



***CLART® CMA  
ALK·ROS1***

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LAS PRINCIPALES  
TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS EN LOS GENES ALK Y ROS1  
EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN  
PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

## **CLART® CMA ALK·ROS1**

*CLART®, CLART-Strip®, CAR®, SAICLART® y AUTOCLART® son marcas registradas por GENOMICA.*

Para ampliar la información descrita en este manual puede consultar la siguiente página web: [www.genomica.com](http://www.genomica.com)

Marcado CE



GENOMICA, S.A.U.  
Parque Empresarial Alvento, Edificio B  
Calle Vía de los Poblados, 1 – 1ª planta  
28033 Madrid, España  
[www.genomica.com](http://www.genomica.com)



Versión 2  
Mayo 2018

## Contenido

1. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	4
2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN.....	5
3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT .....	8
3.1. Reactivos de amplificación .....	8
3.2. Componentes de visualización .....	9
3.3 Otros componentes .....	10
4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS.....	11
4.1. Reactivos y material .....	11
4.2. Equipos .....	11
5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN .....	12
6. MUESTRAS .....	13
7. PROTOCOLO DE TRABAJO.....	13
7.1. Pretratamiento de la muestra .....	13
7.2. Extracción de ARN .....	15
7.2.1. Recomendaciones específicas para la extracción y adición de material extraído al tubo de amplificación .....	15
7.2.2. Método de extracción .....	16
7.3. Reacción de Amplificación.....	17
7.3.1. Recomendaciones específicas para la amplificación.....	17
7.3.2. Protocolo de Amplificación .....	17
7.4. Visualización del producto amplificado.....	19
7.4.1. Recomendaciones específicas para la visualización.....	19
7.4.2. Protocolo de visualización manual.....	20
7.4.3. Protocolo de visualización en autoclart® .....	22
8. RESULTADOS.....	25
9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO.....	26
9.1. Control de interferencias conocidas.....	26
9.2. Especificaciones técnicas.....	26
9.2.1. Parámetros analíticos .....	26
9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica.....	27
10. REFERENCIAS .....	30

# 1. GLOSARIO DE TÉRMINOS



Atención, ver instrucciones de uso



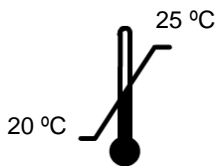
Fecha de caducidad



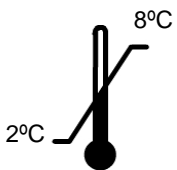
Producto sanitario para Diagnóstico *In Vitro*



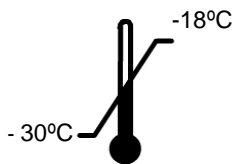
Lote



Conservar a temperatura ambiente



Conservar entre 2 °C y 8 °C



Conservar entre -30 °C y -18 °C

## 2. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA DE DETECCIÓN

**CLART® CMA ALK·ROS1** detecta la presencia de las principales translocaciones cromosómicas entre los genes:

- ALK (Anaplastic lymphoma kinase) con EML4 (Echinoderm microtubule-associated protein-like 4), y
- ROS.1 (Receptor tyrosine kinase) con SDC4 (syndecan 4), CD74 (Cluster of differ. entiation 74) y SLC34A2 (type II sodium/Phosphate cotransporter),

en pacientes con cáncer de pulmón.

Se ha descrito que pacientes con cáncer de pulmón con translocaciones en el gen ALK o ROS1, responden favorablemente a determinados fármacos (inhibidores ALK). La determinación de pacientes ALK-positivos y ROS1-positivos (especialmente en pacientes con cáncer de pulmón de células no microcíticas localmente avanzado o metastásico) es fundamental para identificar a aquellos pacientes que con más probabilidad pueden beneficiarse de un tratamiento dirigido con estos fármacos.

Las translocaciones detectadas por el kit **CLART® CMA ALK·ROS1** son las siguientes:

- **7 Translocaciones EML4-ALK:**
  - Variante V1: E13;A20 V1
  - Variante V6: E13; ins 69;A20
  - Variante V2: E20;A20
  - Variante V3a: E6:A20
  - Variante V3b: E6; ins 33 A20
  - Variante V5a: E2;A20
  - Variante V5b: E2; ins 117 A20
- **5 Translocaciones ROS.1:**
  - ✓ Translocaciones SDC4-ROS.1:
    - Variante SDC4-ROS1 exón 32 ( S2;R32)
    - Variante SDC4-ROS1 exón 34 (S2;R34)
  - ✓ Translocaciones CD74-ROS1: exón 34 (C6;R34)
  - ✓ Translocaciones SLC34A2-ROS1:
    - Variante SLC34A2-ROS1 exón 32 (S4;R32)
    - Variante SLC34A2-ROS1 exón 34 (S4;R34)

Material de partida: ARN extraído de biopsias de pulmón FFPE (tejido embebido en parafina fijado con formaldehído) (ver Apartado 6).

La detección está basada en nuestra tecnología CLART®: Una amplificación por PCR específica y multiplex a tiempo final, seguida de visualización en microarray de baja densidad.

En la Figura 1 se muestra un CLART-Strip® (CS), cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la caracterización de una muestra.

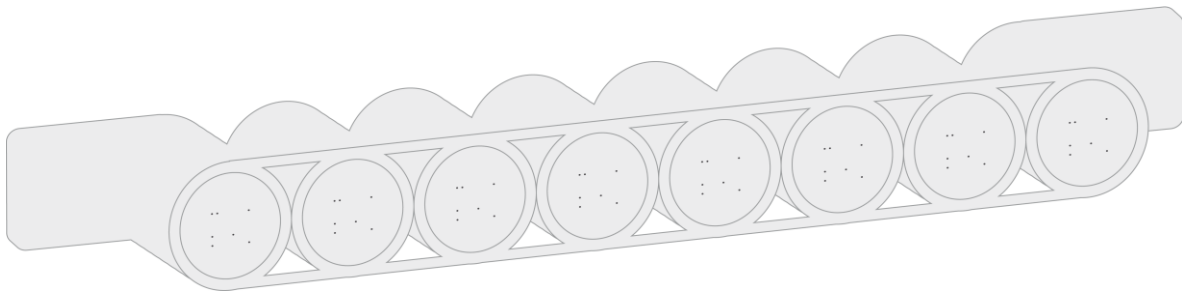
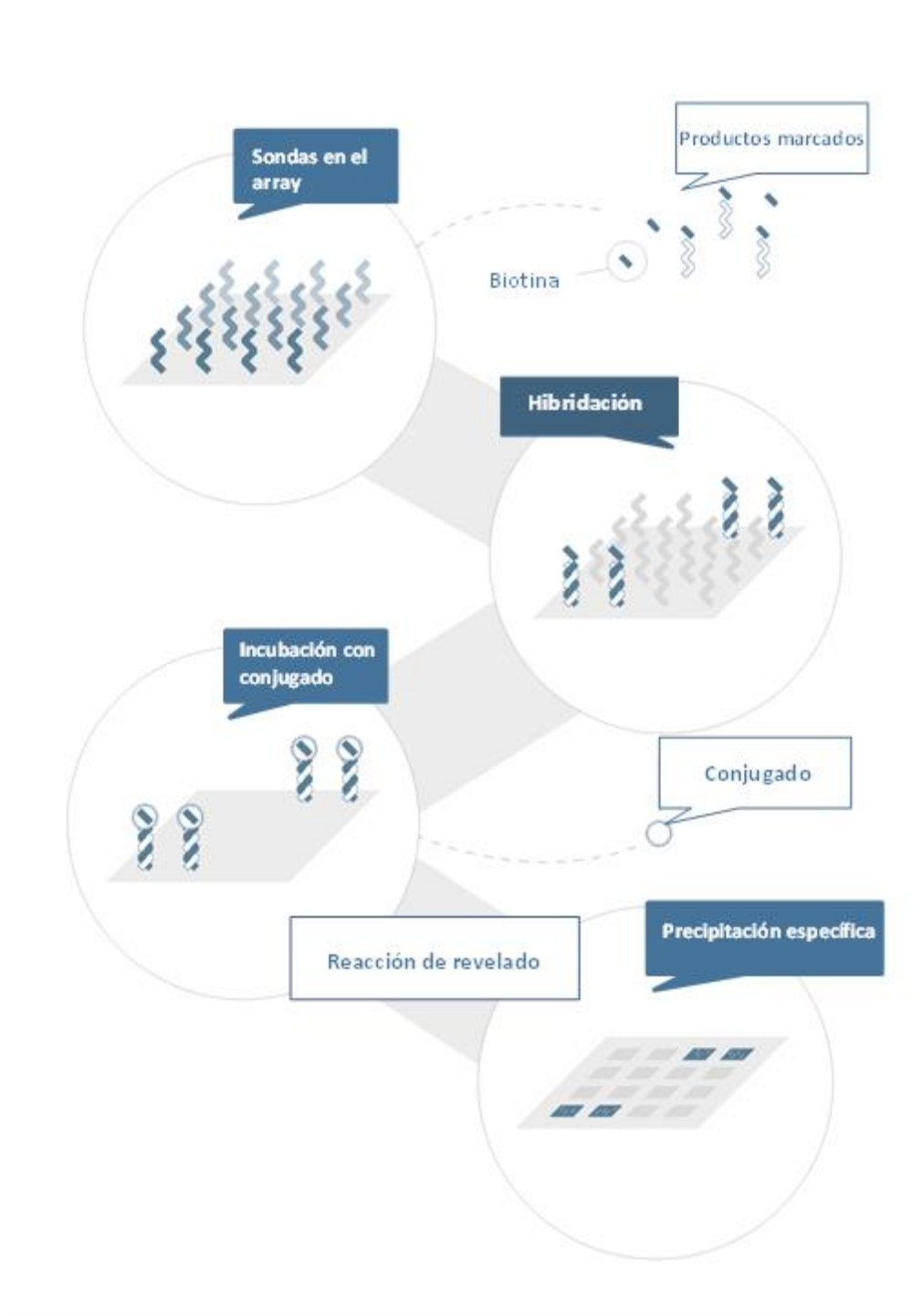


Figura 1. CLART-Strip® en forma de tira de 8 pocillos.

La Figura 2 muestra un esquema del sistema de detección. Básicamente, los productos amplificados por PCR, y marcados con biotina, hibridan con sus sondas complementarias específicas, inmovilizadas en áreas bien definidas del microarray. A continuación, tienen lugar dos pasos de incubación secuencial: primero, con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa, y segundo, con un sustrato de o-dianisidina.

Seguidamente, aparece un precipitado en aquellas regiones del microarray donde ha tenido lugar la hibridación específica entre los productos de amplificación y sus sondas específicas.

Finalmente tiene lugar el análisis e interpretación automática de resultados, gracias al lector CAR® (CLINICAL ARRAY READER), en el cual se emplean softwares diseñados y validados por GENOMICA.



**Figura 2. Esquema del Sistema de detección.** Las sondas inmovilizadas en la superficie del microarray capturan sus respectivos productos de amplificación complementarios, marcados con biotina. A continuación tiene lugar la unión de la biotina con el conjugado de estreptavidina-peroxidasa, seguida de una incubación con o-dianisidina, sustrato de la peroxidasa. Esto genera un precipitado en el área donde ha tenido lugar la hibridación.

### 3. COMPONENTES Y CONSERVACIÓN DEL KIT

Cada uno de los componentes del kit se envía a su temperatura óptima de almacenamiento, y permanecerá estable hasta la fecha de caducidad, siempre y cuando se respeten las recomendaciones de conservación.

#### 3.1. Reactivos de amplificación

Envío y almacenaje a -20°C.

Los tubos de amplificación se envían listos para su uso. Cada tubo de amplificación contiene 43 µL de mezcla de reacción. Sólo se debe descongelar el número exacto de tubos que se vaya a emplear. Los tubos restantes deben mantenerse a -20°C.

Se envían 2 tubos de amplificación y 1 tubo con la mezcla de enzima. Tubos de amplificación:

**Mix 1:** Tubo azul. Permite detectar las 7 translocaciones ALK-EML4:

Translocaciones ALK-EML4
<ul style="list-style-type: none"><li>• Variante V1: E13;A20 V1</li><li>• Variante V6: E13; ins 69</li><li>• Variante V2: E20;A20</li><li>• Variante V3a: E6;A20</li><li>• Variante V3b: E6; ins 33 A20</li><li>• Variante V5a: E2;A20</li><li>• Variante V5b: E2; ins 117 A20</li></ul>

**Mix 2:** Tubo blanco. Permite detectar las 5 translocaciones de ROS.1:

Translocaciones ROS.1
✓ Translocaciones SDC4-ROS.1: <ul style="list-style-type: none"><li>• Variante SDC4-ROS1 exón 32 (S2;R32)</li><li>• Variante SDC4-ROS1 exón 34 (S2;R34)</li></ul>
✓ Translocaciones CD74-ROS1: exón 34 (C6;R34)
✓ Translocaciones SLC34A2-ROS1: <ul style="list-style-type: none"><li>• Variante SLC34A2-ROS1 exón 32 (S4;R32)</li><li>• Variante SLC34A2-ROS1 exón 34 (S4;R34)</li></ul>



Ambos tubos de amplificación Mix 1 y Mix 2 contienen además respectivos controles de amplificación y endógenos

**Mezcla de Enzima:** es una mezcla de las enzimas de RT (retrotranscriptasa) y DNA Polimerasa. Se envía lista para su uso.

**¡ADVERTENCIA!** Añadir 2  $\mu$ l de Mezcla de Enzima en cada uno de los tubos Mix 1 y Mix 2 antes de introducir el material genético.

**Nota:** Las cajas de tubos de amplificación incluyen un indicador adhesivo e irreversible de temperatura; la aparición de un color rojizo en la ventana de visualización indica que en algún momento los productos han sobrepasado la temperatura de conservación de  $-20^{\circ}\text{C}$  y no deben utilizarse.

### 3.2. Componentes de visualización

Los componentes de visualización se dividen en dos grupos, en base a las condiciones óptimas de envío y conservación:

- Envío y almacenaje a temperatura ambiente:
  - **CLART-Strip® (CS)**, cada uno de cuyos pocillos contiene todas las sondas específicas para la detección de todas las translocaciones a detectar.

**Nota:** Las unidades de **CS** se envían en un sobre termosellado que ha de mantenerse cerrado y protegido de la luz y las altas temperaturas ( $25^{\circ}\text{C}$  máximo), hasta el momento de su uso.

- **SH** (Solución de Hibridación). **Conservar a temperatura ambiente**

- Envío y almacenaje a  $4^{\circ}\text{C}$ :
  - **DC** (Diluyente de Conjugado).
  - **CJ** (Solución de Conjugado). Dar un pulso en la centrífuga antes de usar.
  - **RE** (Solución de Revelado). Conservar protegida de la luz.
  - **TL** (Tampón de Lavado).
  - **Adaptador de placa Microtiter y tapa de plástico.**

### 3.3 Otros componentes

- Lector **CAR**<sup>®</sup> de GENOMICA.  
Garantiza la lectura, análisis e interpretación automática de resultados de hasta 12 **CS** (96 muestras) por ensayo. Despliega una interfaz gráfica de fácil utilización (CLEIS), e incluye el software de procesamiento de imagen SAICLART<sup>®</sup> propiedad de GENOMICA, así como Softwares específicos para cada kit.  
**Nota:** El uso del CAR<sup>®</sup> es exclusivo para kits de diagnóstico de GENOMICA.



Figura 3. CAR<sup>®</sup> (CLINICAL ARRAY READER)

- **autoclart**<sup>®</sup> de GENOMICA.  
Posibilita el procesamiento automático de hasta 12 tiras de **CSs** (96 muestras) durante la fase de visualización.

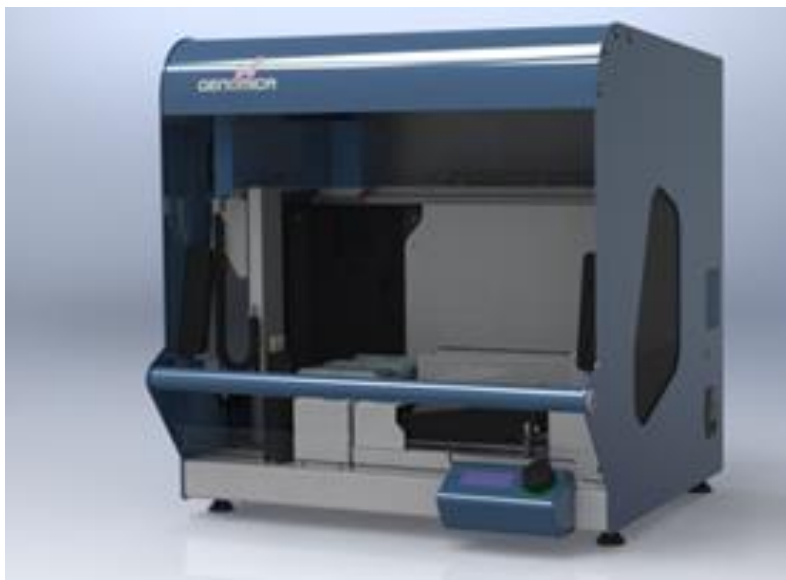


Figura 4. autoclart<sup>®</sup>

## 4. COMPONENTES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS

A continuación se proporciona una lista de todos los componentes requeridos y no suministrados:

### 4.1. Reactivos y material

- Agua destilada.
- Guantes desechables.
- Puntas con filtro o pipetas con desplazamiento positivo.
- Recipiente con hielo picado o “Cooler”.
- Tubos Eppendorf autoclavados de 1.5 mL.
- Gradillas para tubos de 1.5 mL.
- Soporte para tubos de 0.2 mL.
- RNeasy FFPE Kit de QIAGEN (recomendado).

### 4.2. Equipos

- Microcentrífuga.
- Espectrofotómetro de UV-visible (Nanodrop).
- Termociclador. Se recomienda el uso del termociclador convencional “Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler”. En caso de usar termocicladores de rampas rápidas, se recomienda el uso del termociclador “Mastercycler Nexus” de Eppendorf. En todos los casos será obligatorio programar el termociclador tal y como se explica en la sección 7.3.2. del presente manual.
- Cabina de seguridad biológica para el área de pre-PCR.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , y 200-1000  $\mu\text{L}$  para el área de pre-PCR.
- Una micropipeta ajustable entre 1-20  $\mu\text{L}$ , para añadir el material genético a los tubos de amplificación.
- Tres micropipetas ajustables en los rangos 1-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , y 200-1000  $\mu\text{L}$  para el área de post-PCR.
- Termobloque (Thermomixer) compatible con placas de amplificación de 96 pocillos con faldón y agitación, ajustable a 20°C, 25°C y 50°C.
- Vórtex.
- Bomba de vacío.

## 5. RECOMENDACIONES GENERALES Y PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

*Léase detenidamente para evitar contaminaciones.*

**1. La técnica CLART® CMA ALK·ROS1 ha de ser llevada a cabo en dos áreas separadas físicamente,** con el fin de minimizar contaminaciones de la muestra:

**Área pre-PCR.** En este lugar se lleva a cabo la preparación de las muestras, la extracción del ARN y la adición de material extraído a los tubos de amplificación. Es obligatorio el uso de una cabina de seguridad biológica, y el empleo de medidas de esterilidad lo más estrictas posible para evitar contaminaciones.

**Área de Post-PCR:** En éste área tiene lugar la amplificación y visualización del producto de amplificación. Se ha de evitar que el material del área de Post-PCR entre en contacto con el del área de Pre-PCR, por lo que se recomienda no entrar en las áreas de Pre-PCR tras trabajar en Post-PCR.

Cada área ha de disponer de su propio material independiente (pipetas, puntas, tubos, gradillas, guantes, etc.), el cual nunca debe sacarse de dicho área.

**2. Use guantes en todo momento.** Es recomendable cambiar a menudo de guantes, y obligatorio hacerlo (i) antes de empezar a trabajar en cada una de las áreas anteriormente mencionadas, y (ii) antes de añadir ARN a los tubos de amplificación.

**3.** Manipule el **xileno** siempre en el interior de una campana de gases, siendo obligatorio el uso de un equipamiento de protección personal como guantes y mascarilla. Deben aplicarse las recomendaciones para almacenaje de sustancias inflamables. Los restos de xileno generados han de ser tratados como material de desecho no halogenado.

**4. Limpie en profundidad las áreas de trabajo empleadas** (poyata, cabinas, gradillas, pipetas), con lejía diluida al 10%, **después de procesar cada tanda de muestras.** Es obligatorio descontaminar todas las áreas de trabajo en caso de producirse una contaminación. Asimismo, se recomienda limpiar termocicladores y termomixers antes y después de cada uso, siguiendo el mismo procedimiento.

**5. Use puntas con filtro o pipetas de desplazamiento positivo para evitar contaminaciones.** Emplee juegos de pipetas diferentes para cada área. Y descarte la punta de la micropipeta después de cada uso.

**6.** Use material de laboratorio desechable y autoclavado.

**7.** No deben mezclarse reactivos de viales diferentes, incluso aunque pertenezcan al mismo lote.

8. Cierre los tubos de reactivos después de su uso, con el fin de evitar contaminaciones.

9. GENOMICA no se hace responsable de los resultados obtenidos con el kit si se emplean condiciones distintas a las indicadas.

## 6. MUESTRAS

El kit **CLART® CMA ALK·ROS1** ha sido diseñado y validado para el uso a partir de ARN extraído de biopsias de cáncer de pulmón: piezas quirúrgicas, biopsias endoscópicas, biopsias por aguja gruesa, biopsias guiadas por ultrasonido endobronquial (EBUS) o endoscópica (EUS), punción-aspiración con aguja fina (PAAF), mediastinoscopia y toracotomía.

GENOMICA no se responsabiliza de los resultados si se utilizan otro tipo de muestras.

## 7. PROTOCOLO DE TRABAJO

Se recomienda un pretratamiento de la muestra utilizando los protocolos descritos a continuación, los cuales se han utilizado en parte de las validaciones externas del kit **CLART® CMA ALK·ROS1**.

### 7.1. Pretratamiento de la muestra

#### Procesado previo

Una vez obtenida la muestra, se almacenará a temperatura ambiente, habiendo de fijarse el tejido lo antes posible (máximo 1 h tras la obtención de la muestra). La fijación del tejido se llevará a cabo en formol neutro tamponado al 10%, no utilizándose fijadores basados en alcohol ni mercurio. El tiempo óptimo de fijación es de 8-24 horas para muestras quirúrgicas grandes y de 6-12 horas para muestras pequeñas. También pueden usarse muestras citológicas fijadas de forma inmediata con los métodos habituales.

A continuación las muestras se deben incluir en bloques parafina. Las muestras fijadas y embebidas en parafina deben colocarse en un portaobjetos de vidrio para la exploración por parte del patólogo. Cada muestra debe procesarse mediante un bisturí estéril nuevo.

Previo a la extracción del ARN de cada una de las muestras, el patólogo hará un estudio de cada corte que con la ayuda de la tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E), en una sección inmediatamente anterior a los cortes que se van a utilizar para el estudio molecular. El patólogo podrá delimitar y verificar el área tumoral mediante un porcentaje (%) de células tumorales que contiene dicha zona tumoral.

Se recomienda que el porcentaje células tumorales se encuentre, al menos, entre un 5-10% para que los resultados de la técnica sean significativos; por debajo de este porcentaje los resultados obtenidos pueden no ser valorables.

El número de cortes a extraer dependerá del tipo de muestra, tamaño del tejido tumoral y número de células presentes en el corte, pudiendo ser de entre 1 y 4 cortes/ muestra. Se recomienda seleccionar los fragmentos con mayor celularidad y menor necrosis. Los cortes de las muestras pueden estar en portaobjetos o en rollitos. Para una mayor información de cómo proceder se recomienda utilizar las guías consenso SEAP/SEOM.

A continuación, se indican las recomendaciones de la SEAP/SEOM en cuanto a número de cortes a extraer dependiendo del tipo de muestra, del tamaño de la zona tumoral de la muestra y del porcentaje de células tumorales en dicha zona tumoral:

- *Biopsias endoscópicas:*

- Serán necesarios 1-4 cortes de 5 µm de grosor, teniendo en cuenta que el porcentaje tumoral debe ser superior al 10%.

Si en el bloque de parafina la muestra tumoral está agotada o es insuficiente, se puede retirar el cubre de una preparación ya teñida, con acetona durante 10 minutos, e hidratar con alcohol de 96° durante 24 a 48 horas, si hay una celularidad mínima recomendada del 10%.

- *Citologías mediante EBUS, EUS o PAAF:*

Teniendo en cuenta que el porcentaje tumoral debe ser superior al 10%, las muestras serán procesadas por uno de los siguientes métodos:

- **Macrodissección:** Retirar el cubre de la extensión citológica y raspar todo el portaobjetos con cuchilla. Serán necesarios de 1-4 portaobjetos;
- **Microdissección láser o con aguja:** Marcar con rotulador los grupos tumorales y después marcar con lápiz de diamante esos grupos en el portaobjetos. Las células se obtienen con aguja 25G bajo control microscópico, siendo necesaria una celularidad mínima de 500 células.

- *Piezas quirúrgicas:*

- Marcar la zona tumoral con mayor proporción de tumor, evitando zonas con necrosis. Realizar 1-4 cortes de 5-10 µm y separar las zonas de interés.

## Desparafinación de muestras embebidas en parafina.

Una vez tengamos seleccionada y estimada la zona tumoral se procederá a desparafinar la muestra, seguida de la extracción.

- De portaobjetos:
  - Sumergir los portaobjetos en una cubeta con xileno 5 minutos.
  - Sumergir los portaobjetos en una cubeta con Etanol 96% 5 minutos.
  - Sumergir los portaobjetos en una cubeta con Etanol 96% fresco y macrodisecionar el tejido: raspar el tumor directamente del portaobjetos (mejor en húmedo para evitar la dispersión de la muestra) e introducir la muestra en un Eppendorf con ayuda de etanol al 96%.
  - Centrifugar 8 minutos a máxima velocidad. Eliminar el sobrenadante por decantación.
  - Centrifugar 4 minutos a máxima velocidad. Eliminar el sobrenadante con pipeta, evitando coger el precipitado. Dejar secar el etanol: 5 minutos a 56°C o a temperatura ambiente hasta que no haya restos de etanol.
  - Continuar con la extracción de ARN.
  
- De rollitos (cuando los cortes se introducen en un Eppendorf sin extender en portaobjetos):
  - Poner los cortes necesarios para llevar a cabo la extracción en un tubo de 1.5 ml recortando previamente la mayor cantidad de parafina posible.
  - Añadir 500 µl de aceite mineral pipeteando para deshacer un poco el material y cuidando que el aceite cubra bien los cortes.
  - Calentar en un bloque térmico a 95°C durante 2 minutos con agitación.
  - Centrifugar a 8000 rpm durante 2 minutos.
  - Aspirar todo el aceite con cuidado de no arrastrar el tejido.
  - Repetir los pasos del 2 al 5.
  - Añadir el buffer de lisis asegurando que cubra bien el tejido y empezar la extracción. Continuar con la extracción de ARN.

## 7.2. Extracción de ARN

### 7.2.1. Recomendaciones específicas para la extracción y adición de material extraído al tubo de amplificación

1. Utilizar guantes en todo momento.
2. Limpiar las superficies de trabajo de la cabina con lejía diluida al 10%.
3. Encender el flujo laminar y la luz UV al menos 20 minutos antes de comenzar la extracción. Apagar la luz UV cuando se esté trabajando dentro de la cabina.
4. La preparación de las muestras antes de su extracción, debe hacerse dentro de la cabina.

### 7.2.2. Método de extracción

Se recomienda utilizar el RNeasy FFPE Kit de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante, exceptuando la incubación con proteinasa K que se recomienda llevar a cabo durante 3-5 h a 56°C con agitación. Eluir en un volumen final de 30 µl. Otro kit que da buenos resultado es el RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE de Ambion. No obstante, el método de extracción elegido puede ser cualquiera que garantice los parámetros de concentración y pureza que se indican a continuación:

1. Con el fin de asegurar un 100% de sensibilidad se recomienda que la cantidad de ARN añadido al tubo de RT-PCR sea de 100 ng totales por tubo (en total 200 ng por muestra para este kit). Concentraciones menores de ARN pueden ocasionar una disminución de la sensibilidad según se indica a continuación:

Sensibilidad en función de los ng de ARN añadidos a cada tubo de amplificación:

ng ARN /tubo RT-PCR	Sensibilidad (%)
100 ng	100
99-50 ng	88.23 %
< 50 ng	66.7 %

Asimismo, un exceso de ARN puede dar lugar a un diagnóstico erróneo.

Por tanto, no sobrepasar los 100 ng totales por tubo de RT-PCR, ni tampoco añadir más de 10 µl por tubo (se deben añadir de 5 a 10 µl de ARN extraído a cada tubo de amplificación según la concentración).

Se recomienda diluir las muestras a 20 ng/µl para así añadir: 5µl a cada uno de los tubos de RT-PCR (100 ng totales).

Si la concentración es inferior a 10 ng/µl añadir 10 µl al tubo, independientemente de la concentración obtenida, considerando que los resultados en cuanto a sensibilidad pueden variar (según se indica en la tabla anterior).

2. El ARN extraído debe tener la suficiente pureza para evitar un diagnóstico erróneo: La medida del ratio entre la absorbancia a 260nm y la absorbancia a 280nm debe ser cercana a 2. Si la pureza no es la adecuada se debe volver a extraer.

3. El material extraído debe conservarse a -80°C.

Es importante incluir un control negativo de extracción para comprobar que las muestras no hayan sufrido contaminaciones durante los procesos de extracción, amplificación y visualización; lo que daría lugar a un falso positivo.



## 7.3. Reacción de Amplificación

### 7.3.1. Recomendaciones específicas para la amplificación

- Trabajar en el **área de pre-PCR**, siempre en el interior de una cabina con flujo laminar y siguiendo las recomendaciones de la Sección 5.
- Durante el proceso mantener los tubos separados y en hielo.
- Uso exclusivo en termocicladores convencionales que tengan velocidad de rampa de enfriamiento/calentamiento de, como máximo, 2-3°C por segundo y bloque de aluminio. No usar termocicladores de rampas rápidas. En algunos modelos de termocicladores de rampas rápidas se puede reducir la velocidad de las rampas a 3°C por segundo. Este kit ha sido validado en dos termocicladores con estos requisitos: “Mastercycler Nexus” de Eppendorf y “Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler”.
- Mantener los tubos de amplificación en frío durante su carga y hasta el momento de colocarlos en el termociclador, cuando el bloque se haya estabilizado. De este modo se minimizan las posibles amplificaciones inespecíficas debidas a incubación por debajo de la temperatura de hibridación.

### 7.3.2. Protocolo de Amplificación

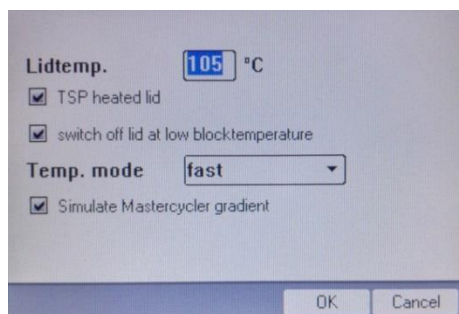
1. Descongelar a 4°C el número de tubos de amplificación necesario según el número de muestras y gen o genes que se vayan a analizar.
2. Centrifugar brevemente los tubos de amplificación para trasladar todo el líquido al fondo del tubo (en caso de no disponer de adaptadores de microcentrífuga para tubo, se pueden sustituir por tubos más grandes a los que se haya cortado la tapa).
3. Añadir 2 µl de la Mezcla de Enzima a cada tubo de amplificación y resuspender varias veces con la micropipeta.
4. Añadir a cada tubo de amplificación 5-10 µL de ARN extraído previamente conforme a las directrices de la sección 7.2.2. Comprobar previamente la concentración y pureza del mismo. Resuspender varias veces con la micropipeta, manteniendo los tubos a 4°C en todo momento.
5. Programar en el termociclador los siguientes ciclos de temperaturas:

A. Modelo “Mastercycler Nexus” de Eppendorf o modelos con rampa de

calentamiento de 3°C/seg. y de enfriamiento de 2°C/seg. y bloque de aluminio:

1 ciclo	45°C 45 min
	95°C 15 min
<b>42 ciclos</b>	95°C 60 seg
	62°C 60 seg
	72°C 60 seg
1 ciclo	72°C 7 min
4°C continuo hasta la recogida de los tubos	

NOTA: Muchos de estos termocicladores presentan diferentes opciones de PCR. En el caso de que exista esta modalidad, seleccionar la opción “fast”, tal y como se indica a continuación para el modelo *Mastercycler Nexus*:



B. Modelo “Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler” o modelos con rampa de calentamiento y enfriamiento de 2.7 °C/seg. y bloque de aluminio:

1 ciclo	45°C 45 min
	95°C 15 min
<b>40 ciclos</b>	95°C 60 seg
	62°C 60 seg
	72°C 60 seg
1 ciclo	72°C 7 min
4°C continuo hasta la recogida de los tubos	

6. Iniciar el programa y colocar los tubos en el termociclador cuando el bloque se haya estabilizado. Mientras tanto mantener los tubos refrigerados.

El producto amplificado debe visualizarse en un plazo máximo de cinco días, para evitar la degradación del mismo. Conservar a 4°C hasta su uso.

## 7.4. Visualización del producto amplificado

### 7.4.1. Recomendaciones específicas para la visualización

1. La visualización ha de llevarse a cabo siempre en el área de post-PCR. No introducir nunca de nuevo el producto amplificado el área de pre-PCR.
2. Limpiar el termociclador con solución de lejía diluida al 10% antes de poner en marcha el programa de desnaturalización. Colocar los tubos de amplificación separados en el termociclador durante el proceso y nunca sobrepasar los 10 min. de desnaturalización.
3. Se recomienda añadir cada solución sobre la pared del pocillo CS, nunca directamente sobre el fondo.
4. Evite que la punta de la pipeta o del sistema de vacío toque el fondo del pocillo, ya que podría dañar las sondas fijadas en el fondo del pocillo.
5. El array no debe quedarse totalmente seco en ningún momento hasta su lectura.
6. La solución de hibridación cristaliza a temperatura ambiente, por lo que antes de uso debe calentarse a 59°C hasta que la solución sea homogénea. Es conveniente no añadir la solución SH (Solución de hibridación) hasta que se vayan a añadir los productos desnaturalizados de PCR; por tanto mantener dicha solución de hibridación a 59°C hasta que sea añadida.
7. Asegurarse de que antes de comenzar la hibridación, el thermomixer de placas ha estado a 59°C durante al menos 60 minutos.
8. Tras la incubación con la solución CJ, es muy importante lavar bien el microarray para evitar que queden restos de éste y que reaccionen con la solución RE, produciendo un precipitado inespecífico que pueda dar lugar a interpretaciones erróneas del resultado.
9. Evite burbujas sobre la superficie del microarray al añadir cualquiera de las distintas soluciones.
10. Encender el CAR® antes de iniciar todo el proceso. La auto-calibración del equipo puede durar unos minutos. El aparato debe estar listo en el momento de la lectura para evitar esperas innecesarias que produzcan un exceso de revelado.
11. Preparar TL diluido inmediatamente antes de su uso; no reutilizar soluciones preparadas con anterioridad.

12. Durante la visualización no hace falta usar puntas con filtro, pero sí utilizar una punta diferente para cada pocillo y cambiarla cada vez que se añada un reactivo, incluso aunque se trate de TL.
13. Durante la adición de material amplificado a los pocillos del CS sí es necesario utilizar puntas con filtro.
14. Emplear bombas de vacío para aspirar las soluciones, y descontaminar con una solución de lejía diluida al 10% tras cada ensayo. Asegurarse de que la bomba aspira adecuadamente y no deja restos en el fondo del pocillo.
15. Tras la incubación con Solución CJ diluida, es esencial lavar en profundidad y rápidamente los pocillos del **CS**, para evitar que queden residuos que podrían ocasionar una precipitación inespecífica tras reacción con RE.
16. Al visualizar la imagen en el CAR®, comprobar que aparecen los marcadores de posición y que no hay burbujas, fibras o manchas que interfieran en la lectura. En caso contrario, limpiar el fondo exterior del pocillo con un papel de celulosa.

#### 7.4.2. Protocolo de visualización manual

1. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando éste haya alcanzado 99°C, e incubar a 99°C **durante 8 minutos**. En ningún caso sobrepasar 10 minutos de incubación. A continuación, sacar los tubos de la incubación a 99°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C.
2. Preparación de Solución de Lavado: Para cada **CS** que se vaya a procesar, preparar 10 mL de TL diluido, diluyendo 1 mL de TL en 9 mL de agua destilada. Agitar suavemente.
3. Prelavado de los CS: Colocar los **CS** necesarios en el adaptador de placa microtiter. Añadir 200 µL de TL diluido a cada pocillo antes de usarlo. Resuspender 10-15 veces con la pipeta multicanal. Se recomienda realizar este lavado mientras tiene lugar la desnaturalización de los productos de amplificación, y mantener la solución de lavado en los **CS** hasta la adición de los dichos productos. Desechar la solución de lavado con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío.

El array debe quedar sin restos de solución, aunque nunca debe permanecer seco durante mucho tiempo. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

4. Hibridación: Una vez desnaturalizados los productos amplificados, retirar la solución de lavado de los pocillos con una bomba de vacío. Inmediatamente después, añadir a cada pocillo 100 µL de SH precalentado a 59°C, evitando generar espuma.

Añadir **al mismo pocillo del CS**, los siguientes volúmenes de producto de PCR desnaturalizado correspondientes a los tubos de amplificación que se hayan utilizado para una misma muestra:

**Mix 1:** 5  $\mu$ l

**Mix 2:** 5  $\mu$ l

**Es condición indispensable para la correcta interpretación de los resultados visualizar todos los tubos de una misma muestra en el mismo pocillo del CS.**

Resuspender la solución varias veces, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. Se recomienda cargar cada tira de manera independiente y separada del resto para evitar contaminaciones. Cubrir el adaptador de placa microtiter y los **CSs** con la tapa de plástico, e incubar en el thermomixer durante 60 minutos a 59° C, y 550 rpm.

Después de la incubación, retirar la placa del thermomixer y aspirar la solución de incubación de los pocillos del CS con pipeta o bomba de vacío. El CS debe quedar sin restos de solución. Añadir la siguiente solución inmediatamente.

Programar el thermomixer a 20°C y en movimiento, para su uso posterior en el paso 6 de más abajo. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

5. Doble lavado: Añadir 200  $\mu$ L de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo de 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar la solución de lavado con pipeta o preferiblemente con bomba de vacío multicanal. Repetir. Usar puntas diferentes para cada pocillo en ambos lavados. Mantener las muestras en la solución de lavado hasta que el thermomixer alcance 20°C.
6. Bloqueo y conjugado: Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación preparar la Solución CJ diluida. Para ello añadir **15  $\mu$ L de CJ en 1 mL de DC** (cantidades adecuadas para un **CS**). Esta solución se debe de preparar 5 minutos antes de finalizar el tiempo de la hibridación.

Aspirar el TL diluido de los pocillos sin dejar ningún resto, y añadir **100  $\mu$ L** de Solución CJ diluida a cada pocillo. Incubar durante **30 minutos exactos en el thermomixer de placa a 20°C y 550 rpm**. Tras esta incubación, sacar la placa y retirar la solución rápidamente con pipeta o bomba de vacío multicanal. Dejar programado el thermomixer a 25°C y sin agitación para su utilización posterior en el paso 8. Para un descenso más rápido de la temperatura, se puede quitar la tapa.

7. Triple lavado: Inmediatamente después del paso 6, añadir 200  $\mu$ L de TL diluido a cada pocillo, resuspendiendo 10-15 veces con la pipeta multicanal. Aspirar el TL diluido con la pipeta o bomba de vacío procurando eliminar el mayor volumen posible. Repetir la operación **dos veces más**. Es **muy importante** que no queden restos de Solución CJ diluida en los pocillos.

8. **Revelado:** Eliminar por completo el TL diluido de los pocillos. A continuación, añadir **100 µL** de RE a cada pocillo e incubar durante **10 minutos a 25°C** en el thermomixer **sin agitación** (Asegúrese de que el thermomixer ha alcanzado 25<sup>0</sup> C). Retirar completamente la solución RE usando pipeta o bomba de vacío. Los pocillos deben quedar totalmente secos para la lectura.
9. **Lectura:** Colocar el adaptador de placa microtiter junto con el/ los CS/s a analizar en la bandeja del CAR<sup>®</sup>. El CAR<sup>®</sup> automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá un informe de resultados.

#### 7.4.3. Protocolo de visualización en autoclart<sup>®</sup>

1. Encender el equipo autoclart<sup>®</sup> y seguir las instrucciones que aparecen en la pantalla.
2. Cerrar la puerta y pulsar el mando.
3. Seleccionar “Run” en el menú de inicio.
4. Seleccionar el tipo de ensayo a realizar: **CLART<sup>®</sup> ALK·ROS1**
5. Seleccionar el pocillo de la tira en el que se desea comenzar: A1 o E1, éste último en el caso de que se reutilice un CS donde se hayan procesado previamente los 4 primeros pocillos.
6. Seleccionar el número de muestras. Con autoclart<sup>®</sup> se pueden procesar desde 4 a 96 muestras. El número de muestras debe ser un múltiplo de 4.
7. Verificar que el número de muestras y el pocillo de inicio (A1 o E1) indicados son correctos.
8. Colocar el rack completo de puntas en su posición correspondiente.
9. Chequear que el contenedor de puntas y el contenedor de desecho de reactivos están vacíos.
10. Llenar la botella de agua destilada con 250 ml de agua destilada.
11. Añadir los volúmenes de reactivos que autoclart<sup>®</sup> solicita en función del número de muestras que se quieran procesar:

**TL.** El volumen que aparece en la pantalla indica la cantidad de TL diluido necesaria. Para prepararlo realizar una dilución 1:10 de TL en agua destilada.

**CJ.** Centrifugar la solución CJ durante 10 segundos antes de usarla. A continuación preparar la Solución CJ diluida que indique la pantalla. Para ello añadir **15 µL de CJ** en **1 mL de DC** (cantidades adecuadas para un CS). Se debe dar un vórtex a la solución una vez diluida para homogenizar.

**RE.** Añadir el volumen de RE indicado en la pantalla.

12. Desnaturalización de los productos de amplificación: Colocar los tubos de amplificación en el termociclador cuando éste haya alcanzado **99°C**, e incubar a **99°C durante 10 minutos**. A continuación, sacar los tubos de la incubación a 99°C y colocarlos inmediatamente en un recipiente con hielo o a 4°C. Importante: Desnaturalizar los productos de PCR antes de preparar los reactivos de visualización en el autoclart®.

13. **SH.** Añadir el volumen de SH, atemperada a 59°C, que aparece en la pantalla.

ADVERTENCIA: Es imprescindible añadir la SH en este punto, si se añade antes puede suceder que disminuya demasiado la temperatura de la solución de hibridación con la consecuente bajada de intensidad de las sondas pudiendo dar lugar a la aparición de falsos negativos.

14. Cerrar la puerta y pulsar el mando para comenzar. El equipo realizará el pre-lavado de los CS y la adición de SH; a continuación emitirá un pitido para indicar que es el momento de la adición de las muestras; el pitido cesará cuándo el usuario abra la puerta del equipo.

15. Para añadir las muestras, sacar los CSs del autoclart® y añadir los siguientes volúmenes de producto amplificado desnaturalizado de cada uno de los tubos correspondientes a una misma muestra, a un mismo pocillo del CS:

**Mix 1: 5 µL**

**Mix 2: 5 µL**

Resuspender varias veces para que se mezcle con SH, con cuidado de no tocar el fondo del pocillo. A continuación, introducir de nuevo la placa en el autoclart® y pulsar el mando para que continúe el proceso de visualización.

16. Cuando ha terminado el proceso de visualización, el autoclart® emite un pitido hasta que el usuario abre la puerta del equipo para sacar los CS y proceder a la lectura en el CAR®.

ADVERTENCIA: Una vez finalizada la visualización en autoclart® debe procederse de forma inmediata a la lectura de los resultados en el CAR®, en caso contrario, podrían aparecer falsos negativos por pérdida de la intensidad de las sondas.

17. Coloque la placa en el CAR® para tomar las imágenes de todos los pocillos. El CAR® automáticamente llevará a cabo la lectura y emitirá un informe de resultados.



## 8. RESULTADOS

El análisis de resultados y la emisión del informe correspondiente serán llevados a cabo de manera automática por el equipo CAR®.

Este kit está diseñado para que se puedan analizar de manera independiente las translocaciones de ALK (Mix 1, tubo azul) y las translocaciones de ROS.1 (Mix 2, tubo blanco) de manera que los resultados se generan de forma independiente para cada Mix. No obstante, si una muestra es analizada con ambos tubos, se deben visualizar los resultados de ambas amplificaciones en el mismo pocillo del CS.

Se debe incluir un control negativo para comprobar que las muestras no hayan sufrido contaminaciones durante los procesos de extracción, amplificación o visualización, lo cual daría lugar a un falso positivo.

Los tubos de amplificación llevan su propio control de amplificación y de extracción para asegurar que hay suficiente material genómico para realizar la prueba y poder ser analizados de manera independiente.

**El control de extracción de ARN genómico es necesario para la confirmación de un verdadero resultado negativo**, ya que nos informa de la presencia de ARN del paciente en la muestra, aunque no haya habido amplificación de ninguna mutación.

**El control interno de amplificación** nos permitirá distinguir entre los casos de inhibición de la reacción de PCR o Mix no analizada, y aquéllos en los que no se encontró ARN en la muestra.

En la Tabla 1, a continuación, se recogen posibles resultados a obtener, así como las interpretaciones y soluciones correspondientes:

Resultado	Explicación	Solución: Repetir...
NO ARN	<ul style="list-style-type: none"><li>Extracción no válida: La presencia de inhibidores o un fallo en la extracción de la muestra, no permite la amplificación de las translocaciones y/o de los controles de amplificación y de extracción</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>...todo el proceso</li></ul>
PCR INHIBIDA/ NO ANALIZADA	<ul style="list-style-type: none"><li>Amplificación no válida: La ausencia de amplificación en uno de los tubos y presencia de amplificación en el otro tubo, indicará que se ha realizado una correcta extracción pero que ha habido un fallo en la amplificación del primero de ellos</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>...amplificación del tubo correspondiente, y continuación con etapas subsiguientes</li></ul>

NO- CONCLUYENTE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réplicas de una sonda muy distintas entre sí.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ...amplificación y etapas subsiguientes</li> </ul>
--------------------	---	---

Tabla 1.

## 9. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS Y DE FUNCIONAMIENTO

### 9.1. Control de interferencias conocidas

Uno de los inconvenientes de la detección por amplificación genómica son los falsos negativos debidos a una calidad inadecuada del ARN extraído (por insuficiente cantidad de muestra, degradación del ARN, almacenaje incorrecto o pérdida de ARN durante la extracción), o a la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en las muestras a procesar (alcohol, sales, etc.).

Para evitar estas interferencias deben seguirse las indicaciones que aparecen en las secciones 5, 6 y 7 de este Manual.

### 9.2. Especificaciones técnicas

#### 9.2.1. Parámetros analíticos

Sensibilidad analítica.

La sensibilidad analítica se ha determinado mediante la amplificación de diluciones seriadas de ADN de plásmidos recombinantes para cada una de las mutaciones que detecta el kit. La visualización se realizó en CS. Los resultados se muestran a continuación:

<b>TRANSLOCACIÓN</b>	<b>Copias/5 µl</b>
ALK-ELM4 Variante V1	10
ALK-EML4 Variante V6	10
ALK-EML4 Variante V3a	10
ALK-EML4 Variante V3b	10
ALK-EML4 Variante V5a	10
ALK-EML4 Variante V5b	10
ALK-EML4 variante V2	10e2

SDC4-ROS1 exon 32	10
SDC4-ROS1 exon 34	10
CD74-ROS exon 34	10
SLC34A2-ROS exon 32	10
SLC34A2-ROS exon 34	10

Tabla 2. Relación del número de copias de plásmido recombinante necesarias para obtener una sensibilidad del 100% en la detección de cada una de las translocaciones.

#### Especificidad Analítica.

Se llevaron a cabo experimentos de especificidad con plásmidos recombinantes y líneas celulares sin translocación, observándose que no se produce detección inespecífica. Por tanto, se considera que la técnica alcanza una especificidad analítica del 100% a concentración límite.

#### 9.2.2. Parámetros de utilidad diagnóstica

Para determinar los parámetros diagnósticos del kit, se realizó una evaluación comparativa del kit **CLART® CMA ALK·ROS1** con la técnica de referencia (HI/FISH) En total se analizaron 115 muestras, de las cuales 101 fueron analizadas en GENOMICA con muestras procedentes de distintos centros colaboradores:

- Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, España: 12 muestras.
- Hospital Universitario de Santiago, España: 24 muestras.
- Panel EQUA 2015/2016: 13 muestras.
- Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España: 7 muestras.

Además se ha colaborado con el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, en el que se han analizado 19 muestras. 5 de ellas habían sido ya previamente analizadas en GENOMICA, por lo que se han descontado del cómputo final, resultando ser 14 el número final de muestras analizadas.

En el 91.3% de las muestras (105/115) el rendimiento en la extracción de ARN fue > 10 ng/μl, por lo que se añadieron los 100 ng/tubo RT-PCR recomendados. En el 8.7 % de las muestras (10/115) el rendimiento en la extracción de ARN fue < 10 ng/μl, por lo que se añadieron menos de los 100 ng/Tubo PCR recomendados.

Los resultados obtenidos del análisis de las 115 muestras se detallan en la Tabla 3:

N: 115	VP	FP	VN	FN	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)
ALK V1 (n:11)	10	0	104	1*	90.9	100
ALK V6 (n:0)	0	0	115	0	ND	100
ALK V3a (n:2)	2	1**	113	0	100	99.1
ALK V3b (n:0)	0	0	115	0	ND	100
ALK V3a+V3b (n:11)	11***	1**	103	0	100	99
ALK V5a (n:2)	2	0	113	0	100	100
ALK V5b (n:0)	0	0	115	0	ND	100
ALK V2 (n:3)	3	0	112	0	100	100
ROS SDC4.1 + SDC4.2 (n:1)	1****	0	114	0	100	100
ROS SDC4.1 + CD74 (n:1)	0	0	114	1*	ND	100
ROS CD74 (n:1)	1	0	114	0	100	100
ROS SLC.1 (n:0)	0	0	115	0	ND	100
ROS SLC.2 (n:0)	0	0	115	0	ND	100
ALK V3b + ROS SDC4.1 (n:1)	1	0	114	0	100	100

\*Muestra con < 10 ng/tubo. Por debajo de 100 ng/tubo recomendados

\*\*Muestras analizadas en reproducibilidad/repetibilidad en las que 1/5 veces dio FP.

\*\*\*En 1 de 12 muestras no se detecta V3a; En 3 de 11 muestras no se detecta V3b.

\*\*\*\*En 1 de 5 muestras no se detecta SDC4. no se detecta SDC4.1

Tabla 3. Sensibilidad y Especificidad diagnósticas de la técnica *CLART*<sup>®</sup> *CMA ALK·ROS1* para cada translocación. VPP: Valor Predictivo Positivo (VP/VP+FP). VPN: Valor Predictivo Negativo (VN/VN+FN). Sensibilidad: VP/VP+FN. Especificidad: VN/VN+FP. VP: Verdadero positivo. FN: Falso negativo. FP: Falso positivo. VN: Verdadero negativo. ND: No valorable, no hay datos suficientes.

Para cada muestra se asume como verdadero el resultado concordante entre la técnica de referencia y *CLART*<sup>®</sup> *CMA ALK·ROS1*. En el caso de existir discordancias entre ambas técnicas, se considera como verdadero el resultado obtenido de la secuenciación de la muestra por Next Generation Sequencing (NGS): Panel Oncomide Solid Tumor Fusion, análisis con AmpliSeq RNA Lung Fusion single sample v5.2 (Ion Torrent, ThermoFisher).

#### Repetibilidad y reproducibilidad diagnóstica.

La repetibilidad y reproducibilidad diagnósticas se han obtenido procesando las muestras desde el extraído de la biopsia hasta la visualización en el array del material amplificado. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

	% homología
Repetibilidad (n=22)	92.5
Reproducibilidad (n=23)	94.3

Tabla 4. Repetibilidad y reproducibilidad diagnóstica del kit *CLART*<sup>®</sup> *CMA ALK·ROS1*.

## 10. REFERENCIAS

*“PLX4032, a selective BRAF (V600E) kinase inhibitor, activates the ERK pathway and enhances cell migration and proliferation of BRAF melanoma cells”.*

Halaban R, Zhang W, Bacchiocchi A, Cheng E, Parisi F, Ariyan S, Krauthammer M, McCusker JP, Kluger Y, Sznol M.

Pigment Cell Melanoma Res. 2010 Apr;23(2):190-200. doi: 10.1111/j.1755-148X.2010.00685.x. Epub 2010 Feb 10.

*“Advances in personalized targeted treatment of metastatic melanoma and non-invasive tumor monitoring”.*

Klinac D, Gray ES, Millward M, Ziman M.

Front Oncol. 2013 Mar 19;3:54. doi: 10.3389/fonc.2013.00054. eCollection 2013.

*“Effects of AKT inhibitor therapy in response and resistance to BRAF inhibition in melanoma”.*

Lassen A, Atefi M, Robert L, Wong DJ, Cerniglia M, Comin-Anduix B, Ribas A.

Mol Cancer. 2014 Apr 16;13:83. doi: 10.1186/1476-4598-13-83.

*“Detection of BRAF V600 mutations in melanoma: evaluation of concordance between the Cobas® 4800 BRAF V600 mutation test and the methods used in French National Cancer Institute (INCa) platforms in a real-life setting”.*

Mourah S, Denis MG, Narducci FE, Solassol J, Merlin JL, Sabourin JC, Scoazec JY, Ouafik L, Emile JF, Heller R, Souvignet C, Bergougnoux L, Merlio JP.

PLoS One. 2015 Mar 19;10(3):e0120232. doi: 10.1371/journal.pone.0120232. eCollection 2015.

*“Recomendaciones para la determinación de biomarcadores en el melanoma metastásico. Consenso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica y de la Sociedad Española de Oncología Médica”.*

José Luis Rodríguez-Peralto, Enrique Espinosa, Juan José Ríos-Martín, Alfonso Berrocal, María Dolores Lozano, Ana Arance, Angel Santos-Briz, José Antonio López-Martín, María Teresa Fernández-Figueras y Salvador Martín-Algarra.

Rev Esp Patol. 2014;47(1):9-21.

*“Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma”.*

Trunzer K, Pavlick AC, Schuchter L, Gonzalez R, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Kim KB, Weber JS, Hersey P, Long GV, Lawrence D, Ott PA, Amaravadi RK, Lewis KD, Puzanov I, Lo RS, Koehler A, Kockx M, Spleiss O, Schell-Steven A, Gilbert HN, Cockey L, Bollag G, Lee RJ, Joe AK, Sosman JA, Ribas A.

J Clin Oncol. 2013 May 10;31(14):1767-74. doi: 10.1200/JCO.2012.44.7888. Epub 2013 Apr 8.