracic fine-needle aspiration in diagnosis of lung cancer: a comparison of single-pass needle and multiple-pass coaxial needle systems and the value of immediate cytological assessment. *Respirology* 2004;9:392–6.
151. Laurent F, Latrabe V, Vergier B, Michel P. Percutaneous CT-guided biopsy of the lung: comparison between aspiration and automated cutting needles using a coaxial technique. *Cardiovasc Intervent Radiol* 23:266–72.
152. Staroselsky AN, Schwarz Y, Man A, Marmur S, Greif J. Additional information from percutaneous cutting needle biopsy following fine-needle aspiration in the diagnosis of chest lesions. *Chest* 1998;113:1522–5.
153. Travis W, Rekhtman N. Pathological Diagnosis and Classification of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology: Strategic Management of Tissue for Molecular Testing. *Semin Respir Crit Care Med* 2011;32:022–31.
154. Zhao W, Wang H, Peng Y, Tian B, Peng L, Zhang D-C. Δ Np63, CK5/6, TTF-1 and napsin A, a reliable panel to subtype non-small cell lung cancer in biopsy specimens. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7:4247–53.
155. Mukhopadhyay S, Katzenstein A-LA. Subclassification of non-small cell lung carcinomas 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.
156. Noh S, Shim H. Optimal combination of immunohistochemical markers for

- subclassification of non-small cell lung carcinomas: A tissue microarray study of poorly differentiated areas. *Lung Cancer* 2012;76:51–5.
157. Rekhtman N, Ang DC, Sima CS, Travis WD, Moreira AL. Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol* 2011;24:1348–59.
 158. da Cunha Santos G, Lai SW, Saiegh MA, Geddie WR, Pintilie M, Tsao M-S, et al. Cyto-histologic agreement in pathologic subtyping of non small cell lung carcinoma: Review of 602 fine needle aspirates with follow-up surgical specimens over a nine year period and analysis of factors underlying failure to subtype. *Lung Cancer* 2012;77:501–6.
 159. Austin JH, Cohen MB. Value of having a cytopathologist present during percutaneous fine-needle aspiration biopsy of lung: report of 55 cancer patients and metaanalysis of the literature. *Am J Roentgenol* 1993;160:175–7.
 160. Tachibana K, Nakazato Y, Tsuchida S, Kazama T, Minato K, Yoshida T, et al. Immediate cytology improves accuracy and decreases complication rate in real-time computed tomography-guided needle lung biopsy. *Diagn Cytopathol* 2013;41:1063–8.
 161. Stewart CJ, Stewart IS. Immediate assessment of fine needle aspiration cytology of lung. *J Clin Pathol* 1996;49:839–43.
 162. Diacon AH, Theron J, Schubert P, Brundyn K, Louw M, Wright CA, et al. Ultrasound-assisted transthoracic biopsy: fine-needle aspiration or cutting-needle biopsy? *Eur Respir J* 2007;29:357–62.
 163. Rafael OC, Aziz M, Raftopoulos H, Vele OE, Xu W, Sugrue C. Molecular testing in lung cancer: fine-needle aspiration specimen adequacy and test prioritization prior to the CAP/IASLC/AMP Molecular Testing Guideline publication. *Cancer Cytopathol* 2014;122:454–8.
 164. Salgia R. Diagnostic challenges in non-small-cell lung cancer: an integrated medicine approach. *Futur Oncol* 2015;11:489–500.
 165. Murgu S, Colt H. Role of the Pulmonologist in Ordering Post-Procedure Molecular

- Markers in Non–Small-Cell Lung Cancer: Implications for Personalized Medicine. *Clin Lung Cancer* 2013;14:609–26.
166. Ferguson PE, Sales CM, Hodges DC, Sales EW. Effects of a Multidisciplinary Approach to Improve Volume of Diagnostic Material in CT-Guided Lung Biopsies. *PLoS One* 2015;10:e0140998.
167. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans A-MC, Doooms C, Elmberger G, García RC, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax* 2016;71:177–84.
168. Son C, Kang E-J, Roh MS. Strategic management of transthoracic needle aspirates for histological subtyping and *EGFR* testing in patients with peripheral lung cancer: An institutional experience. *Diagn Cytopathol* 2015;43:532–8.
169. Penault-Llorca F, Tixier L, Perrot L, Cayre A. [Strategy for molecular testing in pulmonary carcinoma]. *Ann Pathol* 2016;36:73–9.
170. Blackhall F, Thatcher N, Booton R, Kerr K. The impact on the multidisciplinary team of molecular profiling for personalized therapy in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013;79:101–3.
171. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF, Lantuejoul S, Papotti M, Rintoul RC, 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.
172. Hiraki T, Mimura H, Gobara H, Iguchi T, Fujiwara H, Sakurai J, et al. CT fluoroscopy-guided biopsy of 1,000 pulmonary lesions performed with 20-gauge coaxial cutting needles: diagnostic yield and risk factors for diagnostic failure. *Chest* 2009;136:1612–7.
173. Laspas F, Roussakis A, Efthimiadou R, Papaioannou D, Papadopoulos S, Andreou J. Percutaneous CT-guided fine-needle aspiration of pulmonary lesions: Results and complications in 409 patients. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2008;52:458–62.
174. Oikonomou A, Matzinger FR, Seely JM, Dennie CJ, Macleod PJ. Ultrathin needle (25 G) aspiration lung biopsy: diagnostic accuracy and complication rates. *Eur Radiol* 2004;14:375–82.

175. Ruiz de Adana Pérez R. Eficacia de una prueba diagnóstica: parámetros utilizados en el estudio de un test. *Jano* 2009;30–2.
176. Mondal SK, Nag D, Das R, Mandal PK, Biswas PK, Osta M. Computed tomogram guided fine-needle aspiration cytology of lung mass with histological correlation: A study in Eastern India. *South Asian J cancer* 2013;2:14–8.
177. Choi SH, Chae EJ, Kim J-E, Kim EY, Oh SY, Hwang HJ, et al. Percutaneous CT-guided aspiration and core biopsy of pulmonary nodules smaller than 1 cm: analysis of outcomes of 305 procedures from a tertiary referral center. *AJR Am J Roentgenol* 2013;201:964–70.
178. Li Y, Du Y, Yang HF, Yu JH, Xu XX. CT-guided percutaneous core needle biopsy for small (≤ 20 mm) pulmonary lesions. *Clin Radiol* 2013;68:e43–8.
179. Hsiao S-H, Chung C-L, Lee C-M, Chen W-Y, Chou Y-T, Wu Z-H, et al. Suitability of computed tomography-guided biopsy specimens for subtyping and genotyping of non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2013;14:719–25.
180. Coley SM, Crapanzano JP, Saqi A. FNA, core biopsy, or both for the diagnosis of lung carcinoma: Obtaining sufficient tissue for a specific diagnosis and molecular testing. *Cancer Cytopathol* 2015;123:318–26.
181. Schubert P, Wright CA, Louw M, Brundyn K, Theron J, Bolliger CT, et al. Ultrasound-assisted transthoracic biopsy: Cells or sections? *Diagn Cytopathol* 2005;33:233–7.
182. Hsu WH, Chiang CD, Hsu JY, Kwan PC, Chen CL, Chen CY. Ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy of lung cancers. *J Clin Ultrasound* 1996;24:225–33.
183. Ocak S, Duplaquet F, Jamart J, Pirard L, Weynand B, Delos M, et al. Diagnostic Accuracy and Safety of CT-Guided Percutaneous Transthoracic Needle Biopsies: 14-Gauge versus 22-Gauge Needles. *J Vasc Interv Radiol* 2016;27:674–81.
184. Heerink WJ, de Bock GH, de Jonge GJ, Groen HJM, Vliegenthart R, Oudkerk M. Complication rates of CT-guided transthoracic lung biopsy: meta-analysis. *Eur Radiol* 2017;27:138–48.
185. Kuban JD, Tam AL, Huang SY, Ensor JE, Philip AS, Chen GJ, et al. The Effect of Needle Gauge on the Risk of Pneumothorax and Chest Tube Placement After

- Percutaneous Computed Tomographic (CT)-Guided Lung Biopsy. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2015;38:1595–602.
186. Hiraki T, Mimura H, Gobara H, Shibamoto K, Inoue D, Matsui Y, et al. Incidence of and risk factors for pneumothorax and chest tube placement after CT fluoroscopy-guided percutaneous lung biopsy: retrospective analysis of the procedures conducted over a 9-year period. *AJR Am J Roentgenol* 2010;194:809–14.
187. Yildirim E, Kirbas I, Harman A, Ozyer U, Tore HG, Aytakin C, et al. CT-guided cutting needle lung biopsy using modified coaxial technique: factors effecting risk of complications. *Eur J Radiol* 2009;70:57–60.
188. Lim C-S, Tan L-E, Wang J-Y, Lee C-H, Chang H-C, Lan C-C, et al. Risk factors of pneumothorax after CT-guided coaxial cutting needle lung biopsy through aerated versus nonaerated lung. *J Vasc Interv Radiol* 2014;25:1209–17.
189. Kinoshita F, Kato T, Sugiura K, Nishimura M, Kinoshita T, Hashimoto M, et al. CT-guided transthoracic needle biopsy using a puncture site-down positioning technique. *AJR Am J Roentgenol* 2006;187:926–32.
190. Ellison G, Zhu G, Moulis A, Dearden S, Speake G, McCormack R. EGFR mutation testing in lung cancer: a review of available methods and their use for analysis of tumour tissue and cytology samples. *J Clin Pathol* 2013;66:79–89.
191. Dacic S, Nikiforova MN. Present and Future Molecular Testing of Lung Carcinoma. *Adv Anat Pathol* 2014;21:94–9.
192. Cai G, Wong R, Chhieng D, Levy GH, Gettinger SN, Herbst RS, et al. Identification of *EGFR* mutation, *KRAS* mutation, and *ALK* gene rearrangement in cytological specimens of primary and metastatic lung adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol* 2013;121:500–7.
193. Heymann JJ, Bulman WA, Maxfield RA, Powell CA, Halmos B, Sonett J, et al. Molecular testing guidelines for lung adenocarcinoma: Utility of cell blocks and concordance between fine-needle aspiration cytology and histology samples. *Cytojournal* 2014;11:12.
194. Lozano MD, Labiano T, Echeveste J, Gurrpide A, Martín-Algarra S, Zhang G, et al. Assessment of EGFR and KRAS mutation status from FNAs and core-needle

- biopsies of non-small cell lung cancer. *Cancer Cytopathol* 2015;123:230–6.
195. Han X, Zhang Z, Wu D, Shen Y, Wang S, Wang L, et al. Suitability of Surgical Tumor Tissues, Biopsy, or Cytology Samples for Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Testing in Non–Small Cell Lung Carcinoma Based on Chinese Population. *Transl Oncol* 2014;7:795–9.
 196. Leigh NB, Rekhtman N, Biermann WA, Huang J, Mino-Kenudson M, Ramalingam SS, et al. Molecular testing for selection of patients with lung cancer for epidermal growth factor receptor and anaplastic lymphoma kinase 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 guideline. *J Clin Oncol* 2014;32:3673–9.
 197. Schneider F, Smith MA, Lane MC, Pantanowitz L, Dacic S, Ohori NP. Adequacy of core needle biopsy specimens and fine-needle aspirates for molecular testing of lung adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 2015;143:193–200; quiz 306.
 198. Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients – Revision 2016 Draft Recommendations – CONFIDENTIAL. 2016;
 199. Khode R, Larsen DA, Culbreath BC, Parrish S, Walker KL, Sayage-Rabie L, et al. Comparative study of epidermal growth factor receptor mutation analysis on cytology smears and surgical pathology specimens from primary and metastatic lung carcinomas. *Cancer Cytopathol* 2013;121:361–9.
 200. Bellevicine C, Malapelle U, Vigliar E, de Luca C, Troncone G. Epidermal growth factor receptor test performed on liquid-based cytology lung samples: experience of an academic referral center. *Acta Cytol* 2014;58:589–94.
 201. Proietti A, Ali G, Pelliccioni S, Lupi C, Sensi E, Boldrini L, et al. Anaplastic lymphoma kinase gene rearrangements in cytological samples of non-small cell lung cancer: comparison with histological assessment. *Cancer Cytopathol* 2014;122:445–53.
 202. Rosenblum F, Hutchinson LM, Garver J, Woda B, Cosar E, Kurian EM. Cytology specimens offer an effective alternative to formalin-fixed tissue as demonstrated by novel automated detection for ALK break-apart FISH testing and immunohistochemistry in lung adenocarcinoma. *Cancer Cytopathol*

- 2014;122:810–21.
203. Ferretti GR, Busser B, de Fraipont F, Reymond E, McLeer-Florin A, Mescam-Mancini L, et al. Adequacy of CT-guided biopsies with histomolecular subtyping of pulmonary adenocarcinomas: influence of ATS/ERS/IASLC guidelines. *Lung Cancer* 2013;82:69–75.
204. Smits AJJ, Kummer JA, de Bruin PC, Bol M, van den Tweel JG, Seldenrijk KA, et al. The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Mod Pathol* 2014;27:168–74.
205. Scarpino S, Pulcini F, Di Napoli A, Giubettini M, Ruco L. EGFR mutation testing in pulmonary adenocarcinoma: evaluation of tumor cell number and tumor percent in paraffin sections of 120 small biopsies. *Lung Cancer* 2015;87:8–13.
206. Warth A, Penzel R, Brandt R, Sers C, Fischer JR, Thomas M, et al. Optimized algorithm for Sanger sequencing-based EGFR mutation analyses in NSCLC biopsies. *Virchows Arch* 2012;460:407–14.
207. Just P-A, Cazes A, Audebourg A, Cessot A, Pallier K, Danel C, et al. Histologic subtypes, immunohistochemistry, FISH or molecular screening for the accurate diagnosis of ALK-rearrangement in lung cancer: A comprehensive study of Caucasian non-smokers. *Lung Cancer* 2012;76:309–15.

IX. ANEXOS

ANEXO I

 <p>Hospital Universitario La Paz SaludMadrid Comunidad de Madrid</p> <p>Paseo de la Castellana, 261 28046 MADRID ☎ 91 727 70 00</p>	<p style="text-align: center;">ETIQUETA (EN SU DEFECTO, INDIQUE NOMBRE Y UBICACIÓN DEL PACIENTE)</p> <p>NOMBRE:</p> <p>PROCEDENCIA(CAMA) : NHC :</p> <p>FECHA :/...../..... GÉNERO :</p>
<p>CONSENTIMIENTO INFORMADO IDENTIFICACIÓN: G-RAD-027</p>	<p>SERVICIO DE RADIODIAGNÓSTICO HOSPITAL GENERAL E INFANTIL</p>
<p style="text-align: center;">PUNCIÓN CON CONTROL ECOGRÁFICO- RADIOLÓGICO</p>	
<p style="text-align: center;">¿QUÉ LE VAMOS A HACER?</p>	
<p>1. Descripción del procedimiento</p> <ul style="list-style-type: none"> • En qué consiste: en obtener muestras de órganos internos para poder analizarlos sin una exploración quirúrgica. • Cómo se realiza: mediante pinchazo con una aguja fina a través de la piel hasta la lesión que tiene en una parte de su cuerpo (tórax, abdomen, etc.) y que se ha detectado por palpación o por medios radiológicos. Controlamos la posición de la aguja con métodos de imagen como la ecografía o radiología. Cuando la punta de la aguja se sitúa en la lesión, el especialista aspira con una jeringa para obtener material para el diagnóstico en Anatomía Patológica. En ocasiones puede ser necesario realizarlo más de una vez. • Cuánto dura: aproximadamente 15 minutos. <p>2. Qué objetivos persigue: obtener el diagnóstico de la posible enfermedad.</p>	
<p style="text-align: center;">¿QUÉ RIESGOS TIENE?</p>	
<p>1. Riesgos generales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • La punción puede resultar algo molesta; se puede notar sensación de descarga eléctrica que desaparece al retirar la aguja aunque, en general, ni siquiera se precisa administrar anestesia local. • La complicación más frecuente son los mareos, (10% de media). • En las punciones de tórax pueden aparecer hemoptisis (al toser sale un poco de sangre) en un 3% de casos y neumotórax (aire en la membrana que envuelve al pulmón) de grado mínimo en un 42%. • En el abdomen (en menos de un 10%) hematomas, infección y neumotórax, y en el resto de localizaciones algún pequeño hematoma. <p>La mayoría de estas complicaciones son leves y no requieren tratamiento.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Existen otros riesgos graves muy infrecuentes (menos de uno por mil) como parada cardiorespiratoria, neumotórax grave y hemorragia abdominal. • Una vez realizada la prueba, a veces no se consigue obtener material para el diagnóstico; ello ocurre entre un 0-17% dependiendo del tipo y localización de la lesión. En estos casos debe recurrirse a técnicas más agresivas quirúrgicas que requieren anestesia general e ingreso hospitalario durante varios días. <p>2. Riesgos personalizados:</p> <p>Es importante que nos comunique si el paciente tiene alguna enfermedad conocida (especialmente del corazón), alergia a medicamentos u otras sustancias, y si se encuentra en tratamiento con anticoagulantes.</p> <p>Además de los riesgos anteriormente citados por la/s enfermedad/es que padece puede presentar otras complicaciones.....</p> <p>3. Beneficios del procedimiento a corto y medio plazo:</p> <p>Facilita el diagnóstico histológico.</p>	
<p style="text-align: center;">¿QUÉ OTRAS ALTERNATIVAS HAY?</p>	
<p>Es el primer paso y el menos agresivo en el diagnóstico histológico de la lesión. En casos concretos pueden ser necesarios procedimientos diagnósticos más agresivos como la biopsia que conlleva poder realizar un diagnóstico más fiable.</p>	

07.00

¿NOS AUTORIZA?	
<p>Por este documento solicitamos la autorización del paciente para realizar el procedimiento y/o prueba, y usar imágenes e información de su Historia Clínica con fines docentes o científicos, ya que está siendo atendido en un Hospital Universitario. Su anonimato será respetado.</p>	
DECLARACIONES Y FIRMAS	
<p>Antes de firmar este documento, si desea más información o tiene cualquier duda sobre la enfermedad del paciente, no tenga reparo en preguntarnos. Le atenderemos con mucho gusto. Le informamos que tiene derecho a revocar su decisión y retirar su consentimiento.</p> <p>Conforme a lo dispuesto en la LOPD (Ley de Protección de Datos) 15/1999 de 13 de diciembre se informa que los datos del paciente serán objeto de tratamientos e incorporados a ficheros del área 5 Atención especializada con fines asistenciales, de gestión investigación científica y docencia. Solo podrán ser cedidos a organismos autorizados. Podrá ejercer el derecho a acceso, cancelación, rectificación y oposición en la Gerencia del Área.</p>	
1. Relativo al paciente:	
D./D. ^a con D.N.I.	
He sido informado/a suficientemente de la intervención que se me va a realizar, explicándome sus riesgos, complicaciones y alternativas; la he comprendido y he tenido el tiempo suficiente para valorar mi decisión. Por tanto, estoy satisfecho/a con la información recibida. Por ello, doy mi consentimiento para que se me realice dicha intervención por el médico responsable y/o médico residente supervisado por facultativo especialista. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno, sin que esta decisión repercuta en mis cuidados posteriores.	
Sé que estoy siendo atendido en un Hospital Universitario. Autorizo SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> para utilizar material gráfico o biológico resultado de la intervención con fines docentes y científicos.	
Firma del paciente	Fecha: / /
2. Relativo al médico que solicita:	
Dr./Dra. he informado al paciente y/o al tutor o familiar del objeto y naturaleza del procedimiento que se le va a realizar explicándole los riesgos, complicaciones y alternativas posibles.	
Firma del médico	Fecha: / /
3. Relativo al médico que realiza:	
Dr./Dra. he informado al paciente y/o al tutor o familiar del objeto y naturaleza del procedimiento que se le va a realizar explicándole los riesgos, complicaciones y alternativas posibles.	
Firma del médico	Fecha: / /
4. Relativo a los familiares y tutores:	
El paciente D. /Dña. no tiene capacidad para decidir en este momento.	
D. /D. ^a con D.N.I. y en calidad de he sido informado/a suficientemente de la intervención que se le va a realizar. Por ello, doy expresamente mi consentimiento. Mi aceptación es voluntaria y puedo retirar este consentimiento cuando lo crea oportuno.	
Firma del tutor o familiar	Fecha: / /
07.00	

ANEXO II



Consentimiento informado biopsia con aguja gruesa (BAG)

D./Dña.,
 de.....años de edad, con domicilio en.....
, y con DNI

DECLARO

Que El Dr./Dra. me ha explicado debidamente que es conveniente proceder a la realización de una BIOPSIA CON AGUJA GRUESA (BAG) de la lesión localizada en PULMÓN.....

El propósito principal de la biopsia es el estudio anatomopatológico de la lesión, para lo cual se obtendrá una muestra parcial de la misma.

Se va a necesitar anestesia local, y se hará una pequeña incisión.

Se me ha informado de los posibles riesgos del procedimiento, en especial:

Riesgos generales: dolor, hematoma, sangrado o infección en la zona de punción.

Riesgos específicos: NEUMOTÓRAX, HEMORRAGIA PERILESIONAL, HEMOPTISIS.....

No se me ha dado garantía de que se puedan conseguir los objetivos diagnósticos previstos.

He comprendido la naturaleza de la prueba, estoy satisfecho/a con la información que se me ha proporcionado, y por ello DOY MI CONSENTIMIENTO para que se me practique el procedimiento de BIOPSIA CON AGUJA GRUESA.

Y para que así conste, firmo el presente original después de leído.

En....., a.....de..... de.....

TESTIGO

PACIENTE

MEDICO

D.N.I.:
Fdo.:

D.N.I.:
Fdo.:

Dr.:
Nº. Colegiado:
Fdo.:

REPRESENTANTE LEGAL

D.N.I.:
Fdo.:

Denegación o Revocación

Yo, D./Dña.....

Después de ser informado/a de la naturaleza y riesgos de la prueba antes señalada, manifiesto de forma libre y consciente mi denegación/revocación (táchese lo que no proceda) para su realización, haciéndome responsable de las consecuencias que puedan derivarse de esta decisión.

En....., a.....de..... de.....

TESTIGO

PACIENTE

MEDICO

D.N.I.:
Fdo.:

D.N.I.:
Fdo.:

Dr.:
Nº. Colegiado:
Fdo.:

REPRESENTANTE LEGAL

D.N.I.:
Fdo.:

ANEXO III

Rendimiento diagnóstico y eficacia de las punciones transtorácicas guiadas por TC según el calibre de la aguja empleada

Calibre de aguja (G)	Autor, año	Revista	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Exact (%)	Rendimiento (%)	N	ROSE	N*	Patrón oro
25	Oikonomou, 2004	<i>Eur. Radiol.</i>	93,6	100	100	70	94,2	100	126	no	125	Pieza quirúrgica y seguimiento
22	Sangha, 2016	<i>Can. Assoc. Radiol. J.</i>	95	81				79	124	si	98	Pieza quirúrgica y seguimiento
22	Coley, 2015	<i>Cancer Cytopathol.</i>					89	94	17	si		No compara diagnósticos
22	Capalbo, 2014	<i>Radiol. Med.</i>					94,83	89,3	56	si		No compara diagnósticos
22	Poulou, 2013	<i>Acta Radiol</i>						97,03	641	no		No compara diagnósticos
22	Diacon, 2007	<i>Eur. Respir. J.</i>						82 global 95 en CP	155	si		No compara diagnósticos
22	Schubert, 2005	<i>Diagn. Cytopathol. J. Vasc. Interv. Radiol.</i>						73,7	99	si	83	No compara diagnósticos
22	Ocak, 2016	<i>South Asian J. cancer</i>					82 global 89 cáncer		102			
21	Mondal, 2013	<i>J. Med. Imaging Radiat. Oncol.</i>	97	90	99	77	95	95,4	130	si	124	Pieza o biopsia quirúrgica
21	Laspas, 2008	<i>J. Med. Imaging Radiat. Oncol.</i>	92,1	98	99,7	66,7	93	90	409	Si	369	Pieza quirúrgica y seguimiento

Calibre de aguja (G)	Autor, año	Revista	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Exact (%)	Rendimiento (%)	N	ROSE	N*	Patrón oro
20	Coley, 20015	<i>Cancer Cytopathol.</i>					98	100	19		137	No compara diagnósticos
20	Hiraki, 2009	<i>Chest</i>	94,2	99,1	99,9	83,7	95,2 92,7 (≤1cm)	99,4	1000		1000	Pieza quirúrgica y seguimiento
20	Li, 2013	<i>Clin. Radiol.</i>	90,4	100	100	83,3	93,5	100	169		169	Pieza quirúrgica y seguimiento
20	Rotolo, 2016	<i>Eur Radiol.</i>	87-92	100	100	62-77	89-94	91,35	324		282	Pieza quirúrgica
20 aspiración y/o cilindro	Choi, 2013	<i>AJR</i>	93,1	98,8	99,3	88	95	89,92	268	si	241	Pieza quirúrgica y seguimiento
20 aspiración	Choi, 2013	<i>AJR</i>	89,2	97,4			93,4	80,85	94	si	76	Pieza quirúrgica y seguimiento
20 cilindro	Choi, 2013	<i>AJR</i>	93,6	100			95,2	95,42	153		146	Pieza quirúrgica y seguimiento
20 aspiración + cilindro	Choi, 2013	<i>AJR</i>	100	100			100	90,5	21	si	19	Pieza quirúrgica y seguimiento
20-22	Beslic, 2012	<i>Radiol. Oncol.</i>						79,6	147	no		Pieza quirúrgica y seguimiento
20 cilindro	Montaudon, 2004	<i>Eur Radiol.</i>	92,2	99,1	99,8	73,3			605		604	Histología o seguimiento
20 citología	Montaudon, 2004	<i>Eur Radiol.</i>	90,1	99,1	99,7	70,5		99	605	no	599	Histología o seguimiento

Calibre de aguja (G)	Autor, año	Revista	S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)	Exact (%)	Rendimiento (%)	N	ROSE	N*	Patrón oro
18-20	Hsiao, 2013	<i>Clin Lung Cancer</i>	92,2	100	100	74,1		98,29	352		329	Seguimiento
18	Capalbo, 2014	<i>Radiol. Med.</i>					81,8	81,9	66			No compara diagnósticos
18	Poulou, 2013	<i>Acta Radio.l</i>						90,55	245			No compara diagnósticos
PAAF-US	Hsu, 1996	<i>J. Clin. Ultrasound</i>					71	91	191		52	Pieza quirúrgica y seguimiento
PAAF + BAG-US	Hsu, 1996	<i>J. Clin. Ultrasound</i>					80	94	21		57	Pieza quirúrgica y seguimiento
14	Beslic, 2012	<i>Radiol. Oncol.</i>	96	100				96,85	95			Pieza quirúrgica y seguimiento
14	Diacon, 2007	<i>Eur. Respir. J.</i>						76 global	155			No compara diagnósticos
14	Ocak, 2016	<i>J. Vasc. Interv. Radiol.</i>					90 global		102			No compara diagnósticos
22 y 14	Schubert, 2005	<i>Diagn. Cytopathol.</i>						89,4	85	si	76	No compara diagnósticos

Para calcular el rendimiento se consideran todas las muestras incluidas inicialmente se haya hecho o no posteriormente comparación con pieza de resección o seguimiento y para calcular el resto de parámetros se consideran únicamente las muestras cuyo diagnóstico se contrastó con el patrón oro.

Abreviaturas: G: Gauge, S: Sensibilidad, E: Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo, Exact= Exactitud. N*= N comparada con patrón oro, ROSE= Rapid on site evaluation (evaluación inmediata de la validez de la muestra por un citólogo), CP: Cáncer de pulmón, PAAF-US/BAG-US= PAAF/BAG guiadas por ultrasonidos.

