

TESIS DOCTORAL

Alejandra Olmo Sirvent

2020



VNIVERSITAT [Q̄ ʌ]
ID VALÈNCIA [Q̄ ʌ]
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Fisiología
Programa de Doctorado de Fisiología

Estudio del papel de la EMT y las vías de control inmunológico en las micrometástasis moleculares detectadas en ganglio centinela de pacientes con carcinoma broncopulmonar en estadio temprano.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Alejandra Olmo Sirvent

Dirigida por:
Dr. José Marcelo Galbis Caravajal
Dra. Miriam Estors Guerrero
Dra. Aránzazu Lafuente Sanchís

Tutor:
Dr. Julián Carretero Asunción

Valencia, septiembre 2020



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA [Logo with a stylized figure and a cross]
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Fisiología

ÁPrograma de Doctorado de Fisiología

Estudio del papel de la EMT y las vías de control inmunológico en las micrometástasis moleculares detectadas en ganglio centinela de pacientes con carcinoma broncopulmonar en estadio temprano.

Trabajo original presentado para optar al grado de Doctora por la
Universitat de València

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Alejandra Olmo Sirvent

Dirigida por:

Dr. José Marcelo Galbis Caravajal

Dra. Miriam Estors Guerrero

Dra. Ari nzazu Lafuente Sanchís

Tutor:

Dr. Julián Carretero Asunción

Valencia, septiembre 2020

JOSÉ MARCELO GALBIS CARAVAJAL, Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia, Jefe de Servicio de Cirugía Torácica, Coordinador del Área de Respiratorio y Presidente del Comité de Investigación del Hospital Universitario de La Ribera (Valencia)

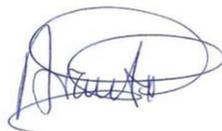
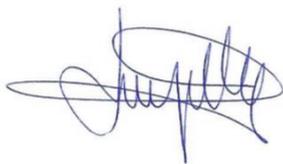
MIRIAM ESTORS GUERRERO, Doctora en Medicina y Cirugía por la Universidad Católica de Valencia, Facultativo especialista de Cirugía Torácica en Hospital Universitario de La Ribera (Valencia)

ARANZAZU LAFUENTE SANCHIS, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia y miembro del laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario de La Ribera (Valencia)

CERTIFICAN

Que la presente memoria de investigación titulada “Estudio del papel de la EMT y las vías de control inmunológico en las micrometástasis moleculares detectadas en ganglio centinela de pacientes con carcinoma broncopulmonar en estadio temprano” realizada por **Alejandra Olmo Sirvent** bajo nuestra supervisión, reúne los requisitos para su presentación y defensa en forma de Tesis Doctoral ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos firmamos la presente en Valencia, a 20 de septiembre de 2020.



Dr José Marcelo Galbis

Dra Miriam Estors

Dra Aránzazu Lafuente

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

A mis directores de tesis: Dra. Arantxa Lafuente, Dra. Miriam Estors y Dr. José Marcelo Galbis por dejarme formar parte de su equipo y hacerme todo más fácil durante estos años.

A Julián Carretero, mi tutor, por hacer esto posible, por su dedicación y apoyo.

A M^aIsabel Blanch, por su actitud y facilitarme todas las gestiones administrativas a lo largo de estos años

A María Cuenca, por su colaboración y ayuda.

A todo el servicio de Cirugía torácica del Hospital de la Ribera, porque sin su colaboración desinteresada esta tesis no hubiera sido posible.

Al maldito coronavirus, que entre confinamiento y cuarentena me ayudaste a terminar de escribir.

A mis compañeras de consulta que enderezan los renglones torcidos.

A mi *abcde*, Irene, por acompañarme y seguir acompañándome cada día.

A mi abuelo Juan, por haber amado la medicina y enseñarme amarla. Por ser el médico de mi vida.

A mi hermana, Natalia, por estar siempre ahí, para reír, discutir, cantar o llorar. Por hacerme uno de los mejores regalos, garbancitq.

A mis padres, que lo son todo. Por enseñarme que con humildad y esfuerzo se consigue lo que uno se propone. Gracias a vosotros, soy lo que soy.

A mi esposo, Jose. Por aguantarme, quererme y hacer todo más fácil. Gracias porque sin ti nada de esto hubiese sido realidad. Eres mi vida.

Gracias a los que formáis parte de mi vida, me impulsáis a ser mejor y me ayudáis a seguir hacia adelante y me habéis enseñado a hacer mío el lema: *“La mujer que no avanza, retrocede”*.

RESUMEN TESIS DOCTORAL

Palabras clave: micrometástasis moleculares; control inmunológico; transición epitelio mesenquimal; cáncer pulmonar

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el uso de técnicas de biología molecular para mejorar el diagnóstico y conocer mejor la etiología del CP (cáncer pulmonar), debido a que la posibilidad de padecerlo ha sido definida como la interrelación entre la exposición a carcinógenos ambientales y la susceptibilidad individual determinada genéticamente (D'Amico *et al.*, 1999). Dicha susceptibilidad genética es la que resulta determinante para entender por qué, siendo el tabaco responsable de más del 90% de los CP en el hombre y del 80% en la mujer, sólo un 11-12% de los fumadores desarrollan un cáncer (Kratz *et al.*, 2012). Sin embargo, comprender qué factores genéticos determinan una mayor propensión a desarrollar un CP es una tarea compleja. Estudios previos han mostrado que el riesgo genético está determinado por numerosos polimorfismos, cada uno de ellos de baja penetrancia (estimada en un 1% de la población general). Cuando varios de estos polimorfismos coinciden en un individuo concreto definen el riesgo cuantitativo, aunque siempre en relación con la dosis de exposición a los carcinógenos (Wheatley-Price *et al.*, 2008).

Además, por el momento tampoco se conoce bien el agrupamiento genético que pueda definir el riesgo de cada tipo de CP (Mok *et al.*, 2009).

Existen diversos factores pronósticos, sobre todo de tipo morfológico y molecular, que pueden condicionar la supervivencia de las distintas formas de cáncer y que no se tienen en cuenta en la clasificación TNM. En el CP la utilidad del sistema TNM también ha sido cuestionada, ya que no logra configurar grupos de pacientes con un pronóstico homogéneo, sobre todo en estadios precoces.

La afectación metastásica a nivel ganglionar es el principal factor pronóstico en el carcinoma pulmonar localizado, habiéndose relacionado recientemente la activación aberrante de la transición epitelio - mesenquimal (EMT) con la conversión de un carcinoma no invasivo en un tumor de características metastásicas y de mal pronóstico.

De hecho la EMT ha sido establecido como uno de los principales factores en la progresión del cáncer, la diseminación linfática y la aparición de metástasis. Durante este proceso, las células pierden la expresión de marcadores epiteliales (como E-Cadherina) e incrementa la expresión de marcadores mesenquimales (como Vimentina o N-Cadherina).

Dado que la micrometástasis por sí solas no se relacionan con el pronóstico pero si que muestran un 20% de recidivas, el análisis de las vías de EMT y sobretodo del papel del sistema inmune nos podría ayudar a diferenciar esas micrometástasis que van a progresar de las que no lo van a hacer.

Una evaluación de la expresión de los marcadores de EMT en las micrometástasis moleculares localizadas en el ganglio centinela de pacientes con carcinoma pulmonar permitiría avanzar en el conocimiento de los procesos moleculares implicados en la metástasis durante la enfermedad. Por otro lado, un estudio paralelo de los niveles de expresión de los marcadores de las diferentes vías de control inmunológico y de las células inmunitarias infiltradas en el tejido tumoral pulmonar y en ganglio centinela de estos pacientes contribuiría a obtener información sobre nuevas dianas moleculares susceptibles de ser bloqueadas mediante inmunoterapia.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el estudio se incluyeron pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) para los cuales se programó cirugía para su tratamiento. Como paso preoperatorio, se realizó una estadificación rutinaria. Durante la cirugía se realizó un muestreo sistemático de los ganglios linfáticos en todos los pacientes. Tras la resección pulmonar, las muestras quirúrgicas (tumor primario y ganglios linfáticos) fueron evaluadas inmediatamente por un patólogo y se llevó a cabo la clasificación histopatológica de rutina y la estadificación patológica

del tumor de acuerdo con las Revisiones en el Sistema Internacional para la Estadificación del Cáncer de Pulmón (Hsu *et al.*, 2009).

Se diseñó un estudio observacional longitudinal prospectivo no probabilístico de tipo consecutivo de entre aquellos sujetos que cumplían los criterios de inclusión.

Para analizar las variables como categóricas, los valores de expresión génica en tumor se clasificaron, en comparación con los tejidos normales adyacentes, como altos (>1) o bajos (<1). Para determinar la relación epitelio/mesénquima de las muestras, se calcularon las relaciones *CDH1/CDH2* y *CDH1/VIM*.

El coeficiente de correlación de Spearman (r) se utilizó para medir las correlaciones entre los niveles de expresión génica en los tejidos tumorales y el ganglio centinela. Para analizar la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia general (SG) se usó la prueba de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

Atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión el estudio se llevó a cabo en un total de 101 pacientes.

El 56,44% de los pacientes eran mayores de 65 años y el grupo más frecuente fue el de los hombres (80,20%). Además, la mayoría de los casos presentaron un adenocarcinoma (61,39%) en estadio I (70,30%), con grado de diferenciación I (39,60%).

Para estudiar la presencia de micrometástasis moleculares en el GC (ganglio centinela) analizamos la expresión de tres marcadores: *CK7*, *CEACAM5* y *BPIFA1*. En nuestra serie de pacientes, solo pudimos realizar la determinación molecular en 96 (95,05%) de ellos. De todos ellos, 60 (62,50%) presentaron presencia de micrometástasis molecular en GC.

Por otra parte, calculamos las ratios *CDH1/CDH2* y *CDH1/VIM*, con el objetivo de determinar si el fenotipo era más epitelial o mesenquimal.

En nuestra serie de pacientes, observamos una menor SG de aquellos que presentaron un resultado positivo de micrometástasis determinada por IHQ ($p=0,023$). Cuando analizamos la SLE, no observamos diferencias significativas en función de la micrometástasis ($p>0,05$).

Por otra parte, también determinamos la presencia de micrometástasis en GC mediante IHQ, detectando la expresión de CK7 a nivel proteico en secciones de muestras incluidas en parafina.

Es importante destacar que el 54% de las muestras con resultado negativo mediante IHQ resultaron ser positivas mediante qPCR, lo que podría explicarse por la mayor sensibilidad de la PCR respecto a la IHQ. Por el contrario, el 40% de muestras positivas por IHQ obtuvo un resultado negativo mediante qPCR, probablemente

atribuible a la falta de células que expresan dicho marcador en la muestra de GC a analizar.

Tampoco podemos obviar que, a pesar de las diferencias entre las dos técnicas, observamos que la presencia micrometástasis detectada por qPCR no influye en la supervivencia de los pacientes.

En nuestro trabajo no encontramos diferencias en la expresión de marcadores de EMT entre los tumores de los pacientes con micrometástasis en GC detectada mediante qPCR y los que no la presentaban. Del mismo modo, no encontramos diferencias en la expresión de CDH1 y CDH2 en tumores primarios con micrometástasis detectada por IHQ, aunque sí observamos una mayor expresión de SNAI1, VIM, ZEB1 y ZEB2.

Por otra parte, en el análisis del estado molecular de la EMT del GC, observamos que la micrometástasis por qPCR e IHQ se relacionó con una alta expresión de CDH2 y un mayor número de pacientes con alta expresión de VIM.

En cuanto al valor pronóstico, el análisis de supervivencia mostró un peor pronóstico en los pacientes con una baja ratio CDH1/CDH2 en GC (tanto SLE como SG).

DISCUSIÓN

Con todo, nuestros datos sugieren que la expresión de marcadores de EMT en GC se podría utilizar para mejorar la clasificación de los pacientes y predecir un pronóstico para los pacientes en estadio temprano de CP. Este análisis complementaría la evaluación histopatológica para estudiar la micrometástasis mediante métodos moleculares con mayor profundidad y así detectar aquellos pacientes de CP en estadio temprano que recaen pero que no son detectados mediante los análisis histopatológicos rutinarios.

Por esto, pensamos que el estudio de la expresión de los marcadores de las diferentes vías de control inmunológico en el tumor y GC de los pacientes podría contribuir a identificar nuevas dianas susceptibles de ser bloqueadas mediante inmunoterapia. Además, la relación de la expresión de estos marcadores con las características clínico-patológicas de los pacientes podría ofrecer una mejor clasificación de la enfermedad y una mejora en la elección del tratamiento.

En un primer análisis de los marcadores del sistema inmunitario en tejido tumoral, encontramos que alrededor del 60% de los pacientes mostraron una alta expresión de CD137 y GITR, mientras que menos del 20% mostraron una alta expresión de PD-1 y PD-L1. De todos los marcadores estudiados, únicamente CD27 y

CD137 aparecieron en mayor frecuencia en los pacientes con micrometástasis positiva por qPCR.

Por otra parte, el estudio mostró valores más altos de expresión de los marcadores CD27, CD28 y CD40 en los tumores de pacientes con un resultado positivo de micrometástasis por qPCR.

La señalización mediante CD27 tiene un papel inmunitario importante y se podría usar como terapia antitumoral ya que se ha visto que linfocitos infiltrados en el tumor sólido expresan CD27 (Starzer y Berghoff, 2020).

El análisis de supervivencia mostró una menor SG de los pacientes con baja expresión de CD27 en tejido tumoral. Además, aquellos con una alta expresión de KIR, PD-1 y PD-L1 también mostraron menor supervivencia, en este caso SLE.

En cuanto al GC, observamos que un mayor número de pacientes con micrometástasis positiva por qPCR presentaba una alta expresión de los marcadores CD137 y LAG-3 y en el análisis de expresión de los marcadores del sistema inmunitario observamos que los pacientes con un resultado positivo de micrometástasis por qPCR mostraron mayores niveles de expresión de CD40, KIR, OX-40 y PD-L2.

Como conclusión diremos que el estudio del perfil de expresión de los marcadores del sistema inmunitario nos permite establecer un mejor pronóstico y clasificación del paciente con el objetivo de mejorar el tratamiento con inmunoterapia.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-------|
| Abreviaturas | xxv |
| Listado de tablas y figuras | xxix |
| Listado de tablas | xxxii |
| Listado de figuras | xxxiv |
| Introducción | 1 |
| 1. Epidemiología | 3 |
| 2. Etiología del CP | 12 |
| 3. Histología del CP | 14 |
| 4. Diagnóstico del CP | 19 |
| 4.1 Procedimientos diagnósticos de estadificación no invasivos | 19 |
| 4.2 Procedimientos diagnósticos de estadificación invasivos | 22 |
| 4.3 Evaluación funcional | 24 |
| 5. Factores pronóstico del CP | 27 |
| 6. Estadificación del CP | 31 |
| 7. Biología molecular del CP | 35 |
| 7.1 Principales vías de señalización implicadas en el CP: EGFR, ALK, BRAK/kRAS, ROS | 35 |
| 7.1.1 EGFR | 35 |
| 7.1.2 ALK | 38 |
| 7.1.3 KRAS | 41 |
| 7.1.4 ROS-1 | 42 |
| 7.2 Micrometástasis moleculares en el CP | 43 |
| 7.3 Transición epitelio-mesénquima | 46 |
| 7.3.1 EMT y sistema linfático | 50 |
| 8. Papel del sistema inmunitario en el cáncer | 52 |
| Hipótesis y Objetivos | 57 |

| | |
|---|----|
| Material y métodos | 61 |
| 1. Ámbito y población | 63 |
| 2. Pacientes | 63 |
| 2.1 Criterios de inclusión | 64 |
| 2.2 Criterios de exclusión | 64 |
| 3. Muestras | 65 |
| 4. Diseño del estudio | 66 |
| 4.1 Variables del estudio | 66 |
| 5. Protocolo de actuación y procesamiento de muestras | 68 |
| 5.1 Marcaje del ganglio centinela | 68 |
| 5.2 Recogida de muestras | 68 |
| 5.3 Estudio inmunohistoquímico | 69 |
| 5.4 Análisis molecular | 70 |
| 5.4.1 Extracción de RNA total | 71 |
| 5.4.2 Transcripción reversa | 71 |
| 5.4.3 Análisis de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) | 72 |
| 6. Metodología estadística | 74 |
| 7. Autorización del estudio | 75 |
| Resultados | 77 |
| 1. Características de la serie de pacientes | 79 |
| 1.1 Características clínicas | 79 |
| 1.2 Factores clínicos con valor pronóstico | 80 |
| 1.2.1 Factores clínico-patológicos y SG | 80 |
| 1.2.2 Factores clínico-patológicos y SLE | 83 |
| 2. Presencia de micrometástasis en ganglio centinela | 86 |
| 3. Estudio de la expresión de marcadores de transición de epitelio- mesénquima (EMT) | 88 |

| | |
|--|-----|
| 3.1 Expresión de marcadores EMT en tumor primario comparado con tejido normal | 88 |
| 3.2 Expresión de marcadores de EMT en ganglio centinela | 91 |
| 3.3 Correlación entre marcadores de EMT en tumor primario y GC | 93 |
| 3.4 Correlación entre marcadores de EMT en tumor primario y GC y micrometástasis | 96 |
| 4. Expresión de marcadores de sistema inmunitario | 98 |
| 4.1 Expresión de marcadores de sistema inmunitario en tumor primario | 98 |
| 4.2 Expresión de marcadores de sistema inmunitario en GC | 102 |
| 4.3 Correlación entre marcadores de sistema inmunitario en tumor primario y GC | 106 |
| 4.4 Correlación entre marcadores de sistema inmunitario en tumor primario y GC y micrometástasis | 108 |
| 5. Expresión de los marcadores moleculares según las características clínico-patológicas | 110 |
| 6. Valor pronóstico de los marcadores moleculares | 116 |
| Discusión | 125 |
| 1. Análisis descriptivo de la serie de pacientes | 127 |
| 2. Detección de la micrometástasis en GC | 129 |
| 3. Estudio de la expresión de marcadores de EMT en tumor primario y GC | 131 |
| 4. Estudio de la expresión de marcadores del sistema inmunitario en tumor primario y GC | 135 |
| Conclusiones | 145 |
| Bibliografía | 149 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|---------------------------------------|
| cDNA | DNA copia |
| CP | Cáncer de pulmón |
| CPCP | Carcinoma pulmonar célula pequeña |
| CPCNP | Cáncer de pulmón de célula no pequeña |
| EMT | Transición epitelio - mesénquima |
| GC | Ganglio centinela |
| IHQ | Inmunohistoquímica |
| iTQs | Inhibidor de la tirosín quinasa |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| qPCR | PCR cuantitativa a tiempo real |
| QT | Quimioterapia |
| RT | Radioterapia |
| SG | Supervivencia global |
| SLE | Supervivencia libre de enfermedad |
| TBS | Tampón Tris salino |
| TQ | Tirosín quinasa |

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Listado de tablas

Tabla 1. Número de defunciones en 2018 por tumores malignos en hombres.

Tabla 2. Número de defunciones en 2018 por tumores malignos en mujeres.

Tabla 3. Sistema de clasificación del CP propuesto en 2011 por la IASLC, la ATS y la ERS.

Tabla 4. Estado de actividad, *performance status* (PS) o *Eastern Cooperative Group* (ECOG) que sirve como escala de funcionalidad del paciente oncológico y es factor pronóstico.

Tabla 5. Definición de los descriptores TNM.

Tabla 6. Estadificación del CP basada en los parámetros TNM de la 8ª edición de la AJCC.

Tabla 7. Sondas Taqman utilizadas para la determinación de la expresión génica mediante qPCR.

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 9. Correlación entre todos los marcadores de EMT estudiados entre tumor y GC. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p < 0,05$). Aquellas correlaciones con un valor superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

Tabla 10. Correlación entre todos los marcadores de EMT estudiados entre tumor y GC en pacientes con un resultado positivo

para micrometástasis. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p < 0,05$). Aquellas correlaciones con un valor igual o superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

Tabla 11. Distribución de los pacientes con alta y baja expresión de los marcadores inmunológicos en tejido tumoral.

Tabla 12. Distribución de los pacientes con alta y baja expresión de los marcadores inmunológicos en GC.

Tabla 13. Correlación entre todos los marcadores del sistema inmunitario estudiados entre tumor y GC. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p < 0,05$). Aquellas correlaciones con un valor superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

Tabla 14. Correlación entre todos los marcadores del sistema inmunitario estudiados entre tumor y GC en pacientes con un resultado positivo para micrometástasis. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p < 0,05$). Aquellas correlaciones con un valor igual o superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

Tabla 15. Expresión de los marcadores de EMT en tejido tumoral en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 16. Expresión de los marcadores de EMT en GC en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 17. Expresión de los marcadores del sistema inmunitario en tumor en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 18. Expresión de los marcadores del sistema inmunitario en GC en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 19. Análisis multivariante mediante regresión de Cox de las variables clínicas y los marcadores de EMT y del sistema inmunitario en tumor. HR, *Hazard rate* IC, Intervalo de confianza.

Tabla 20. Análisis multivariante mediante regresión de Cox de las variables clínicas y los marcadores de EMT y del sistema inmunitario en GC. HR, *Hazard rate* IC, Intervalo de confianza.

Listado de figuras

Figura 1. Tasa de incidencia de algunos tipos de cáncer, ajustada por sexo, en EEUU desde 1975 a 2015.

Figura 2. Prevalencia de tabaquismo en mujeres jóvenes en Europa.

Figura 3. Evolución de la tasa mortalidad del CP en hombres y mujeres en la Comunidad Valenciana desde 2005 a 2015.

Figura 4. Clasificación histopatológica del cáncer de pulmón. Se distinguen fundamentalmente el cáncer del pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de células pequeñas.

Figura 5. Estructura y función de EGFR.

Figura 6. Estructura del reordenamiento de EML4-ALK.

Figura 7. Proceso de transición epitelio - mesénquima.

Figura 8. Pasos del proceso metastásico: (a) tumor primario; (b) angiogénesis en el tumor primario; (c) intravasación; (d) migración y extravasación; (e) colonización en nuevo órgano; (f) angiogénesis y crecimiento de la metástasis.

Figura 9. Diagrama que muestra la migración de células tumorales a través del sistema linfático. Las células tumorales, inducidas por TGF- β , llevan a cabo un proceso de EMT que les permite migrar a los nódulos linfáticos.

Figura 10. Curvas de supervivencia global (SG) de la serie de pacientes en función de las características clínicas. En las curvas según el estadio no se pudieron establecer los intervalos de confianza debido a que sólo hay un paciente de estadio IV.

Figura 11. Curvas de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de la serie de pacientes en función de las características clínicas. En las curvas según el estadio no se pudieron establecer los intervalos de confianza debido a que sólo hay un paciente de estadio IV.

Figura 12. Diagrama de circos que muestra la presencia de genes marcadores de micrometástasis en GC en nuestra serie de pacientes (n=96). BPIFA1 siempre se expresa junto con otro marcador.

Figura 13. Distribución de las micrometástasis detectadas en GC mediante inmunohistoquímica (IHQ) y qRT-PCR.

Figura 14. Expresión de los marcadores de EMT en tejido tumoral de pulmón. A. Distribución de la expresión de los marcadores de EMT en tumor de cada paciente. B. Representación de los marcadores de EMT CDH1, CDH2 y VIM en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

Figura 15. Expresión de marcadores de EMT en tumor en función de la micrometástasis detectada por IHQ. Todos los genes con diferencias de expresión significativas (A, VIM; B, SNAI1; C, ZEB1; D, ZEB2) mostraron una mayor expresión en los pacientes con un resultado negativo de para la micrometástasis detectada por IHQ. MM IHQ: micrometástasis detectada mediante IHQ.

Figura 16. Expresión de los marcadores de EMT en GC. A. Distribución de la expresión de los marcadores de EMT en GC de cada paciente. B. Representación de los marcadores CDH1, CDH2 y VIM en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

Figura 17. Expresión de marcadores de EMT en GC en función de la micrometástasis. A. Expresión del gen CDH2 en GC según la

presencia de micrometástasis detectada por qPCR. B. Expresión del gen TWIST en GC según la presencia de micrometástasis detectada por IHQ. MM qPCR: micrometástasis determinada por qPCR, MM IHQ: micrometástasis detectada mediante IHQ.

Figura 18. Expresión de los marcadores inmunológicos en tumor. A. Distribución de la expresión de los marcadores de inmunológicos en tumor de cada paciente. B. Representación de los mismos marcadores en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

Figura 19. Expresión de marcadores inmunológicos en tumor en función de la micrometástasis. Todos los marcadores con diferencias de expresión significativas en micrometástasis positivas por qPCR (A, CD27; C, CD28; D, CD40) mostraron una mayor expresión. A su vez CD27 mostró una mayor expresión en los pacientes con un resultado negativo de para la micrometástasis detectada por IHQ (B). MM qPCR: micrometástasis determinada por qPCR, MM IHQ: micrometástasis detectada mediante IHQ.

Figura 20. Expresión de los marcadores inmunológicos en GC. A. Representación de la expresión de los marcadores de inmunológicos en tumor de cada paciente. B. Distribución de los mismos marcadores en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

Figura 21. Expresión de marcadores del sistema inmunitario en GC en función de la micrometástasis detectada por qPCR. Todos los marcadores con diferencias de expresión significativas (A, CD40; B, KIR; C, PD-L2; D, OX-40) mostraron una mayor expresión en los

pacientes con micrometástasis positivas por qPCR. MM qPCR: micrometástasis determinada por qPCR.

Figura 22. Curvas de SG y SLE de la serie de pacientes en función de la micrometástasis determinada por IHQ (A, C) o qPCR (B, D).

Figura 23. Curva de SG (A) y SLE (B) de la serie de pacientes en función de la ratio CDH1/CDH2 y de la SG en función expresión de VIM (C) y ZEB1 (D) en el GC.

Figura 24. Curvas de SG y SLE de la serie de pacientes en función de los marcadores del sistema inmunitario en tumor. A. SG según la expresión de CD27. B. SG según la expresión de KIR. C. SLE según la expresión de PD-1. D. SLE según la expresión de PD-L1.

Figura 25. Curvas de SG y SLE de la serie de pacientes en función de los marcadores del sistema inmunitario en GC. SG (A) y SLE (B) según la expresión de TIM-3. SLE según la expresión de CD40 (C), CTLA-4 (D), LAG-3 (E) y PD-L2 (F) en GC.

INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología

El cáncer de pulmón (CP) continúa siendo la primera causa de muerte relacionada con el cáncer en el mundo (Parkin *et al.*, 2005; Alberg *et al.*, 2007; Siegel *et al.*, 2019) y, junto con la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), es una de las enfermedades, de origen respiratorio, que ocasionan mayor mortalidad (Loganathan *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2009). En los últimos años se vienen registrando algunos cambios en ciertos aspectos epidemiológicos básicos, como la distribución por edad y sexo o las estirpes histológicas.

En EEUU, el CP es el segundo tumor más frecuente (solo por detrás del cáncer de mama), estimándose para el año 2019 228.150 nuevos casos, y siendo la principal causa de muerte por patología maligna con una previsión de 142.670 muertes (Siegel *et al.*, 2019). A pesar de que su incidencia continúa de forma ascendente en los países subdesarrollados, es a partir de 1990, cuando comienza a observarse en los países desarrollados una disminución de la misma en los varones. En cuanto a la mujer, se aprecia un incremento progresivo en todas las poblaciones geográficas estudiadas (Levi *et al.*, 2007). Consecuencia de lo anteriormente apuntado, la relación

hombre/mujer cada vez se acerca más a la unidad (Siegel *et al.*, 2019) (Figura 1).

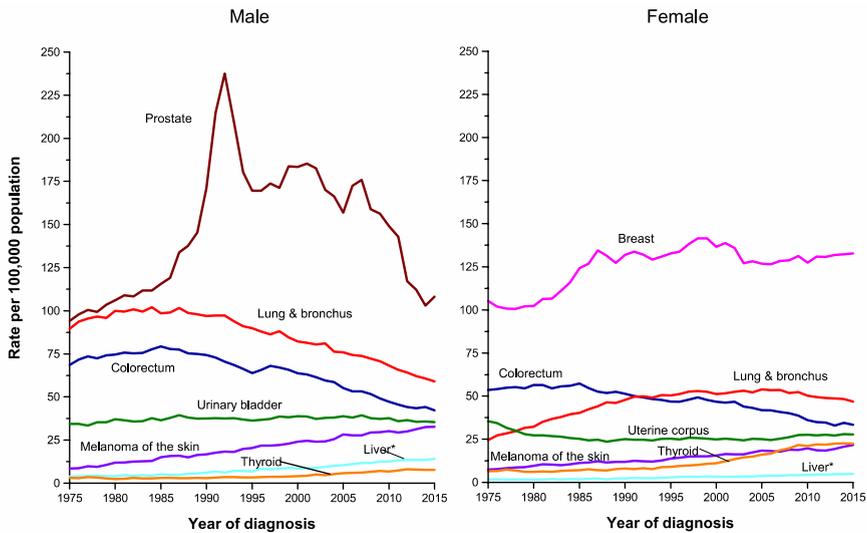


Figura 1. Tasa de incidencia de algunos tipos de cáncer, ajustada por sexo, en EEUU desde 1975 a 2015. Tomado de Siegel *et al.*, 2019.

En España se desconoce la incidencia real de esta patología, por lo que la mortalidad es el único indicador de frecuencia de enfermedad disponible. Para algunos tumores malignos, como en el caso del CP, debido a su elevada letalidad, la tasa de mortalidad es un buen indicador de su incidencia (Cabanés *et al.*, 2009). La edad del diagnóstico ha aumentado en los últimos años de modo que la mayoría de los pacientes diagnosticados con CP (51%) son mayores

de 70 años (Sánchez de Cos *et al.*, 2006). Este incremento se debe a un aumento en la esperanza de vida, lo que conlleva una mayor comorbilidad asociada cuando el CP es diagnosticado.

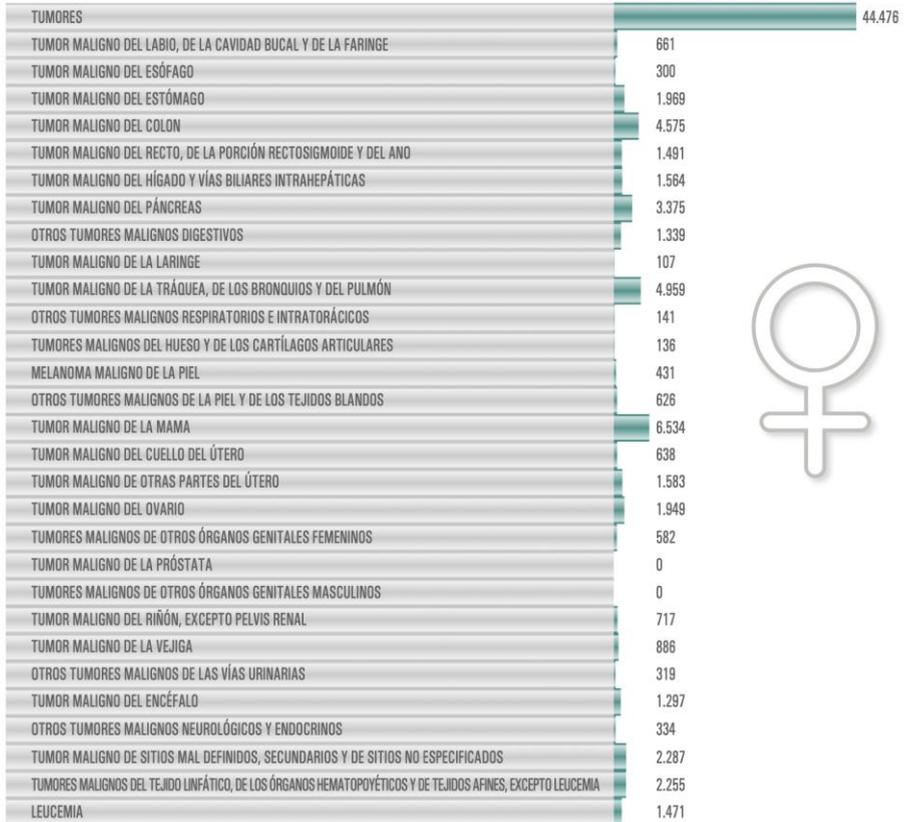
En términos de mortalidad absoluta, los tumores más importantes en los hombres fueron el CP, el cáncer colorrectal y el de próstata, con 17.181, 6.690 y 5.841 muertes, respectivamente en el año 2018; y en las mujeres el cáncer de mama, el CP y el colorrectal, con 6.534, 4.952 y 4.575 muertes, respectivamente (Tablas 1 y 2) (SEOM 2020).

Tabla 1. Número de defunciones en 2018 por tumores malignos en hombres. Tomado de Las cifras del cáncer en España (SEOM 2020).

| | |
|---|--------|
| TUMORES | 68.238 |
| TUMOR MALIGNO DEL LABIO, DE LA CAVIDAD BUCAL Y DE LA FARINGE | 1.749 |
| TUMOR MALIGNO DEL ESÓFAGO | 1.524 |
| TUMOR MALIGNO DEL ESTÓMAGO | 3.084 |
| TUMOR MALIGNO DEL COLON | 6.690 |
| TUMOR MALIGNO DEL RECTO, DE LA PORCIÓN RECTOSIGMOIDE Y DEL ANO | 2.532 |
| TUMOR MALIGNO DEL HÍGADO Y VÍAS BILIARES INTRAHEPÁTICAS | 3.577 |
| TUMOR MALIGNO DEL PÁNCREAS | 3.745 |
| OTROS TUMORES MALIGNOS DIGESTIVOS | 1.231 |
| TUMOR MALIGNO DE LA LARINGE | 1.154 |
| TUMOR MALIGNO DE LA TRÁQUEA, DE LOS BRONQUIOS Y DEL PULMÓN | 17.194 |
| OTROS TUMORES MALIGNOS RESPIRATORIOS E INTRATORÁCICOS | 344 |
| TUMORES MALIGNOS DEL HUESO Y DE LOS CARTÍLAGOS ARTICULARES | 191 |
| MELANOMA MALIGNO DE LA PIEL | 551 |
| OTROS TUMORES MALIGNOS DE LA PIEL Y DE LOS TEJIDOS BLANDOS | 926 |
| TUMOR MALIGNO DE LA MAMA | 87 |
| TUMOR MALIGNO DEL CUELLO DEL ÚTERO | 0 |
| TUMOR MALIGNO DE OTRAS PARTES DEL ÚTERO | 0 |
| TUMOR MALIGNO DEL OVARIO | 0 |
| TUMORES MALIGNOS DE OTROS ÓRGANOS GENITALES FEMENINOS | 0 |
| TUMOR MALIGNO DE LA PRÓSTATA | 5.841 |
| TUMORES MALIGNOS DE OTROS ÓRGANOS GENITALES MASCULINOS | 203 |
| TUMOR MALIGNO DEL RIÑÓN, EXCEPTO PELVIS RENAL | 1.414 |
| TUMOR MALIGNO DE LA VEJIGA | 3.514 |
| OTROS TUMORES MALIGNOS DE LAS VÍAS URINARIAS | 1.207 |
| TUMOR MALIGNO DEL ENCÉFALO | 1.727 |
| OTROS TUMORES MALIGNOS NEUROLÓGICOS Y ENDOCRINOS | 234 |
| TUMOR MALIGNO DE SITIOS MAL DEFINIDOS, SECUNDARIOS Y DE SITIOS NO ESPECIFICADOS | 2.670 |
| TUMORES MALIGNOS DEL TEJIDO LINFÁTICO, DE LOS ÓRGANOS HEMATOPOYÉTICOS Y DE TEJIDOS AFINES, EXCEPTO LEUCEMIA | 2.699 |
| LEUCEMIA | 1.912 |
| TUMORES IN SITU | 3 |
| TUMORES BENIGNOS | 264 |
| SÍNDROME MIELODISPLÁSICO | 656 |
| OTROS TUMORES DE COMPORTAMIENTO INCIERTO O DESCONOCIDO | 1.315 |



Tabla 2. Número de defunciones en 2018 por tumores malignos en mujeres. Tomado de Las cifras del cáncer en España (SEOM 2020).



Introducción

La tendencia en cuanto a la mortalidad por CP es distinta según el género, en clara relación con cambios en el hábito tabáquico. En los hombres, la tasa de mortalidad por CP detectó tres periodos estadísticamente significativos: de 1975 a 1988 la mortalidad aumentó un 3,5% anualmente, de 1988 a 1994 siguió creciendo moderadamente un 1,7% al año y de 1994 a 2006 empezó su descenso, un 0,7% por año. Es importante señalar que en la última década la mortalidad global por cáncer en los hombres españoles sufrió un descenso medio anual de un 1,3%, mostrando signos de estabilización (Cabanés *et al.*, 2009). En las mujeres, durante el período comprendido entre los años 1997 y 2006, la mortalidad por cáncer disminuyó significativamente un promedio de 1% al año. Sin embargo, la mortalidad por CP y por otros tipos de cáncer vinculados al consumo de tabaco aumentó significativamente. En el caso de CP el aumento anual fue de 3,12% (Cabanés *et al.*, 2009). Los indicadores relativos a la mortalidad por CP en la mujer registraron incrementos importantes en el periodo 2000-2008, que se reflejan sobre todo en la mortalidad prematura, que ha aumentado un 45,8%, y menos en la tasa global de mortalidad que ha aumentado un 18,6%. Ello traduce que el exceso de mortalidad por este cáncer

sólo afecta a las mujeres jóvenes y no a las mayores, que prácticamente no han fumado. Las estadísticas de las mujeres jóvenes señalan el comienzo de la epidemia de CP entre las mujeres de España (Cabanés *et al.*, 2009). También, y a diferencia de lo observado en EEUU, la pendiente continúa en ascenso, no habiendo alcanzado la meseta de mortalidad (Donington *et al.*, 2006; Cabanés *et al.*, 2009). En este sentido, es importante señalar que, junto con Francia, las perspectivas son pesimistas ya que se estima que en las próximas dos o tres décadas la incidencia de CP aumente en la mujer, pasando de 5/100.000 a 20/100.000 habitantes, en clara consonancia con el incremento del hábito tabáquico en la mujer (Patel JD, 2005; Donington *et al.*, 2006) (Figura 2).

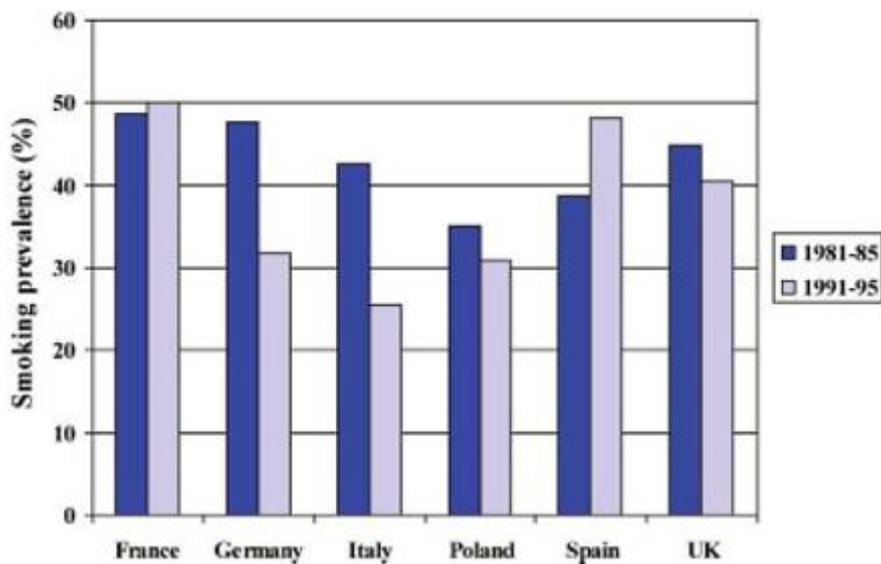


Figura 2. Prevalencia de tabaquismo en mujeres jóvenes en Europa. Tomado de Levi *et al.* 2007.

En nuestro país, la relación hombre/mujer ha descendido significativamente. Así, en el periodo 1988-1992, la proporción de hombres que desarrollaron CP fue 15 veces superior. Diez años más tarde, la razón era de 10/1. Lo mismo ocurre con la mortalidad, la razón hombre/mujer fue de 12 en el año 1996 y de 7,5 en el 2006. Este dato refleja el paulatino abandono de este hábito en los hombres y la incorporación de las mujeres al mismo. Entre 1987 y 2003, el número de mujeres fumadoras aumento en un 7,9%. Esta tendencia se observa asimismo en otros cánceres relacionados con

el tabaco, como es el caso del cáncer laríngeo (Cabanés *et al.*, 2009).

En la Comunidad Valenciana la principal causa de muerte oncológica es el CP con 1.966 casos recogidos en 2015, siendo la tercera causa de muerte en la mujer con 464 casos, tras el carcinoma de mama y colorrectal (Estrategia contra el cáncer CV). En cuanto en la tendencia temporal, se observa que mientras en el hombre existe una cierta estabilización en el número de defunciones a partir del 2004, en la mujer sigue incrementándose, habiéndose casi duplicado en la última década (Plan Oncológico de la Comunidad Valenciana) (Figura 3).

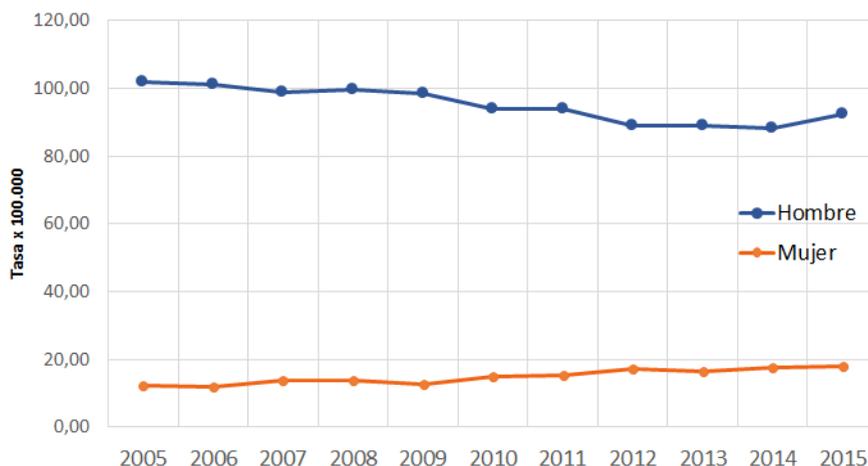


Figura 3. Evolución de la tasa mortalidad del CP en hombres y mujeres en la Comunidad Valenciana desde 2005 a 2015 (Tomada del informe Plan Oncológico de la Comunidad Valenciana).

2. Etiología del CP

El CP es una enfermedad multifactorial, siendo tabaquismo es el principal factor etiológico responsable de su desarrollo. De hecho, en países como Estados Unidos el descenso del hábito tabáquico entre su población se ha acompañado de una disminución en su incidencia y mortalidad (Siegel *et al.*, 2018) . En la mayoría de las series de CP, entre el 10% y el 15% de los pacientes no tienen antecedentes de tabaquismo (Sun *et al.*, 2007). Este hecho ha propiciado que en los últimos años haya un creciente interés por

estudiar otros factores de riesgo de CP tales como el tabaquismo pasivo, la exposición a sustancias empleadas en la industria, minería y construcción (radón residencial, asbesto, níquel, arsénico o cadmio, entre otras), así como las comorbilidades pulmonares previas y los factores genéticos o dietéticos (Duma *et al.*, 2019). De hecho, se ha descrito que la exposición a radón residencial es la segunda causa de CP en fumadores y la primera en nunca fumadores (Vogeltanz-Holm y Schwartz, 2018). Sin embargo, pocas investigaciones han analizado exclusivamente el cáncer de pulmón en nunca fumadores y ninguna ha sido dirigida específicamente a conocer cuál es el efecto de la exposición al radón residencial en estos pacientes.

En los últimos años se ha incrementado el uso de técnicas de biología molecular para mejorar el diagnóstico y conocer mejor la etiología del CP, debido a que la posibilidad de padecer CP ha sido definida como la interrelación entre la exposición a carcinógenos ambientales y la susceptibilidad individual determinada genéticamente (D'Amico *et al.*, 1999). Dicha susceptibilidad genética es la que resulta determinante para entender por qué, siendo el tabaco responsable de más del 90% de los CP en el hombre y del

80% en la mujer, sólo un 11-12% de los fumadores desarrollan un cáncer (Kratz *et al.*, 2012). Sin embargo, comprender qué factores genéticos determinan una mayor propensión a desarrollar un CP es una tarea compleja. Estudios previos han mostrado que el riesgo genético está determinado por numerosos polimorfismos, cada uno de ellos de baja penetrancia (estimada en un 1% de la población general). Cuando varios de estos polimorfismos coinciden en un individuo concreto definen el riesgo cuantitativo, aunque siempre en relación con la dosis de exposición a los carcinógenos (Wheatley-Price *et al.*, 2008). Además, por el momento tampoco se conoce bien el agrupamiento genético que pueda definir el riesgo de cada tipo de CP (Mok *et al.*, 2009).

3. Histología del CP

Se han descrito numerosas formas o tipos histológicos de CP. La clasificación histopatológica más aceptada es la de la OMS, cuya última actualización se llevó a cabo en 2004 (Travis *et al.*, 2015). Desde el punto de vista clínico se distinguen principalmente dos tipos

histológicos: el cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) y el cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP).

El CPCP es un subtipo que se compone de células pequeñas o en avena y representa el 15-20% de todos los cánceres de pulmón. No hay un tratamiento específico y tiene peor pronóstico que el resto de tipos histológicos de CP. Suelen ser tumores centrales y con exposición muy marcada al tabaco como factor etiológico. Por otra parte, el CPCNP es un agregado heterogéneo de diversos tipos histológicos. Entre los más comunes se encuentran el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma indiferenciado de células grandes. Estos tres grupos, que representan el 80-85% de los tumores de pulmón, han sido agrupados en esta misma entidad porque sus métodos de diagnóstico, estadificación, pronóstico y tratamiento han sido similares hasta hace poco tiempo (Figura 4).

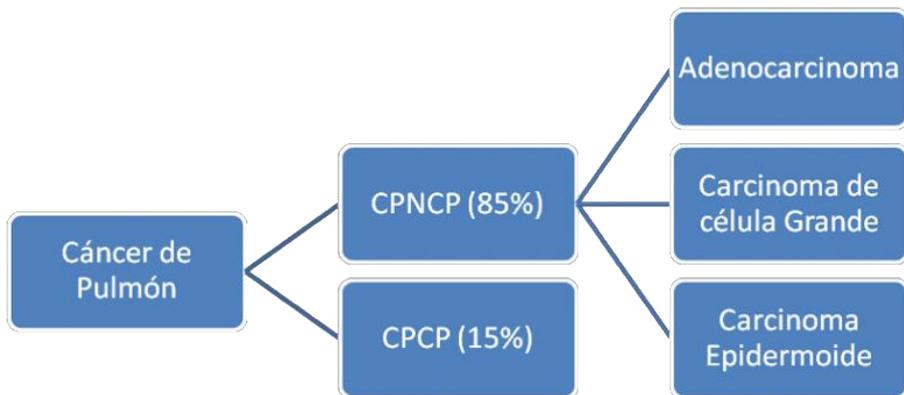


Figura 4. Clasificación histopatológica del cáncer de pulmón. Se distinguen fundamentalmente el cáncer del pulmón de células no pequeñas y el cáncer de pulmón de células pequeñas.

Esta clasificación histológica de los tumores de pulmón se basa en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los Tumores de Pulmón OMS-IASLC 2004, corregida posteriormente en 2015 (Travis *et al.*, 2015). Sin embargo, en 2011, un panel multidisciplinar de expertos en representación de la *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, la *American Thoracic Society (ATS)*, y la *European Respiratory Society (ERS)*, propuso una revisión a fondo del sistema de clasificación (William *et al.*, 2001). Estos cambios afectan principalmente a la clasificación de

adenocarcinoma y su distinción de carcinoma de células escamosas (Tabla 3).

Tabla 3. Sistema de clasificación del CP propuesto en 2011 por la IASLC, la ATS y la ERS.

| IASLC/ ATS/ ERS Clasificación histológica de cáncer de pulmón |
|---|
| Carcinoma de células escamosas Papilar Célula clara Célula pequeña Basaloide |
| Carcinoma de células pequeñas Carcinoma de células pequeñas combinado |

| |
|--|
| Adenocarcinoma Lesiones preinvasivas Hiperplasia adenomatosa atípica Adenocarcinoma in situ (<3 cm anteriormente carcinoma bronquioloalveolar) No mucinoso Mucinoso Mixto mucinoso /no mucinoso Adenocarcinoma mínimamente invasivo (<3cm predominantemente lepidico tumor con <5 mm de invasión) No mucinoso Mucinoso |
|--|

| |
|--|
| Mixto mucinoso /no mucinoso Adenocarcinoma invasivo Predominantemente lepidico (anteriormente BAC con patrón no mucinoso, con >5 mm de invasión) Predominantemente acinar Predominantemente papilar Predominantemenete micropapilar Predominante sólido con producción de mucina Variantes de adenocarcinoma invasivo Adenocarcinoma mucinoso invasivo (anteriormente BAC mucinoso) Coloide Fetal (bajo y alto grado) Entérico |
| Carcinoma de células grandes Carcinoma neuroendocrino de células grandes (CCNEG) CCNEG combinado Carcinoma basaloide Carcinoma de tipo linfoepitelioma Carcinoma de células claras Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoideo |
| Carcinoma adenoescamoso |
| Carcinoma con elementos pleomórficos, sarcomatoideos o sarcomatosos Carcinoma de células fusiformes o gigantes Carcinoma fusiforme Carcinoma de células gigantes Carcinosarcoma Blastoma pulmonar |
| Tumor carcinoide Carcinoide típico |

| |
|--|
| Carcinoide atípico |
| Carcinoma del tipo de glándulas salivales |
| Carcinoide atípico |
| Carcinoma quístico adenoideo |
| Carcinoma quístico adenoideo |
| Carcinoma no clasificado |

4. Diagnóstico del CP

Para un correcto diagnóstico del CP es fundamental una historia clínica detallada que incluya los datos sobre tabaquismo, exposición ocupacional e historia familiar, así como un examen físico completo.

4.1. Procedimientos diagnósticos de estadificación no invasivos

Podemos describir los siguientes procedimientos:

- *Radiografía (Rx) de tórax*: es, habitualmente, la primera prueba que permite sospechar con alta probabilidad la existencia de un CP.

- *Tomografía axial computerizada (TAC) de tórax*: en relación a la detección del tumor primario, es el mejor método para el estudio anatómico global del tórax. Todo paciente con sospecha de CP debe tener realizado una prueba de imagen torácica con TAC con contraste que incluya hasta hígado y glándulas suprarrenales para clasificar el tumor con la clasificación TNM. Por el contrario, los signos radiológicos sugerentes de invasión de estructuras mediastínicas que implicarían irresecabilidad son poco fiables. Para la valoración ganglionar mediastínica en general, se acepta el tamaño de 1 cm en el diámetro más corto como el límite superior de la normalidad, aunque este criterio no es útil para discernir entre ganglios malignos y benignos (Silvestri *et al.*, 2007).

- *Tomografía por emisión de positrones (PET)*: esta modalidad diagnóstica se basa en la mayor actividad metabólica de las células neoplásicas. Aporta información de interés sobre la biología tumoral, pero su capacidad de resolución espacial es menor que la de la TAC. En cuanto al umbral de normalidad para el denominado valor de captación estándar (SUV), cada centro deberá establecer su propio punto de corte. El desarrollo de la PET/TAC, que integra en una única exploración las imágenes de ambos

procedimientos, mejora la eficacia diagnóstica (De Wever *et al.*, 2007; Tournoy *et al.*, 2007). Para la evaluación del mediastino, dicha eficacia es superior a la de la TAC, aunque varía según la estirpe: así, para el adenocarcinoma, el valor predictivo positivo de la PET/TAC es del 50%, y el valor predictivo negativo del 77,8%, mientras que para el carcinoma escamoso dichas cifras son del 23,1% y del 96,3%, respectivamente (Hwangbo *et al.*, 2009). Dada su elevada sensibilidad para detectar metástasis a distancia, los resultados de la PET o de la PET/TAC pueden ser relevantes para modificar el plan terapéutico.

- *Búsqueda de metástasis extra torácicas*: una evaluación clínica cuidadosa continúa siendo el mejor método para la predicción de metástasis. Las pruebas de imagen para el diagnóstico estarán dirigidas por la localización de los síntomas o signos presentes. Así, el dolor óseo justifica la realización de una gammagrafía, que tiene una sensibilidad del 87% y una especificidad del 67% para detectar metástasis óseas (Silvestri *et al.*, 2007), mientras que la PET puede ser de utilidad, ya que tiene una elevada exactitud, con sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo superiores al 90%. En cuanto al diagnóstico de metástasis cerebrales, se debe realizar una TAC o resonancia magnética (RM) craneal ante cualquier síntoma o signo neurológico sospechoso.

- *RM torácica*: se recomienda su uso solo en algunas circunstancias especiales, como es los tumores del *sulcus* superior (Sánchez de Cos *et al.*, 2011).

4.2. Procedimientos de estadificación invasivos

- *Técnicas endoscópicas*: el broncoscopio flexible con aspirado del lavado bronquial y biopsia transbronquial juegan un papel importante en el diagnóstico y estadificación del CP con una

sensibilidad del 50% para masas periféricas y del 37% para nódulos pulmonares (Mehta *et al.*, 1995). La punción transbronquial puede realizarse de dos formas: a ciegas con aguja de aspiración transbronquial (TBNA) o bien ecodirigida en tiempo real con la ecografía endobronquial (EBUS). Si se hace por endoscopia recibe el nombre de ecografía endoscópica (EUS).

- *Punción aspiración transtorácica guiada por TAC*: también denominada fluoroscopia, es una técnica útil en lesiones periféricas donde la biopsia transbronquial no ha conseguido el diagnóstico. Tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad del 97%. La complicación más frecuente de este procedimiento es el neumotórax (25-30%) (Collins *et al.*, 2007).

- *Mediastinoscopia*: se considerada el método estándar para la estadificación ganglionar mediastínica, pero es un procedimiento quirúrgico y por tanto presenta mayor riesgo que las técnicas no invasivas (Noguchi *et al.*, 1995; Yasufuku *et al.*, 2007).

- *Toracoscopia video-asistida*: está indicada en caso de lesiones periféricas menores de 2 cm de diámetro, en tumores pleurales o derrame pleural. Esta técnica, así como la toracotomía, están indicadas en pacientes operables con tumores iniciales en las técnicas de imagen y aparentemente resecables.

4.3. Evaluación funcional

El estado de actividad o *performance status* (PS) es una medida general del estado funcional del paciente que mide el impacto de los síntomas del tumor junto con la co-morbilidad, en la vida diaria de un paciente y su capacidad de autocuidado. Además, constituye un factor pronóstico independiente en CPCNP.

Existen varias escalas disponibles para la evaluación funcional de los pacientes, siendo las más utilizadas el índice de Karnofsky (IK) (Karnofsky *et al.*, 1949) y la del *Eastern Cooperative Group* (ECOG) o PS (Oken *et al.*, 1982) (Tabla 4). Esta última puntúa del 0 al 5 la calidad de vida del paciente en función del nivel de los síntomas, la interferencia con la actividad normal y la proporción de las horas de vigilia pasadas en la cama. De acuerdo con estos valores, los pacientes con PS 0-1 son aquellos que mantienen una actividad plena y se encuentran asintomáticos o los síntomas no limitan su actividad diaria. Estos pacientes son candidatos a tratamiento, según el estadio clínico, con cirugía o a con quimioterapia basada en sales de platino, asociada o no a radioterapia externa concomitante. En cambio, aquellos pacientes con PS-2 encuentran limitaciones en la actividad física y precisan reposo en cama aunque menos del 50% del día. Para este grupo de pacientes la valoración del tratamiento se debe realizar de forma individualizada (Gridelli *et al.*, 2004).

Tabla 4. Estado de actividad, *performance status* (PS) o *Eastern Cooperative Group* (ECOG) que sirve como escala de funcionalidad del paciente oncológico y es factor pronóstico (Oken *et al.*, 1982).

| ECOG | Description |
|------|--|
| 0 | Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction. |
| 1 | Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g., light house work, office work. |
| 2 | Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities. Up and about more than 50% of waking hours. |
| 3 | Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of waking hours. |
| 4 | Completely disabled. Cannot carry on selfcare. Totally confined to bed or chair |
| 5 | Dead |

Por otra parte, la evaluación de la función pulmonar se lleva a cabo mediante pruebas de función respiratoria. Estas son imprescindibles para la valoración quirúrgica e incluyen la espirometría y la medición de la difusión del anhídrido carbónico (DLCO). Los pacientes con un volumen espiratorio forzado en el primer segundo (FEV1) o DLCO menor de un 80% requieren pruebas adicionales para valorar la reserva post-resección pulmonar (gammagrafía de ventilación/perfusión, test de esfuerzo cardiopulmonar y gasometría). Cabe destacar que aquellos pacientes con una FEV1 o DLCO prevista post-operatoria menor del

40% o una saturación menor del 90% presentan mayor riesgo de complicaciones post-operatorias o muerte (Spira A, 2004).

5. Factores pronóstico del CP

Los datos crecientes de incidencia y prevalencia del CP lo convierten en la primera causa de muerte por cáncer, quedando ampliamente demostrada su relación etiológica con el hábito tabáquico.

El CP tiene un mal pronóstico y unos pobres resultados terapéuticos, con unas bajas tasas de supervivencia a 5 años, que en los datos más favorables recogidos en EEUU no supera el 15%. Todos estos datos convierten al CP en un grave problema de salud pública, objeto de la máxima atención sanitaria en el ámbito internacional (Parkin *et al.*, 2005; Alberg *et al.*, 2007; Siegel *et al.*, 2019).

Estos hechos han supuesto, durante muchos años, un gran esfuerzo por parte de las distintas sociedades científicas en la elaboración de formas de clasificación o de agrupación de los pacientes, con el fin de homogeneizar aquellos grupos en los que un

Introducción

determinado número de características comunes ofrecieran la posibilidad de poder aplicar un tratamiento reglado, estimar el pronóstico, asistir a la evaluación de los resultados, facilitar el intercambio de información y contribuir a la investigación.

En este sentido, uno de los principales avances fue el establecimiento del sistema de estadificación TNM, propuesto por Pierre Denoix en 1946. Este sistema describe la extensión de un cáncer en un paciente en base a la extensión del tumor primario (T), a la afectación de los grupos regionales ganglionares (N) y a la presencia de metástasis a distancia (M) (Denoix PF, 1946). Años más tarde, en 1974, la *Task Force on Lung Cancer of the American Joint Committee on Cancer Staging and End Results Reporting* (AJCC) publicó una revisión del TNM en el CP con un gran impacto en las distintas especialidades que manejan esta patología (Mountain *et al.*, 1974), siendo recogida por la *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) en su 2ª edición (UICC, 1975).

Existen diversos factores pronósticos, sobre todo de tipo morfológico y molecular, que pueden condicionar la supervivencia de las distintas formas de cáncer y que no se tienen en cuenta en la

clasificación TNM, por lo que algunos autores han cuestionado la utilidad de este sistema, sobre todo en el carcinoma de mama (Barr y Baum, 1992; Burke y Hendson, 1993; Mittra I, 2003). En el CP la utilidad del sistema TNM también ha sido cuestionada, ya que no logra configurar grupos de pacientes con un pronóstico homogéneo, sobre todo en estadios precoces (Padilla *et al.*, 1997; Asamura *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2009). Ciertamente, factores de índole morfológica (Maeda *et al.*, 2010, 2011) como el tamaño, la estirpe histológica, el grado de diferenciación tumoral, la invasión vascular tumoral o la presencia de necrosis, entre otros, o de carácter molecular (D'Amico *et al.*, 1999; Travis *et al.*, 2011), son motivo de interés a la hora de establecer el pronóstico de los pacientes y los posibles tratamientos con intencionalidad adyuvante, por lo que determinados autores han propuesto estimar el riesgo desde una perspectiva multivariante (Kratz *et al.*, 2012).

Por otra parte, cada vez es más evidente que hay un cambio en el patrón histológico del CPCNP. El adenocarcinoma ha pasado a ocupar el primer lugar en cuanto a frecuencia, desplazando claramente al carcinoma epidermoide (Devesa *et al.*, 2005; Alberg *et al.*, 2007), lo cual ha desembocado en un renovado interés por el

estudio de los distintos tipos de adenocarcinomas y de su implicación pronóstica (Russell *et al.*, 2011; Yoshizawa *et al.*, 2011).

La resección quirúrgica sigue siendo la mejor opción terapéutica del CP en los estadios precoces, estando condicionada la supervivencia al tamaño del tumor y a la presencia o ausencia de invasión linfática regional (Treasure *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2006). La supervivencia a los cinco años en los tumores con un tamaño menor de 3 cm y en ausencia de afectación ganglionar está en torno al 80% (López-Encuentra *et al.*, 2002), cifra claramente superior a las obtenidas con otras alternativas terapéuticas en pacientes inoperables por mala reserva cardiorrespiratoria (Asamura H, 2006).

Aunque está ampliamente establecida la utilización de quimioterapia adyuvante (Arriagada *et al.*, 2004) en pacientes resecaos por CPCNP en estadio II-III A, queda por definir su utilidad en estadios más precoces. Quizás la búsqueda de factores que impliquen un peor pronóstico en los estadios iniciales, pueda justificar el beneficio de estos tratamientos (Felip *et al.*, 2010).

Es importante reseñar que la utilización de nuevos fármacos como el erlotinib, inhibidor de la tirosin-kinasa del receptor del crecimiento epidérmico (EGFR), ha supuesto un avance en el

tratamiento del adenocarcinoma (Wheatley-Price *et al.*, 2008) que sobre expresa este marcador, sobre todo en mujeres no fumadoras (Mok *et al.*, 2009).

Además, cabe destacar que la afectación metastásica a nivel ganglionar es el principal factor pronóstico en el carcinoma pulmonar localizado, habiéndose relacionado recientemente la activación aberrante de la transición epitelio-mesenquimal (EMT) con la conversión de un carcinoma no invasivo en un tumor de características metastásicas y de mal pronóstico (Steinestel *et al.*, 2014).

6. Estadificación del CP

La estadificación del CP se realiza siguiendo las recomendaciones de la American Joint Comitee on Cancer (AJCC) (Brierley, Gospodarowicz y Wittekind, 8ª edición). Está basada en el sistema de clasificación TNM, que hace uso de diversos parámetros descriptivos tales como la extensión del tumor primario (T), la afectación de los grupos regionales ganglionares (N) y la presencia de metástasis a distancia (M). Cada componente se divide en varias

categorías que quedan definidas por otras características (Tabla 5) (Detterbeck FC, 2017, 2018).

Tabla 5. Definición de los descriptores TNM. Tomada de Detterbeck FC, 2018.

| T (primary tumor) | |
|--------------------------|---|
| T0 | No primary tumor |
| Tis | Carcinoma in situ (squamous or adenocarcinoma) |
| T1 | Tumor ≤ 3 cm |
| T1mi | Minimally invasive adenocarcinoma |
| T1a | Superficial spreading tumor in central airways* |
| T1a | Tumor ≤ 1 cm |
| T1b | Tumor >1 but ≤ 2 cm |
| T1c | Tumor >2 but ≤ 3 cm |
| T2 | Tumor >3 but ≤ 5 cm or tumor involving: visceral pleura, main bronchus (not carina), atelectasis to hilum† |
| T2a | Tumor >3 but ≤ 4 cm |
| T2b | Tumor >4 but ≤ 5 cm |
| T3 | Tumor >5 but ≤ 7 cm or invading chest wall, pericardium, phrenic nerve; or separate tumor nodule(s) in the same lobe |
| T4 | Tumor >7 cm or tumor invading: mediastinum, diaphragm, heart, great vessels, recurrent laryngeal nerve, carina, trachea, esophagus, spine; or tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe |
| N (regional lymph nodes) | |
| N0 | No regional node metastasis |
| N1 | Metastasis in ipsilateral pulmonary or hilar nodes |
| N2 | Metastasis in ipsilateral mediastinal or subcarinal nodes |
| N3 | Metastasis in contralateral mediastinal, hilar, or supraclavicular nodes |
| M (distant metastasis) | |
| M0 | No distant metastasis |
| M1a | Malignant pleural or pericardial effusion; or pleural or pericardial nodules or separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe |
| M1b | Single extrathoracic metastasis |
| M1c | Multiple extrathoracic metastases (1 or >1 organ) |

- *Extensión del tumor primario (T)*: este parámetro descriptivo se basa principalmente en el tamaño del tumor, puesto que es el factor pronóstico más importante, pero también considera la invasión y localización tumoral. La nueva edición ofrece una clasificación más precisa, ya que considera intervalos de 1 cm, desde menos de 1 cm a 5 cm (Tabla 5). Para la medida del tamaño del tumor la tomografía

computerizada sigue siendo la mejor técnica (Rami-Porta *et al*, 2018).

- *Nódulos linfáticos regionales (N)*: La clasificación N se basa en la localización de los nódulos implicados, en vez de en el número de nódulos con metástasis (valor usado en otros estadijes). Se establecen 4 categorías en función de la localización de la metástasis (Tabla 6) (Feng y Yang, 2019).

- *Metástasis a distancia (M)*: este parámetro queda definido por la presencia de metástasis (intratorácicas o extratorácicas) fuera de los nódulos linfáticos (Lim *et al.*, 2018). En la nueva edición, las metástasis extratorácicas quedan divididas en dos categorías (Tabla 6) (Feng y Yang, 2019).

La última edición de la AJCC también incluye modificaciones en los diferentes estadios del CP, debido a las modificaciones en los parámetros T y M (Goldstraw *et al.*, 2016). Se distinguen 5 estadios: 0 (adenocarcinoma in situ), I (localizado en el pulmón, sin invasión), II (sin invasión a excepción del estadio IIB), III (afectación de nódulos linfáticos) y IV (presencia de metástasis a distancia) (Tabla 6).

Tabla 6. Estadificación del CP basada en los parámetros TNM de la 8ª edición de la AJCC. (Tomada de Rami-Porta *et al.*, 2018).

| Stage | T | N | M |
|------------------|-----------|-------|-----|
| Occult carcinoma | TX | N0 | M0 |
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| IA1 | T1mi | N0 | M0 |
| | T1a | N0 | M0 |
| IA2 | T1b | N0 | M0 |
| IA3 | T1c | N0 | M0 |
| IB | T2a | N0 | M0 |
| IIA | T2b | N0 | M0 |
| IIB | T1a, b, c | N1 | M0 |
| | T2a, b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| IIIA | T1a, b, c | N2 | M0 |
| | T2a, b | N2 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| | T4 | N0 | M0 |
| | T4 | N1 | M0 |
| IIIB | T1a, b, c | N3 | M0 |
| | T2a, b | N3 | M0 |
| | T3 | N2 | M0 |
| | T4 | N2 | M0 |
| IIIC | T3 | N3 | M0 |
| | T4 | N3 | M0 |
| IVA | Any T | Any N | M1a |
| | Any T | Any N | M1b |
| IVB | Any T | Any N | M1c |

7. Biología molecular del CP

7.1. Principales vías de señalización implicadas en el CP: EGFR, ALK, BRAK/kRAS, ROS

7.1.1. EGFR

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, también denominado HER1 o erbB-1) es un receptor de la superficie celular que forma parte de las vías de señalización que regulan la proliferación celular. El EGFR existe como monómero en la superficie celular. Tras la unión de ligando (EGF, $TNF\alpha$), dimeriza para activar la actividad tirosín quinasa (TQ) de su dominio intracelular (Figura 5) (Liu *et al.*, 2017).

El crecimiento tumoral y la progresión dependen de la actividad de receptores de membrana, como EGFR, que controlan la señalización intracelular que regula los procesos de proliferación, apoptosis, angiogénesis, adhesión y motilidad. Mientras que la actividad TQ de EGFR está altamente controlada en células normales, la amplificación o mutación de los genes que codifican estos receptores dan lugar a la activación constitutiva de los mismos en las células malignas. De hecho, se han observado mutaciones en

EGFR en un 16,6 % de los CPCNP no epidermoides en la población occidental, siendo más frecuentes en mujeres nunca fumadoras (Rosell *et al.*, 2009). En la población asiática estas mutaciones pueden observarse hasta en un 62% de los CPCNP (Shi *et al.*, 2014).

Las alteraciones más frecuentes de *EGFR* son la delección del exón 19 (62.2%), seguida de la mutación puntual L858R en el exón 21 (37.8%). La afectación del exón 20 confiere resistencia al tratamiento de inhibidores de tirosina quinasa (iTK) (Rosell *et al.*, 2009).

En el CPCNP avanzado, la presencia de mutaciones en *EGFR* confiere un pronóstico más favorable y predice fuertemente a la sensibilidad de iTQs de EGFR tales como erlotinib, gefitinib y afatinib.

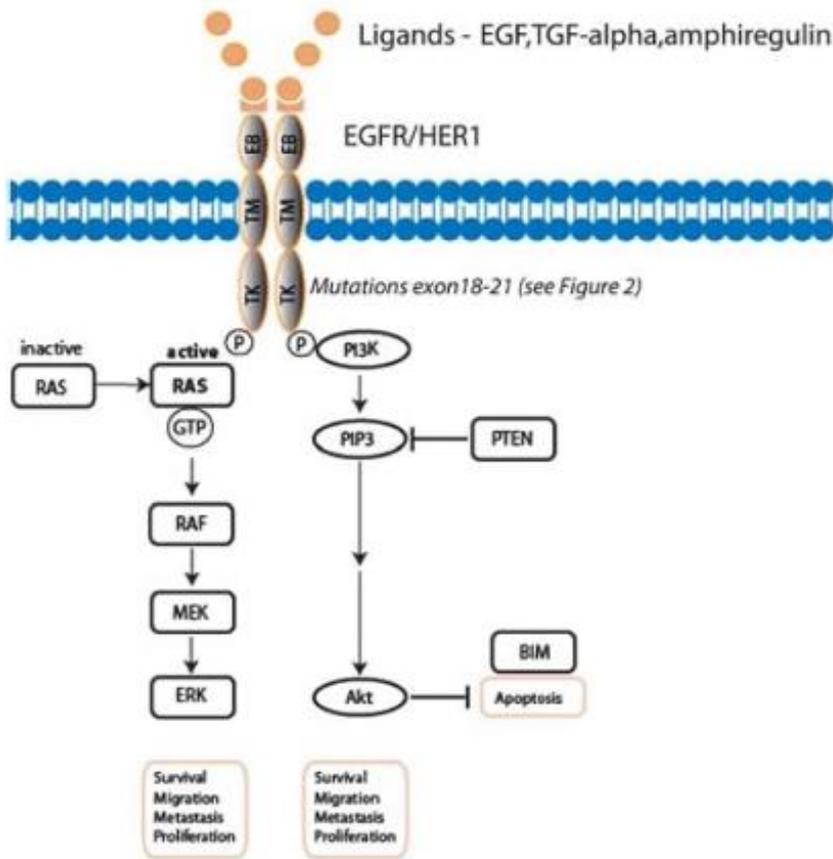


Figura 5. Estructura y función de EGFR. Extraído de Siegelin y Borczuk, 2014.

7.1.2. ALK

El gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) codifica para un receptor de membrana de la familia de los receptores de insulina que posee un dominio extracelular de unión a ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad quinasa (Souttou *et al.*, 2001). De la misma manera que en el caso de EGFR, en presencia de ligando ALK dimeriza y activa su función quinasa, fosforilando otros dominios intracelulares y llevando a cabo su función. La expresión de *ALK* es importante en el sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. En la edad adulta sus niveles de expresión son bajos y aparecen alterados en diversos procesos tumorales (Souttou *et al.*, 2001; Hallberg y Palmer, 2013).

En el CPCNP la principal alteración de ALK se da en forma de proteína de fusión. La más común consiste en una inversión en el cromosoma 2 que juxtapone el extremo 5' del gen de la proteína 4 asociada a microtúbulos del equinodermo (*EML 4*) con el extremo 3' del gen de la *ALK*, resultando en un nuevo reordenamiento que da lugar a la proteína de fusión de EML4 y ALK (EML4-ALK) (Figura 6) (Shaw y Solomon, 2011).

Aunque es poco frecuente (2-7%), el reordenamiento de este oncogén de fusión define una variante de cáncer de pulmón con características clínicas y patológicas diferenciales como son la escasa historia de hábito tabáquico, la edad juvenil de presentación y la asociación con histología de adenocarcinoma en anillo de sello o acinar (Kwak *et al.*, 2010). Cabe destacar que los reordenamientos de *ALK* suelen ser mutuamente excluyentes con mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS*. Además, los casos *ALK* positivos son altamente sensibles a inhibidores de *ALK*, siendo el crizotinib el primero en aprobarse y utilizarse (Hallberg y Palmer, 2013). Hoy en día existen inhibidores de segunda generación, como el ceritinib y el brigatinib, debido a que algunos pacientes presentaban resistencia al crizotinib (Friboulet *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

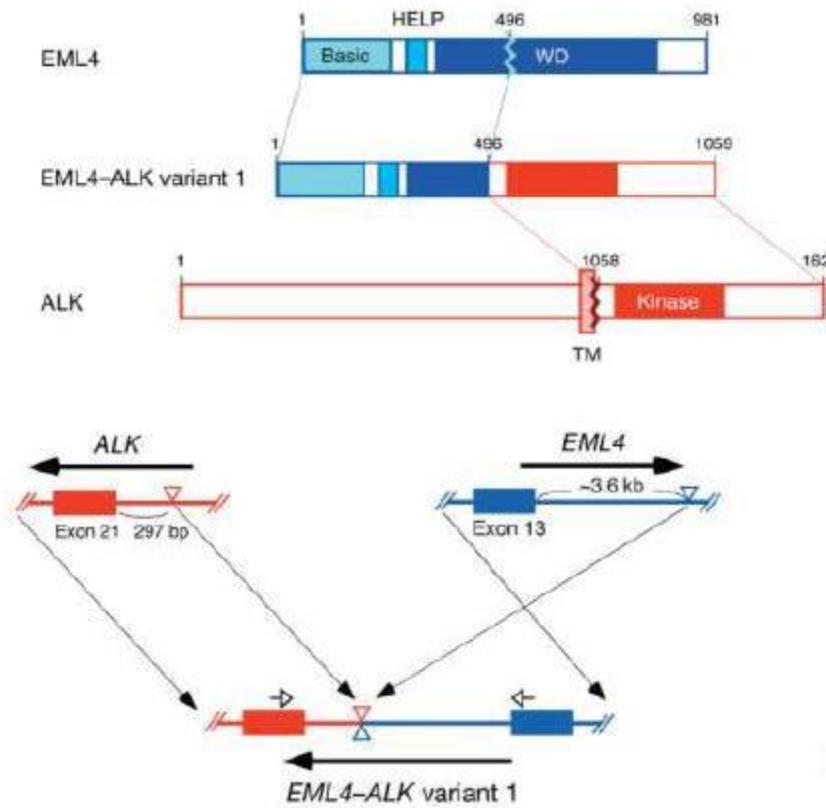


Figura 6. Estructura del reordenamiento de EML4-ALK. Extraído de Soda et al., 2007.

7.1.3. KRAS

La proteína KRAS, codificada por el gen del sarcoma de rata Kirsten, es una guanosina GTPasa intracelular unida a membrana que activa numerosas rutas de transducción de señales. Es especialmente importante la vía de las quinasas de proteínas mitógeno activadas (MAPK), las cuales también a través de la transducción de señales activan a otras proteínas quinasa y a factores de transcripción que controlan en última instancia la proliferación y diferenciación celular (Malumbres y Barbacid, 2003).

Las mutaciones en el gen *KRAS* se encuentran en aproximadamente el 25% de los adenocarcinomas de pulmón en los países occidentales y ha sido fuertemente asociado con el consumo de cigarrillos. La mayoría de las mutaciones corresponden a mutaciones con cambio de sentido en los codones 12,13 o 61 (COSMIC 2016), lo que causa una actividad constitutiva de *KRAS* independiente de señales activadoras de su función.

Las mutaciones de *KRAS* predicen un mal pronóstico para la enfermedad reseca, así como la resistencia al tratamiento con los inhibidores de EGFR gefitinib o erlotinib (Riely *et al.*, 2008).

Hasta la fecha, todos los esfuerzos para desarrollar un inhibidor de KRAS no han funcionado, debido a la dificultad de acceder farmacológicamente a los sitios de unión (Tomasini *et al.*, 2016; Ferrer *et al.*, 2018).

7.1.4. ROS-1

ROS1 es un receptor TQ que en humanos está codificado por el gen *ROS1*. Este receptor, que es estructuralmente similar ALK, pertenece a la familia de los receptores de insulina con actividad TQ en su dominio intracelular (Bergethon *et al.*, 2016).

Se han observado reordenamientos de ROS1 en el 1-2% de los pacientes con CPCNP. En este tipo de cáncer ROS1 forma proteínas de fusión con FIG, CD74, SLC34A2 y SDC4, siendo la proteína de fusión CD74-ROS1 la que se detecta con mayor frecuencia (Bubendorf *et al.*, 2016). Los pacientes que presentan esta alteración suelen ser jóvenes y no fumadores, tener adenocarcinomas y no presentar mutaciones en *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *HER2* o reordenamientos de *ALK* (Bergethon *et al.*, 2016).

En un estudio fase I con crizotinib en pacientes con CPCNP con reordenamientos de *ROS1* se demostró una tasa de respuesta

del 72% y una mediana de control de la enfermedad de 17,6 meses, lo que ha llevado a la FDA a su aprobación (Shaw *et al.*, 2014; Kazandjian *et al.*, 2016; Viola *et al.*, 2016).

7.2. Micrometástasis moleculares en el CP

La linfadenectomía mediastínica en el CP es un procedimiento usual. Dentro del TNM, el especial tropismo de las células neoplásicas pulmonares por los territorios linfáticos hace que un adecuado y exhaustivo estudio de las adenopatías mediastínicas sea básico para establecer una correcta estadificación. Así pues, la afectación linfática ganglionar por metástasis es un factor pronóstico de especial relevancia en el CP (Sugi *et al.*, 2008).

Al igual que sucede con el tamaño tumoral, un mayor número de ganglios afectados se relaciona con una mayor extensión anatómica y con un peor pronóstico (Edge *et al.*, 2010). En el CP, la clasificación ganglionar se rige exclusivamente por la ausencia (N0) o presencia (N1-3) y localización de ganglios afectados. Los descriptores N1-3 indican la localización ganglionar: a mayor N, mayor distancia del tumor primario y peor pronóstico.

Toda esta abundante información sobre el impacto pronóstico del número de ganglios y estaciones ganglionares comprometidas por el tumor ha sido posible porque se han extirpado y analizado los ganglios.

Incluso para los tumores en estadio I patológico, un mayor número de ganglios extirpados se relaciona con un mejor pronóstico. Aunque no hay unanimidad sobre el número ideal de ganglios que extirpar, en los estudios retrospectivos publicados este número oscila entre 6 y 15 (Ou y Zell, 2008; Varlotto *et al.*, 2009), recomendando 10 ganglios (Whitson *et al.*, 2007).

La forma generalmente recomendada de linfadenectomía mediastínica es la disección ganglionar sistemática (Giroux *et al.*, 2009). Es la técnica que ofrece mejores garantías para una correcta estadificación, tanto para certificar y matizar el compromiso ganglionar, como para certificar su ausencia.

Los esfuerzos puestos en estudiar mediante técnicas novedosas los ganglios obtenidos en la cirugía van dirigidos a optimizar el rendimiento de las piezas y a aumentar las posibilidades de curación, al establecer un tratamiento acorde a la estadificación de la enfermedad.

El estudio de micrometástasis ganglionares ha sido publicado como un factor de peor pronóstico (Gu *et al.*, 2002). Un estudio previo de nuestro grupo mostró que la existencia de micrometástasis ganglionares halladas por métodos moleculares era un factor de más pronta recidiva tumoral. Sin embargo, el gran número de ganglios estudiados por paciente fue un parámetro que hizo inviable su aplicación sistemática (Benlloch *et al.*, 2009).

La introducción del concepto de ganglio centinela (GC), bien conocido en tumores de mama y melanoma, animó a la detección de dicho GC en el carcinoma pulmonar. El concepto de GC supone que el flujo linfático del tumor primario migra en primer lugar a ganglios en contigüidad anatómica antes que a otros más distantes (Minamiya *et al.*, 2007).

En el caso del CP la finalidad de su detección es distinta a la de los casos comentados: aunque está descrito un aumento de posibles complicaciones tras la linfadenectomía mediastínica (Darling *et al.*, 2011) el motivo del estudio molecular es evitar una subestadificación (estadificar como estadio I pacientes que realmente tienen afectación molecular) (Galbis *et al.*, 2014).

Publicaciones anteriores mostraron que los ganglios linfáticos subpleurales conectan directamente con las adenopatías a nivel de mediastino en el 20-25% de los pacientes (Riquet *et al.*, 2007) y que, además, el GC en la cavidad torácica es lóbulo específico (Nomori *et al.*, 2011; Galbis *et al.*, 2017). Por esto, se cree que las estaciones por donde circula la linfa son desde la lesión hacia ganglios cercanos (subpleurales / intraparenquimatosos: considerados N1) y, en algunos casos, directamente a los considerados N2 como los de la ventana aorto pulmonar (Misthos *et al.*, 2008).

7.3. Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es el proceso por el cual las células epiteliales pierden sus características y capacidad de adhesión y adquieren características de células mesenquimales (Hay ED, 1995). Durante la EMT se dan cambios en la polaridad celular, se reorganiza el citoesqueleto y se altera la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la unión intercelular, migración celular y resistencia a la apoptosis (Figura 7) (Troncoso *et al.*, 2017). Este proceso es importante durante la embriogénesis, la

reparación de tejidos y los procesos neoplásicos (Kalluri y Weinberg, 2009; Troncoso *et al.*, 2017; Dongre y Weinberg, 2019).

En la metástasis, las células cancerosas migran desde el tumor primario hasta alcanzar un vaso sanguíneo, gracias al cual pueden invadir otros órganos en los que desarrollan nuevos tumores (Figura 8).

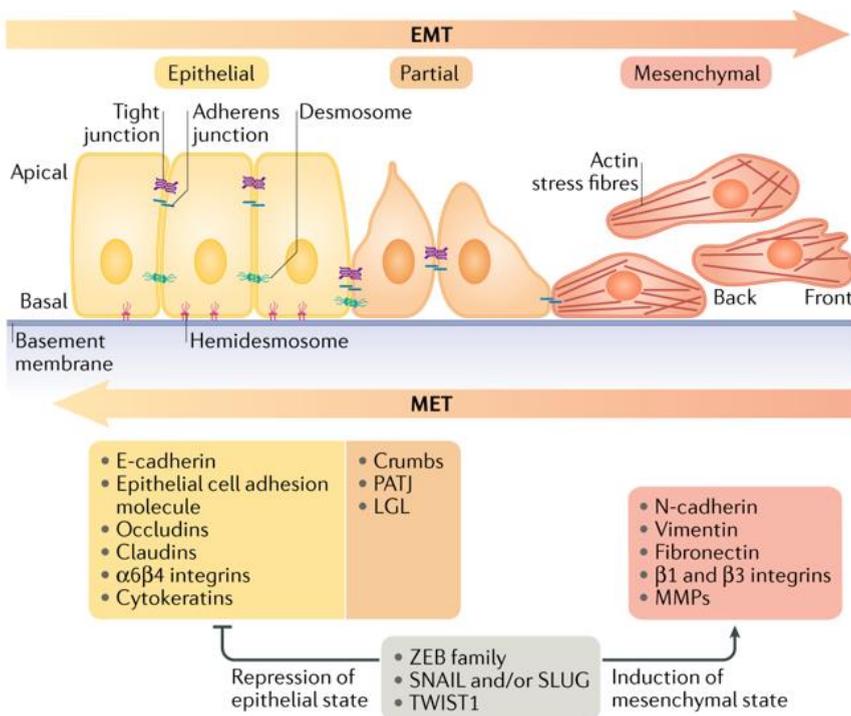


Figura 7. Proceso de transición epitelio - mesénquima. En la figura se muestran las principales proteínas que participan en este proceso (Tomada de Dongre y Weinberg, 2019).

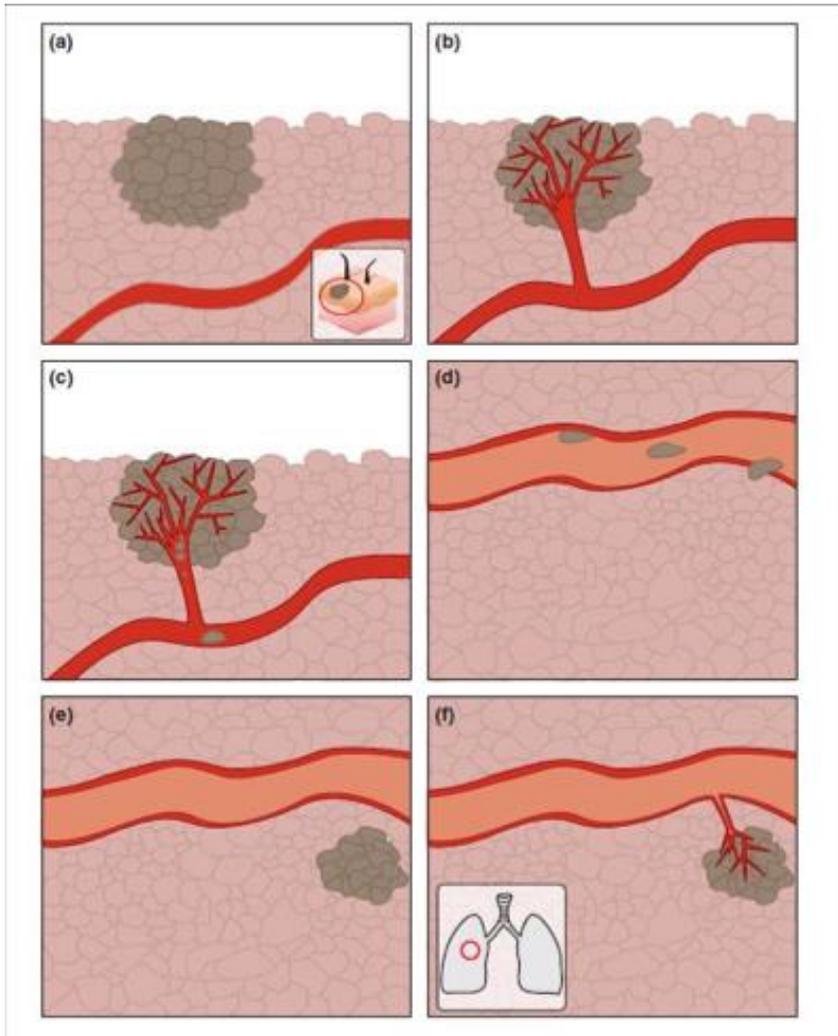


Figura 8. Pasos del proceso metastásico: (a) tumor primario; (b) angiogénesis en el tumor primario; (c) intravasación; (d) migración y extravasación; (e) colonización en nuevo órgano; (f) angiogénesis y crecimiento de la metástasis. Imagen tomada de Mathot y Steninger, 2012.

Este tipo de EMT, que ocurre en células neoplásicas, está mediada por la activación de oncogenes o represión de genes de supresión tumoral (Kalluri y Weinberg, 2009). Si bien en principio las células tumorales de origen epitelial se caracterizan por su alta proliferación, la capacidad invasiva y metastásica está relacionada con la aparición de mecanismos de EMT por medio de la expresión de marcadores mesenquimales como α -SMA, FSP1, vimentina y desmina (Kalluri y Weinberg, 2009). Por otra parte, señales inductoras de EMT que provienen del estroma que rodea al tumor primario, como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y TGF- β , se relacionan con la activación de factores de transcripción como Snail, Slug, ZEB1, Twist y FOXC2, que son esenciales en el desarrollo del proceso neoplásico y que actúan como represores de la E-cadherina (Kalluri y Weinberg, 2009; Dianbo *et al.*, 2011; Mathot y Stenninger, 2012; Yulong *et al.*, 2013; Nieto *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016). La regulación de este gen ha sido ampliamente estudiada, ya que en carcinomas humanos la pérdida de expresión de E-cadherina está relacionada con un fenotipo invasivo (Frixen *et al.*, 1991; Lamouille *et*

al., 2014). Además, la expresión de los factores de transcripción anteriormente mencionados está asociada a peor pronóstico y recurrencia (Fuxe y Karlsson, 2012).

Estudios previos han mostrado el papel de la EMT en la resistencia a fármacos (Xiao y He, 2010). Por ejemplo, se ha observado la expresión de marcadores de EMT en líneas resistentes a adriamicina (Sommers *et al.*, 1992), oxaplatina y paclitaxel (Kajiyama *et al.*, 2007). Estudios modelos animales también han puesto de manifiesto la importancia de la EMT en la resistencia a fármacos (Fischer *et al.*, 2015). Del mismo modo, se ha observado esta relación en algunos tipos de cáncer como el de mama o páncreas (Fischer *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015).

7.3.1 EMT y sistema linfático

El sistema linfático es un sistema de transporte de fluidos, pero también es una parte importante del sistema inmunitario, participando en la respuesta inmune innata y adaptativa (Shields JD, 2011; Kataru *et al.*, 2014).

Se desconoce el mecanismo por el cual las células tumorales viajan a través del sistema linfático y si la EMT contribuye a este

proceso, aunque estudios recientes han mostrado que las células que llevan a cabo una EMT inducida por TGF- β son capaces de migrar a través de este sistema (Figura 9) (Risolino *et al.*, 2014; Pang *et al.*, 2016; Karlsson *et al.*, 2017). En cuanto al CP, la presencia de marcadores de EMT en los nódulos linfáticos de estos pacientes ha sido poco estudiada hasta la fecha.

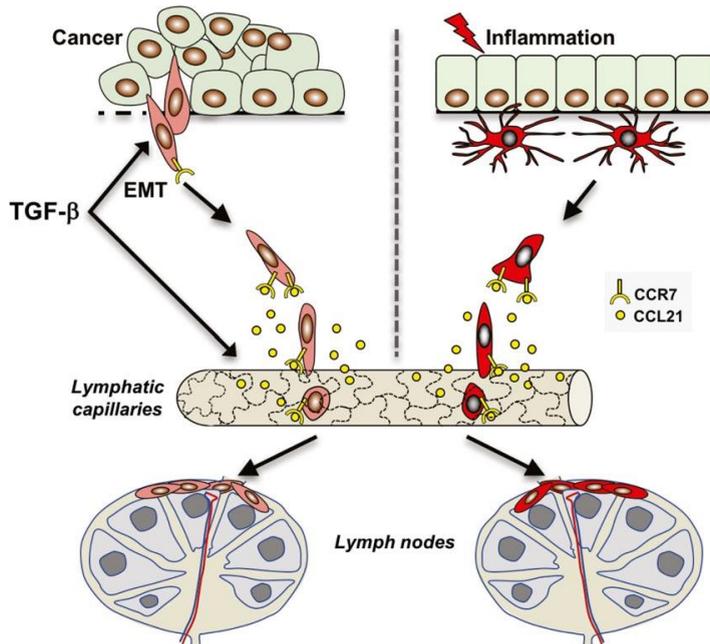


Figura 9. Diagrama que muestra la migración de células tumorales a través del sistema linfático. Las células tumorales, inducidas por TGF- β , llevan a cabo un proceso de EMT que les permite migrar a los nódulos linfáticos. Imagen tomada de Pang *et al.*, 2016.

8. Papel del sistema inmunitario en el cáncer

El sistema inmunitario, además de proteger frente a patógenos externos, es capaz de reaccionar ante agresiones internas como el cáncer.

La respuesta inmunitaria ante el crecimiento tumoral ocurre a través del reconocimiento de antígenos tumorales. El sistema inmunitario puede identificar proteínas con mutaciones provenientes de oncogenes, proteínas virales en tumores que tienen su origen en una infección viral (como el cáncer de cérvix) o proteínas propias del cuerpo con una expresión anómala (D'Amico *et al.*, 1999; Parkin *et al.*, 2005).

Las células tumorales son reconocidas por células NK (*natural killer*), a través de ligandos específicos de estas células (Chow *et al.*, 2012), lo que lleva al reconocimiento y a la destrucción de las células transformadas. Los fragmentos de las células son consumidos y procesados por macrófagos y células dendríticas, que a su vez son activadas para secretar citoquinas inflamatorias y presentar las moléculas derivadas de las células tumorales a los linfocitos T y B. La activación de estos linfocitos lleva a la producción

de citoquinas adicionales, que profundizan la activación del sistema inmunitario innato y promueven la producción de anticuerpos y células T específicas para el tumor en cuestión. La activación completa del sistema inmunitario adaptativo lleva a la eliminación de las células tumorales remanentes y a la generación de una memoria inmunitaria específica contra los componentes del tumor para prevenir recurrencias (Finn OJ, 2012).

No obstante, la progresión maligna de los tumores tiene la capacidad de suprimir la respuesta inmunitaria; eluden una respuesta inflamatoria aguda que tiene la finalidad de eliminar las células tumorales. Por el contrario, causan un estado inflamatorio crónico que promueve el crecimiento tumoral y previene su eliminación (Grivennikov *et al.*, 2010; Teixidó *et al.*, 2015). Hallazgos recientes evidencian que esta inmunosupresión se debe a la capacidad que tienen las neoplasias de alterar la respuesta inmunitaria del cuerpo. El microambiente tumoral puede evitar la expansión de linfocitos T colaboradores y citotóxicos, que son específicos para los antígenos tumorales, al promover la producción de citoquinas y otros factores proinflamatorios. De este modo, ocurre una acumulación de células supresoras, como los linfocitos T

reguladores, que inhiben una respuesta del sistema inmune (Finn OJ, 2012; Yanan y Gang, 2012; Woo *et al.*, 2015).

Los avances conceptuales y técnicos en el área de la Inmuno-oncología han permitido desarrollar abordajes inmunoterapéuticos innovadores contra el cáncer. Actualmente existen métodos para estimular la respuesta inmunitaria contra el crecimiento tumoral a través de la estimulación o el bloqueo de vías o células inhibitorias en el microambiente tumoral.

Entre las diversas moléculas co-estimuladoras que modulan la respuesta inmunitaria se encuentran CD27, CD28, CD40, CD137, GITR (receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides) y OX-40 (Sundar *et al.*, 2014). Esta última regula la expansión de células T específicas de antígeno, la supervivencia y la producción de citoquinas. CD27, CD137 y GITR estimulan a las células CD4+ y CD8+ permitiendo la proliferación de las células T, mientras que CD28 amplifica la señalización mediada por los receptores de linfocitos T. Por otra parte, CD40 está involucrado en la diferenciación y supervivencia celular y en apoptosis, y desencadena una respuesta inmunitaria específica (Sundar *et al.*, 2014).

En cuanto a las vías inhibitorias, las más estudiadas en CP son CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) y PD-1 (muerte programada-1) (Massarelli *et al.*, 2014) y su bloqueo se suele dar mediante el uso de anticuerpos o con quimioterapia a dosis bajas (Berraondo *et al.*, 2016). CTLA-4 es un punto de control negativo que controla la activación y proliferación de células T (Reck y Paz-Ares, 2015). La unión de esta proteína receptora a su ligando, expresado en células presentadoras de antígeno, tiene un efecto inhibitorio sobre las células T.

La vía PD-1/PD-L1 es uno de los principales puntos de control más estudiados en la actualidad. En esta vía se produce la unión del receptor PD-1, presente en las principales células responsables de la defensa de los tumores (las células T activadas), con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2), lo que produce un fuerte efecto inmunosupresivo al inhibir la activación de células T (Brahmer JR, 2012; Domagala-Kulawik J, 2015). De estos dos ligandos es destacable PD-L1, que se expresa en muchas células de forma normal y tiene, entre otras, la finalidad de evitar que determinadas reacciones inmunes se conviertan en excesivas y dañen tejidos propios. Sin embargo, se han observado mayores niveles de

Introducción

expresión de PD-L1 en las células del CP, entre otros tipos de cáncer. Así pues, ya se han desarrollado varios fármacos que sirven para bloquear esta vía; son capaces de evitar que la proteína PD-L1 presente en las células tumorales se una a la proteína PD-1 de las células de nuestro sistema inmunitario (Campeato *et al.*, 2015). Al bloquear esa unión, se consigue evitar que el tumor inactive la respuesta inmunitaria, de modo ésta puede destruir las células tumorales.

Otros puntos de control negativo de la respuesta inmunitaria son la vía de TIM-3, LAG-3 y KIR. Mediante la unión a su ligando, TIM-3 inhibe a las células T *helper* induciendo la tolerancia periférica (Sundar *et al.*, 2014). LAG-3 es una proteína relacionada con CD4 que se une al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y reduce la proliferación de células T (Huang *et al.*, 2004; Gandhi *et al.*, 2006). Mientras que la inhibición de KIR, familia de reguladores de las células NK, resulta en una activación de la actividad antitumoral de éstas (Freire *et al.*, 2013).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La afectación metastásica a nivel ganglionar es el principal factor pronóstico en el carcinoma pulmonar localizado, habiéndose relacionado recientemente la activación aberrante de la transición epitelio - mesenquimal (EMT) con la conversión de un carcinoma no invasivo en un tumor de características metastásicas y de mal pronóstico.

De hecho, la EMT ha sido establecida como uno de los principales factores en la progresión del cáncer, la diseminación linfática y la aparición de metástasis. Durante este proceso, las células pierden la expresión de marcadores epiteliales (como la E-Cadherina) e incrementa la expresión de marcadores mesenquimales (como la Vimentina o la N-Cadherina).

Dado que la micrometástasis por sí solas no se relacionan con el pronóstico, pero sí que muestran un 20% de recidivas, el análisis de las vías de EMT y sobretodo del papel del sistema inmunitario nos podría ayudar a diferenciar las micrometástasis que van a progresar de las que no lo van a hacer.

Una evaluación de la expresión de los marcadores de EMT en las micrometástasis localizadas en el ganglio centinela de pacientes con carcinoma pulmonar permitiría avanzar en el conocimiento de los procesos moleculares implicados en la metástasis durante la enfermedad. Por otro lado, un estudio paralelo de los niveles de expresión de los marcadores de las diferentes vías de control inmunológico y de las células inmunitarias infiltradas en el tejido tumoral pulmonar y en ganglio centinela de estos pacientes contribuiría a obtener información sobre nuevas dianas moleculares susceptibles de ser bloqueadas mediante inmunoterapia.

Objetivos

En base a lo expuesto nos planteamos los siguientes

OBJETIVOS:

1. Analizar la presencia de micrometástasis en ganglio centinela mediante qPCR, estudiando la presencia de mRNA de los genes CK7, CEACAM5 y BPIFA1 en pacientes con CPNM, y mediante inmunohistoquímica analizando la expresión de CK7.
2. Estudiar los niveles de expresión de los genes marcadores de EMT mediante qPCR en muestras de ganglio centinela, de tejido tumoral y de tejido adyacente sano de pacientes diagnosticados con CPNM.
3. Estudiar los niveles de expresión de los genes de las vías del sistema inmunitario mediante qPCR en muestras de ganglio centinela, de tejido tumoral y de tejido adyacente sano de pacientes diagnosticados con CPNM.
4. Análisis de correlación entre las características clínico-patológicas de los pacientes y los patrones moleculares identificados en los objetivos anteriores.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Ámbito y Población

La población asignada a la Comunidad Valenciana susceptible de recibir asistencia sanitaria es de 5.021.579 personas.

La población del marco de este estudio es la población asignada al Departamento de Salud de La Ribera con 259.528 personas, al Departamento de Salud de Xàtiva-Ontinyent con 198.278 personas y al Departamento de Salud de Alcoi con 137.404 personas, según el Sistema de Información poblacional de diciembre de 2015.

La población diana de nuestro estudio fueron todos aquellos pacientes con sospecha clínica de CPCNP de estadio I provenientes de los departamentos de salud anteriormente citados, a los que se les realizó resección pulmonar oncológica con fines terapéuticos.

2. Pacientes

Para un total de 595.210 personas a las que el servicio da cobertura, se estiman un total de 437 pacientes incidentes en el año 2015, diagnosticados en los departamentos del radio de acción que generan consultas, tratamiento y en algunos casos intervención, siendo este reducido número la población inicialmente elegible antes de aplicar criterios de selección.

El diseño muestral fue aleatorio simple entre los pacientes que se atendían en el servicio. El estudio se llevó a cabo en un total de 101 pacientes válidos no excluidos.

2.1 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión de los pacientes en el estudio fueron los siguientes:

- 1.- Sospecha clínica de CBPNM EI con criterios de resecabilidad y operabilidad.
- 2.- Realización en dichos pacientes de cirugía oncológica con fines curativos.
- 3.- Detección del ganglio denominado centinela tras marcaje intra campo con nanocoloide de albúmina-Tc99 y sonda de gammagráfica.
- 4.- Exéresis de ganglios mediastínicos e hiliares, clasificación de los niveles ganglionares según la ATS (*Am Rev Respir Dis.* 1983;127(5):659-664).
- 5.- Tras la cirugía, confirmación de la presencia de CBPNM EI.
- 6.- Firma de la participación voluntaria en el estudio tras la correspondiente información por miembros del equipo investigador.

2.2 Criterios de exclusión

Los criterios de exclusión de los pacientes en el estudio fueron los siguientes:

- 1.** Falta de cumplimiento de alguno de los criterios de inclusión.
- 2.** Imposibilidad de resección oncológica completa (R0).
- 3.** Obtención de un resultado positivo para micrometástasis mediante técnicas convencionales de anatomía patológica e inmunohistoquímica.

3. Muestras

En el estudio se incluyeron pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en estadio clínico I, II, III y IV para los cuales se programó cirugía para su tratamiento. Como paso preoperatorio, se realizó una estadificación rutinaria, incluyendo una tomografía computarizada torácica, una tomografía por emisión de positrones (PET) y una mediastinoscopia en caso de ser necesario. Durante la cirugía se realizó un muestreo sistemático de los ganglios linfáticos en todos los pacientes. Tras la resección pulmonar, las muestras quirúrgicas (tumor primario y ganglios linfáticos) fueron evaluadas inmediatamente por un patólogo y se llevó a cabo la clasificación histopatológica de rutina y la estadificación patológica del tumor de acuerdo con las Revisiones en el Sistema Internacional para la Estadificación del Cáncer de Pulmón (Hsu *et al.*, 2009).

Este estudio incluye pacientes con tratamiento adyuvante después de la cirugía o sin tratamiento coadyuvante, así como fumadores, exfumadores y pacientes nunca fumadores. Los tipos de tumores histológicos se dividieron de acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (Maeda *et al.*, 2011). Nuestro estudio incluye adenocarcinomas, carcinomas epidermoides, carcinomas neuroendocrinos y tumores adenoescamosos. Los pacientes menores de 65 años se clasificaron como jóvenes y los mayores de 65 años de edad como mayores. Se incluyeron en el estudio ganglios centinela con un resultado negativo o positivo para metástasis determinado por técnicas histopatológicas convencionales. Los pacientes con terapia adyuvante previa o con neoplasias previas o sincrónicas fueron excluidos del estudio.

El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de la Ribera y se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki.

4. Diseño del estudio

Se diseñó un estudio observacional longitudinal prospectivo no probabilístico de tipo consecutivo de entre aquellos sujetos que cumplían los criterios de inclusión.

4.1. Variables de estudio

Las variables definidas en la base de datos han sido:

- SLE: intervalo libre de enfermedad (desde la cirugía hasta la recaída / exitus / cierre del estudio).
- Meses SG: meses hasta la recaída en caso de haberse producido.
- Estado SG: indicaría la supervivencia global.
- MM IHQ: micrometástasis detectadas por inmuno-histoquímica, correspondientes a las proteínas del pulmón detectadas en ganglio linfático.
- MM qPCR: micrometástasis detectadas mediante qPCR.
- Edad: divididos en pacientes > 65 años ó ≤ 65 años;
- Sexo
- Histología: adenocarcinoma, epidermoide, neuroendocrino de células grandes, adenoescamoso.
- Tabaquismo: fumador, no fumador y ex fumador (>1 año).
- Estadio tumoral tras estudio de muestra quirúrgica: 1, 2, 3 y 4;
- Grado de diferenciación celular: del tumor tras la exéresis

quirúrgica.

- Marcadores del sistema inmune: en tumor (T) y en ganglio (GC). Se han estudiado 13 marcadores de inmunoterapia en ambas muestras tisulares:

CD27

CD28

CD40

CD137

CTLA-4

GITR

KIR

LAG3

OX-40

PD-1

PD-L1

PD-L2

TIM-3

- Marcadores del sistema EMT: también en tumor y ganglio, estudiando 8 marcadores en cada una de las muestras detalladas:

CDH1

CDH2

TWIST

SNAI1

SNAI2

VIM

ZEB1

ZEB2

5. Protocolo de actuación y procesamiento de muestras

5.1 Marcaje del ganglio centinela

Ante un paciente con criterios de inclusión, y tras la localización de la tumoración durante la cirugía, se procedió al marcaje del ganglio centinela mediante la inyección peritumoral de 0,25 mCi de nanocoloide de albúmina (Nanocol®) marcado con ^{99m}Tc en un volumen de 0,3 ml. Pasados un mínimo de 15 minutos, y guiados mediante la sonda gammagráfica Navigator®, se procedió a la localización del ganglio centinela y exéresis del mismo.

5.2 Recogida de muestras

Se tomaron muestras de tejido sano pulmonar, tumoral y ganglio seleccionado como centinela. La recogida de muestras se realizó inmediatamente después de la resección quirúrgica del tumor, transcurriendo el menor tiempo posible (<30 min.) para preservar lo más intacto el mRNA. Las piezas se llevaron del quirófano al laboratorio en fresco y de forma inmediata para proceder a su procesamiento.

Parte del tejido (sano pulmonar, tumoral y ganglio centinela) se congeló inmediatamente y se almacenó a -80°C para futuras determinaciones. El resto del tejido se procesó rutinariamente. En primer lugar, el tejido se fijó en formol tamponado. A continuación, se deshidrató pasando por baños crecientes de etanol y xileno y se incluyó en parafina. Por último, se realizaron cortes seriados para su posterior tinción con hematoxilina-eosina o su estudio inmunohistoquímico (CK7).

Por otra parte, se disecó el ganglio remitido como centinela para su estudio inmunohistoquímico y molecular. Dos terceras partes del ganglio linfático fueron procesadas para estudio anatómico patológico convencional y una tercera parte se preservó en 1 ml de RNA later™ (QIAGEN), que permite el almacenamiento a 4°C y permite enviar las muestras de tejido a temperatura ambiente.

5.3 Estudio inmunohistoquímico

Una vez descartada la presencia de metástasis por métodos convencionales se procedió a la realización del estudio inmunohistoquímico para CK7 en los ganglios linfáticos (realizado de forma centralizada por el Servicio de Anatomía Patológica).

La técnica se realizó sobre tres niveles de corte no consecutivos y fue valorada al menos por dos observadores en microscopio de multicabezal. Se define como micrometástasis (AJCC) la presencia de grupos celulares tumorales entre 0,2 y 2 mm de diámetro mayor. En caso de presentar grupos de mayor tamaño se consideró metástasis convencional diagnosticada en el estudio previo, siendo el caso reestadificado y excluido del estudio.

Las secciones se desparafinaron en un baño de xileno durante 30 min. A continuación, se hidrataron las muestras en baños de concentraciones decrecientes de etanol (5 min alcohol 100%; 5 min alcohol 96%; 5 min alcohol 70%) para finalizar en agua destilada. En este punto, las secciones se pretrataron con TRS6 (DAKO) o Enhancer (Linares) en el microondas a 97°C durante 15 min, se dejaron atemperar 20 min a temperatura ambiente, y se lavaron con

TBS. Seguidamente, se incubaron con una solución 10% de H₂O₂ durante 10 min, para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Las secciones se lavaron con tampón TBS y se incubaron con el anticuerpo (Ac) primario anti-CK7. Tras un breve lavado con Tris con 0.05% Brij 35-Solution (Merck), las secciones se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa y se revelaron en un inmunoteñidor automático (TechMate 500; Biotech Solutions, Dako; Denmark), sumergiéndolas en DAB (DAKO) durante 15 min. Por último, se tiñeron levemente con hematoxilina y se montaron con Glycergel (Merck).

Los ganglios centinela con al menos una célula marcada en el citoplasma por este marcador fueron considerado positivos para metástasis.

5.4 Análisis molecular

Para la detección de metástasis ocultas por medio de qPCR se escogieron los marcadores de expresión génica CK7, CEACAM5 y PLUNC; empleándose como control de expresión génica GADPH, que nos permite evaluar la calidad de la muestra y normalizar el resultado del estudio de expresión.

La elección de estos tres marcadores se basa en el trabajo de Benlloch *et al.*, 2009 donde se realizó una extensa búsqueda en el catálogo SAGE (<http://cgap.nci.nih.gov/Catalog>) con el objetivo de seleccionar genes con alta expresión en tejido pulmonar y baja o nula expresión en ganglios linfáticos benignos.

Se seleccionaron los genes CK7, CEACAM5 y PLUNC como los más específicos para la detección de metástasis pulmonar, por lo que se considera a aquellos ganglios linfáticos con expresión de al menos dos de los genes marcadores de presencia de células de origen pulmonar como positivos moleculares.

5.4.1 Extracción de RNA total

La fracción de tejido tumoral, pulmonar normal y de ganglio centinela se manejó en frío y con material estéril y se almacenó en 1 ml de RNA later™ (QIAGEN). El tejido se homogenizó en un equipo TissueLyser® (QIAGEN) según el protocolo recomendado por el fabricante. A partir del homogeneizado se procedió a la extracción del RNA utilizando el kit QIAGEN RNA Mini Kit™ (QIAGEN) en un extractor automático de ácidos nucleicos (Qiacube™, QIAGEN). Brevemente, una vez disgregado, al tejido se añade etanol para incrementar su unión a la membrana de la columna (proporcionada por el kit). La muestra se pasa por dicha columna, donde queda pegado el RNA. Este se lava y se eluye en agua libre de nucleasas. El RNA obtenido se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000® (NanoDrop Technologies), midiendo la absorbancia a 260 nm.

5.4.2 Transcripción reversa

Para la síntesis de cDNA se llevó a cabo una la transcripción inversa de 1 µg de RNA empleando el kit GeneAmp RT-PCR™ (Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al RNA total se añadió un mix de reacción que contenía tampón 10x, Mg₂Cl (25 mM), una mezcla de nucleótidos (10 mM) hexámeros al

azar (*random hexamers*) como cebadores, 20 unidades de inhibidor de RNasa y 50 unidades de transcriptasa reversa (MuLV RT). La reacción se incubó a 25°C durante 10 min para la correcta unión de los cebadores, a 37°C durante 30 min para la síntesis del cDNA y a 95°C durante 5 min para la inactivación del enzima. El cDNA se almacenó a -80° C hasta su utilización.

5.4.3 Análisis de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

El estudio de expresión génica se realizó en un equipo ABI7500® (Applied Biosystems) utilizando los ensayos de expresión génica *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems), que constan de una sonda Taqman. La mezcla de reacción contenía 2,5 µl de cDNA, el Assay correspondiente y el Mix Taqman Universal MX™ (Applied Biosystems). Cada muestra se analizó por triplicado y en todos los ensayos se incluyeron controles negativos y positivos.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: incubación inicial a 50°C durante 2 min para activar la AmpErase UNG™, seguida de una incubación a 95°C durante 10 min para activar la AmpliTaq Gold polymerase™. A continuación, se amplificó durante 50 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15s e hibridación y extensión a 60°C durante 1 min. Los amplicones incluían uniones exónicas para conseguir especificidad del cDNA y evitar amplificación de posible ADN genómico contaminante. El tejido pulmonar tumoral y sano de cada paciente se empleó como control positivo de expresión de los genes analizados. Se empleó expresión

del gen GAPDH como control endógeno de calidad de la muestra (sano, tumoral y ganglio) y de la cantidad de mRNA analizado.

Los niveles de expresión se determinaron en función del valor del ciclo umbral (*Ct*, *Cycle threshold*) a partir del cual se detecta el producto de PCR mediante fluorescencia. Los valores de expresión para cada gen se calcularon con el método $\Delta\Delta Ct$, normalizando el *Ct* de cada gen frente al del gen endógeno (*GAPDH*) y frente al tejido sano. En las muestras de ganglio centinela, la expresión se calculó únicamente normalizando los valores frente al gen *GAPDH*.

Tabla 7. Sondas Taqman utilizadas para la determinación de la expresión génica mediante qPCR.

| Gen | Assay | Gen | Assay |
|---------|----------------|--------|---------------|
| BPIFA1 | Hs00213177_m1 | LAG-3 | Hs00958444_g1 |
| CD27 | Hs00386811_m1 | PD-1 | Hs01550088_m1 |
| CD28 | Hs01007422_m1 | PD-L1 | Hs00204257_m1 |
| CD40 | Hs01002915_g1 | PD-L2 | Hs00228839_m1 |
| CD137 | Hs00155512_m1 | PLUNC | Hs00213177_m1 |
| CDH1 | Hs01023894_m1 | SNAI1 | Hs00195591_m1 |
| CDH2 | Hs00983056_m1 | SNAI2 | Hs00161904_m1 |
| CEACAM5 | Hs00237075_m1 | OX-40 | Hs00937195_g1 |
| CK7 | Hs00559840_m1 | TIM-3 | Hs00958618_m1 |
| CTLA-4 | Hs00175480_m1 | TWIST1 | Hs01675818_s1 |
| GAPDH | Hs02758991_g1a | VIM | Hs00958111_m1 |
| GITR | Hs00188346_m1 | ZEB1 | Hs00232783_m1 |
| KIR | Hs00427106_m1 | ZEB2 | Hs00207691_m1 |

6. Metodología estadística

El análisis de los marcadores como variables cuantitativas se realizó empleando la mediana, la desviación típica y el intervalo. Para determinar qué marcadores eran estadísticamente significativos se utilizó el test Kruskal-Wallis.

Para analizar las variables como categóricas, los valores de expresión génica en tumor se clasificaron, en comparación con los tejidos normales adyacentes, como altos (>1) o bajos (<1). En el caso del ganglio centinela, el valor medio en el grupo se tomó como valor umbral para clasificar el nivel de expresión génica para cada ganglio centinela, considerándose valores menores al umbral como expresión alta y valores mayores al umbral como expresión baja. Para determinar la relación epitelio/mesénquima de las muestras, se calcularon las relaciones $CDH1/CDH2$ y $CDH1/VIM$.

Para analizar las diferencias de distribución de las variables categóricas empleamos el test Chi-cuadrado.

El coeficiente de correlación de Spearman (r) se utilizó para medir las correlaciones entre los niveles de expresión génica en los tejidos tumorales y el ganglio centinela.

Para analizar la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia general (SG) se usó la prueba de Kaplan-Meier. La SLE y la SG se refieren al tiempo pasado desde la resección quirúrgica completa hasta la recurrencia o la muerte, respectivamente. La recurrencia incluyó metástasis locorregionales, locales y distantes. Para los pacientes que todavía estaban libres de enfermedad, los datos fueron censurados en el momento de la última visita de seguimiento.

Los factores con influencia estadísticamente significativa en el análisis univariante se analizaron adicionalmente mediante análisis multivariante de log-rank y regresión de Cox.

En todos los casos el nivel mínimo de significancia se estableció en $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete R (v 4.0.0). Las gráficas se realizaron con este mismo software y con Microsoft Excel.

7. Autorización del estudio

El proyecto desarrollado cuenta con la autorización del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario de la Ribera según se adjunta.



INFORME DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN- COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN

Dr. Marcelo Galbis Caravajal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación- Comisión de Investigación del Departamento de Salud de La Ribera de la Comunidad Valenciana, Hospital Universitario de La Ribera de Alzira.

CERTIFICA

Que esta Comisión ha evaluado la propuesta del investigador principal-investigador responsable local Dr. Jose Marcelo Galbis Caravajal e investigadores colaboradores Arantzazu Lafuente Sanchis, Antonio Cremades Mira, Rosa Farrás, Carolina Gandia Ventura, Julián Carretero, Javier Pereda y Manuel Mata para que se realice el proyecto de investigación titulado: **"Estudio del papel de la EMT y de las vías de control inmunológico en las micrometástasis moleculares detectadas en ganglio centinela de pacientes con carcinoma broncopulmonar en estadio temprano."**

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del Proyecto de Investigación en relación con los objetivos.

La capacidad de los investigadores.

La adecuación del proyecto a los medios existentes en este Centro.

La adecuada elaboración y presentación de la Memoria.

La conveniencia e interés de los resultados para el Departamento de Salud y el Sistema Nacional de Salud.

Y que esta Comisión acepta que dicho proyecto sea realizado en el Departamento de Salud de La Ribera/ Hospital Universitario de La Ribera por Jose Marcelo Galbis Caravajal, Arantzazu Lafuente Sanchis, Antonio Cremades Mira, Rosa Farrás, Carolina Gandia Ventura, Julián Carretero, Javier Pereda y Manuel Mata como investigadores.

Lo que firmo en Alzira, 11 de enero de 2017

HOSPITAL UNIVERSITARIO
de LA RIBERA
Comisión de Investigación
Fdo.: Dr. Jose Marcelo Galbis

RESULTADOS

1. Características de la serie de pacientes

1.1 Características clínicas

Atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión (detallados en el punto 2 de materiales y métodos), el estudio se llevó a cabo en un total de 101 pacientes.

El 56,44% de los pacientes eran mayores de 65 años y el grupo más frecuente fue el de los hombres (80,20%) (Tabla 8). Además, la mayoría de los casos presentaron un adenocarcinoma (61,39%) en estadio I (70,30%), con grado de diferenciación I (39,60%) (Tabla 8).

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio.

| Variable | n | % |
|-----------------|----------|----------|
| Edad | | |
| > 65 | 57 | 56,44 |
| ≤ 65 | 44 | 43,56 |
| Sexo | | |
| Hombre | 81 | 80,20 |
| Mujer | 20 | 19,80 |
| Tabaquismo | | |
| Fumador | 42 | 41,58 |
| No fumador | 18 | 17,82 |
| Ex fumador | 32 | 31,68 |
| Sin datos | 9 | 8,91 |
| Histología | | |
| Adenocarcinoma | 62 | 61,39 |
| Epidermoide | 23 | 22,77 |
| Adenoescamoso | 4 | 3,96 |
| Neuroendocrino | 12 | 11,88 |
| Estadio | | |
| I | 71 | 70,30 |
| II | 21 | 20,79 |
| III | 6 | 5,94 |

Resultados

| | | |
|-------------------------|----|-------|
| IV | 1 | 0,99 |
| Sin datos | 2 | 1,98 |
| Grado de diferenciación | | |
| I | 40 | 39,60 |
| II | 32 | 31,68 |
| III | 24 | 23,76 |
| IV | 2 | 1,98 |
| Sin datos | 3 | 2,97 |

1.2 Factores clínicos con valor pronóstico

En primer lugar, llevamos a cabo el estudio tanto de la supervivencia global (SG) como de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) para cada una de las características clínicas que se muestran en la tabla 8.

1.2.1 Factores clínico-patológicos y SG

En nuestro estudio no encontramos diferencias en la SG en función de edad ($p=0,6$, Figura 10A) y el sexo ($p=0,71$, Figura 10B). Los pacientes menores de 65 años presentaron una mediana de SG de 53 meses, mientras que en los mayores de 65 no se llegó al 50% de defunciones.

En base al hábito tabáquico, tampoco encontramos diferencias entre los 3 grupos: fumadores, exfumadores y no fumadores ($p=0,12$). Cuando los agrupamos en no fumadores vs fumadores o ex fumadores, seguimos sin observar diferencias estadísticamente significativas ($p=0,064$, Figura 10C), aunque observamos una clara tendencia a favor de los no fumadores. Probablemente si contáramos con una serie más amplia esta diferencia sería significativa. En cualquier caso, nuestros datos

confirman la importancia del hábito tabáquico en la progresión del cáncer de pulmón (REF 18).

Atendiendo al tipo de tumor, el análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas ($p=0,28$, Figura 10D), aunque sí las observamos en función del estadio ($p=0,00024$, Figura 10E) y el grado de diferenciación ($p=0,043$, Figura 10F), cuando comparamos los pacientes con tumores de grado I vs pacientes con tumores con grados II, III y IV.

Resultados

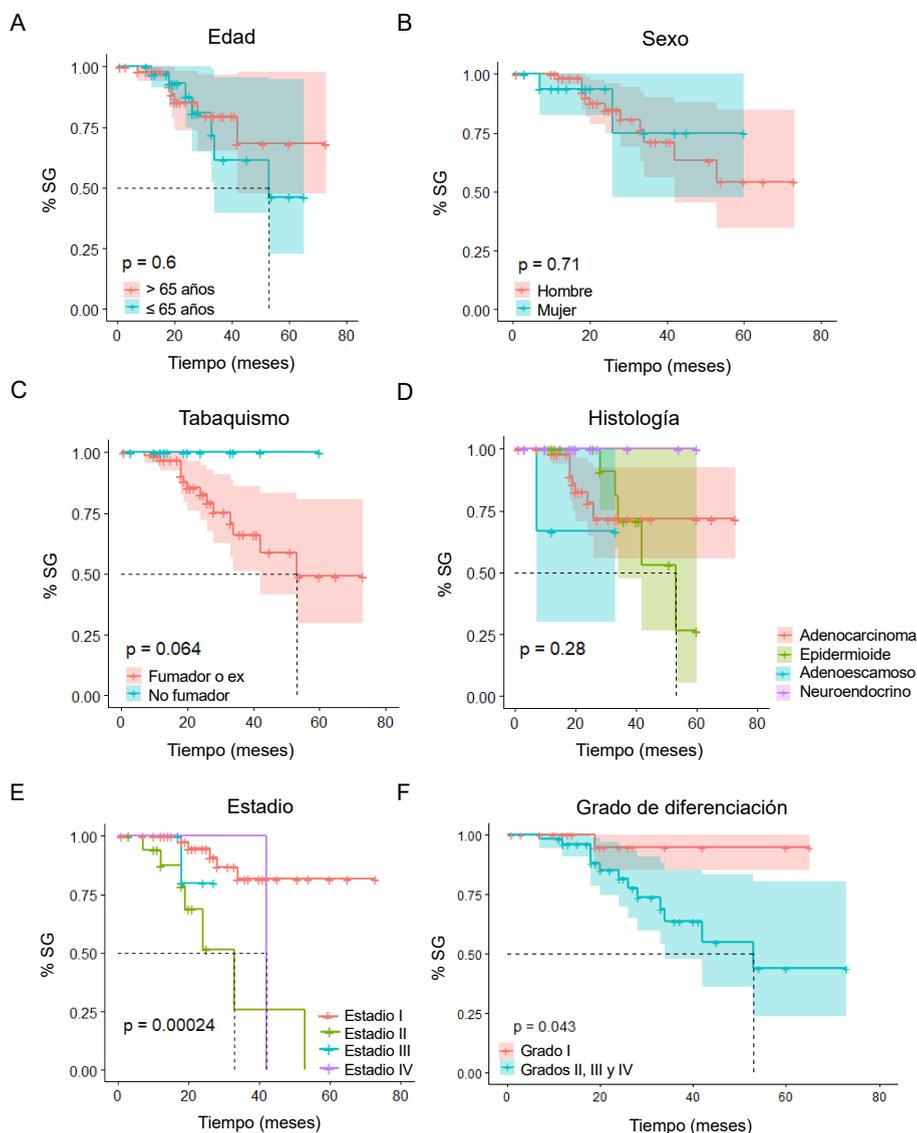


Figura 10. Curvas de supervivencia global (SG) de la serie de pacientes en función de las características clínicas. En las curvas según el estadio no se pudieron establecer los intervalos de confianza debido a que sólo hay un paciente de estadio IV.

1.2.2 Factores clínico-patológicos y SLE

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la SLE tanto para la edad ($p=0,91$; Figura 11A) como para el sexo ($p=0,52$; Figura 11B). La mediana de meses libres de enfermedad para los mayores de 65 años fue de 48 meses mientras que la de los menores de 65 años fue de 42 meses. Por su parte, la de los hombres fue de 42 meses, mientras que la de las mujeres no se pudo calcular porque no se llegó al 50% de defunciones.

En cuanto al tabaquismo, no observamos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,19$) entre fumadores, exfumadores y no fumadores, siendo la mediana de 42 y 33 meses para los dos primeros, respectivamente. En no fumadores no se alcanzó el 50% de eventos. Al igual que sucedía con la SG, al agrupar los pacientes en fumadores o exfumadores vs no fumadores tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,06$; Figura 11C) a pesar de la tendencia a favor de los no fumadores.

Tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de tumores en función de la histología ($p=0,25$; Figura 11D). Únicamente pudimos establecer la mediana para el adenocarcinoma (33 meses) y el epidermoide (48 meses) debido al reducido número de pacientes que presentaron el resto de tumores.

Por el contrario, sí que existe una diferencia estadísticamente significativa en la SLE en función del estadio ($p=0,0027$; Figura 11E). Además, si comparamos la SLE de los pacientes con estadio I (el grupo mayoritario) con el resto (II, III y IV) también observamos una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,006$). La mediana de

Resultados

supervivencia para los distintos estadios fue de 48 meses para estadio I, 12 meses para estadio II, 17 meses para estadio III y 8 meses para estadio IV.

Por último, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la SLE en función del grado de diferenciación ($p=0,14$). Sin embargo, al analizar la diferencia entre el grado I y el resto sí que observamos diferencias ($p=0,049$; Figura 11F). En este caso la mediana de meses libres de enfermedad fue de 33 meses para los grados II, III y IV, mientras que los pacientes con grado I no llegaron al 50% de eventos (Figura 11F).

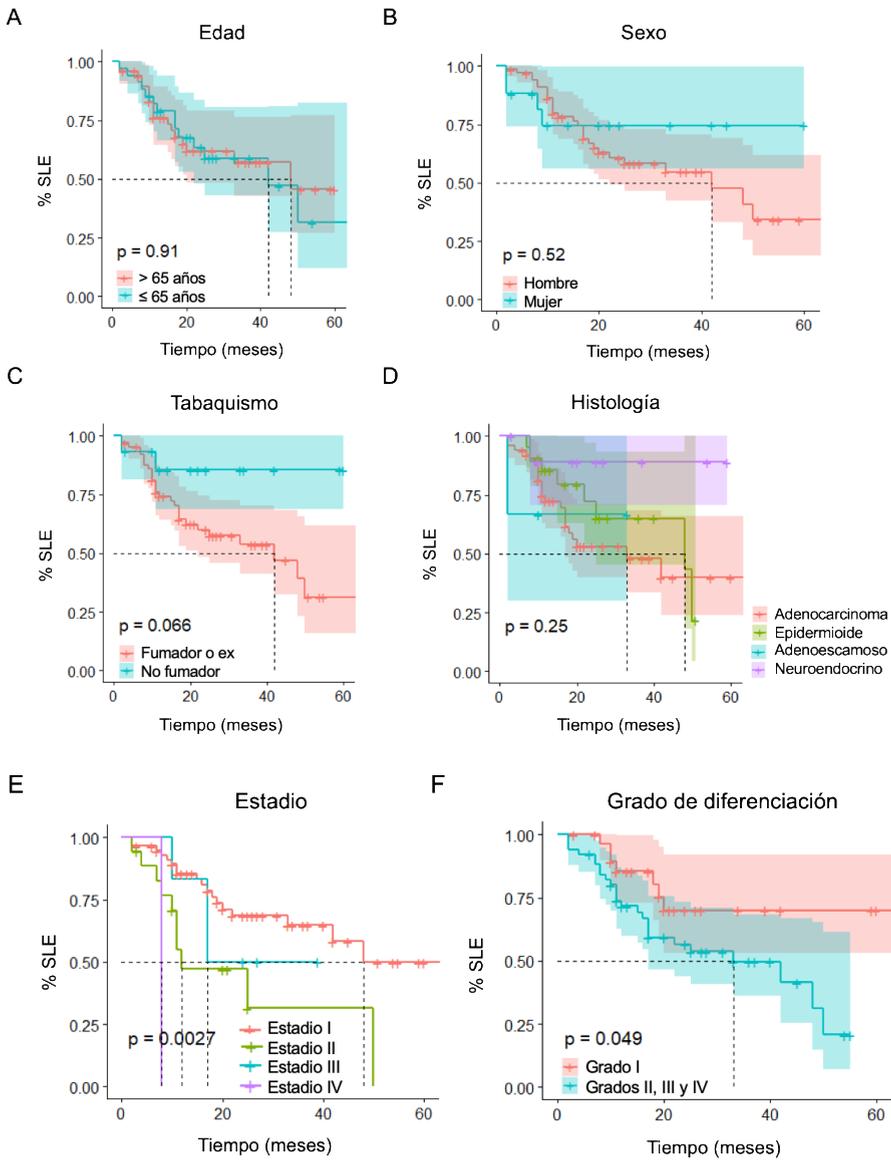


Figura 11. Curvas de supervivencia libre de enfermedad (SLE) de la serie de pacientes en función de las características clínicas. En las curvas según el estadio no se pudieron establecer los intervalos de confianza debido a que sólo hay un paciente de estadio IV.

2. Presencia de micrometástasis en ganglio centinela

Para estudiar la presencia de micrometástasis moleculares en el GC analizamos la expresión de tres marcadores: *CK7*, *CEACAM5* y *BPIFA1*. Estos genes, que muestran una expresión constitutiva en tejido de pulmón, no se expresan en GC o bien su expresión es muy baja por lo que su presencia en GC se considera indicativa de micrometástasis molecular (Benlloch et al., 2009; Lafuente et al., 2018).

En nuestra serie de pacientes, solo pudimos realizar la determinación molecular en 96 (95,05%) de ellos. De todos ellos, 60 (62,50%) presentaron presencia de micrometástasis molecular en GC. De los positivos, en 52 (55,32%) detectamos expresión de *CK7*, en 36 (38,30%) de *CEACAM5* y en 30 (31,91%) la presencia de *BPIFA1* (Figura 11). En 20 muestras de GC detectamos expresión de los tres marcadores de micrometástasis.

En nuestro análisis encontramos que la expresión en GC de estos marcadores puede ocurrir en solitario o junto con los otros marcadores. Así pues, observamos expresión de *CK7* como único gen marcadores o asociado a los otros dos, igual que sucedió con *CEACAM5*. Por el contrario, la expresión de *BPIFA1* siempre fue concomitante con al menos otro de los marcadores (Figura 12). Como era esperable, tanto en tejido normal como pulmonar pudimos detectar expresión de estos marcadores.

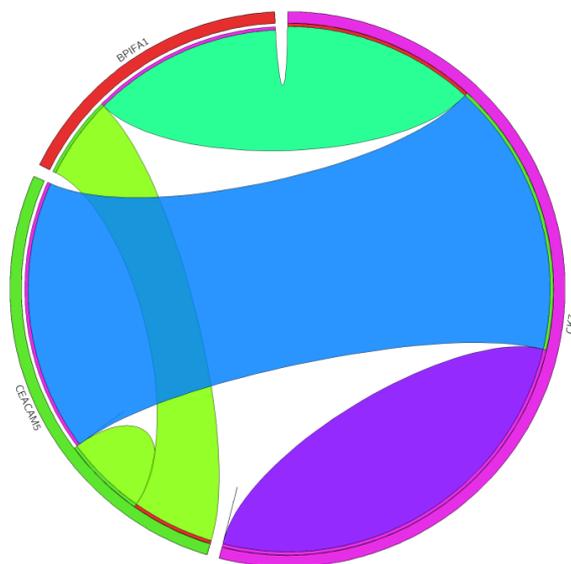


Figura 12. Diagrama de circo que muestra la presencia de genes marcadores de micrometástasis en GC en nuestra serie de pacientes (n=96). BPIFA1 siempre se expresa junto con otro marcador.

Por otra parte, también estudiamos la presencia de micrometástasis en GC mediante IHQ. Para ello evaluamos la presencia del marcador histológico de tejido pulmonar CK7. La presencia de células positivas para este marcador en GC era indicativa de micrometástasis.

En este caso observamos que 15 (14,85%) muestras de GC fueron positivas para micrometástasis. De todas ellas, en 9 muestras también se detectó la presencia de marcadores moleculares de micrometástasis (Figura 13).

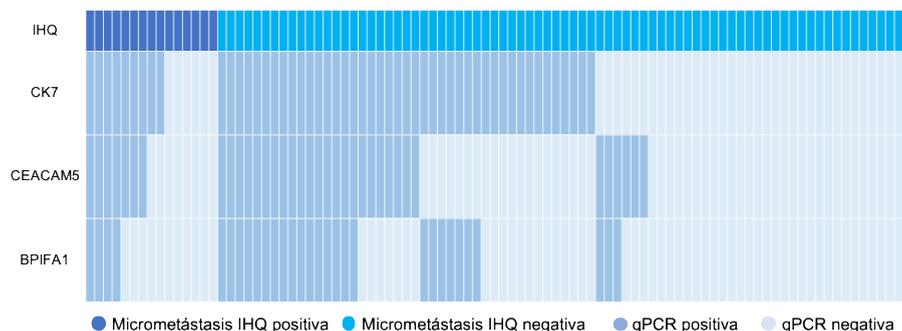


Figura 13. Distribución de las micrometástasis detectadas en GC mediante inmunohistoquímica (IHQ) y qPCR.

3. Estudio de la expresión de marcadores de transición de epitelio-mesénquima (EMT)

La EMT es uno de los principales factores de progresión del cáncer (Xiao y He, 2010; Steinestel *et al.*, 2014). Durante este proceso en las células epiteliales disminuye la expresión de genes característicos del epitelio, como la E-Cadherina (*CDH1*), y aumenta la de genes mesenquimales, como la N-Cadherina (*CDH2*) y la Vimentina (*VIM*), además de otros factores de transcripción como *SNAI*, *ZEB* y *TWIST* (Hay ED, 1995; Kalluri y Weinberg, 2009; Dianbo *et al.*, 2011; Mathot L, 2012; Yulong *et al.*, 2013; Nieto *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2016).

3.1 Expresión de marcadores EMT en tumor primario comparado con tejido normal

Comparado con el tejido normal, 46 tumores primarios (48,42%) mostraron una reducción en la expresión del gen *CDH1*, mientras que 52 muestras (54,74%) mostraron un aumento en la

expresión de *CDH2*. Además, 32 pacientes (33,68%) mostraron una sobre-expresión de *TWIST1*, 16 (16,84%) de *VIM*, 33 (35,11%) de *SNAI1*, 39 (41,05%) de *SNAI2*, 24 (25,53%) de *ZEB1* y 21 (22,58%) de *ZEB2* (Figura 14). Asimismo, el análisis de distribución de los marcadores de EMT en tejido pulmonar no mostró diferencias estadísticamente significativas en función del resultado de la micrometástasis determinada mediante qPCR ($p > 0,05$) (Figura 14B).

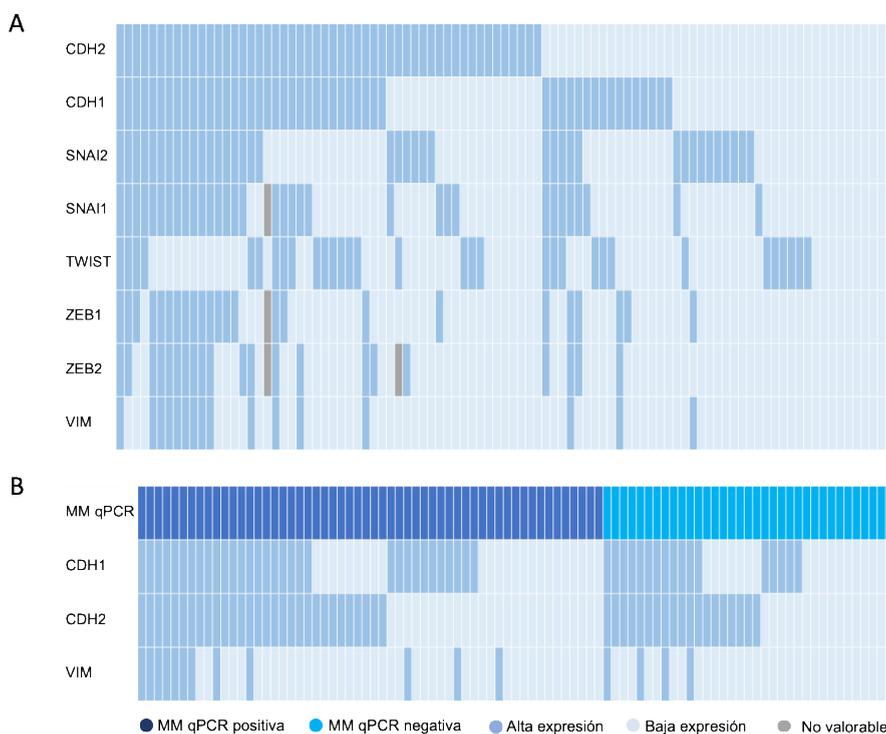


Figura 14. Expresión de los marcadores de EMT en tejido tumoral de pulmón. A. Distribución de la expresión de los marcadores de EMT en tumor de cada paciente. B. Representación de los marcadores de EMT CDH1, CDH2 y VIM en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

Resultados

Sin embargo, sí observamos diferencias en la expresión de algunos de los marcadores de EMT en función de micrometástasis determinada por IHQ. Tanto *VIM* ($p=0,018$), como *SNAI1* ($p=0,046$), *ZEB1* ($p=0,027$) y *ZEB2* ($p=0,025$) mostraron una mayor expresión en tumores con un resultado positivo en el análisis de micrometástasis mediante IHQ (Figura 15).

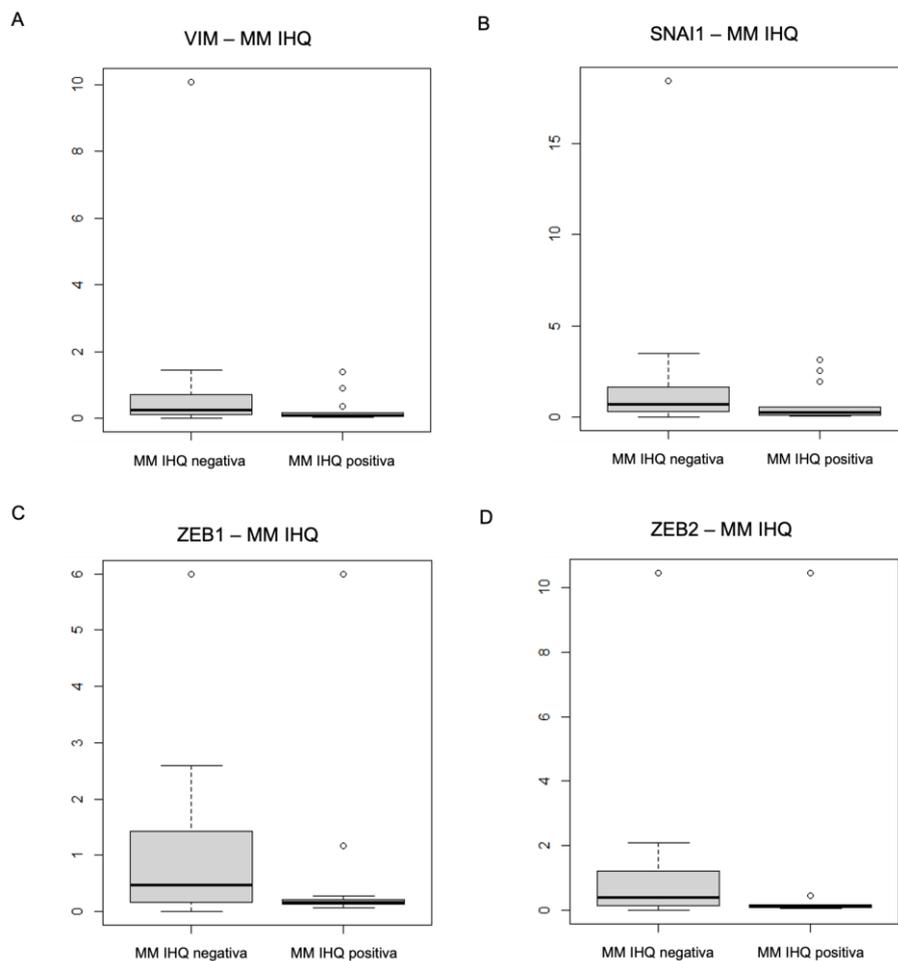


Figura 15. Expresión de marcadores de EMT en tumor en función de la micrometástasis detectada por IHQ. Todos los genes con diferencias de

expresión significativas (A, VIM; B, SNAI1; C, ZEB1; D, ZEB2) mostraron una mayor expresión en los pacientes con un resultado negativo de para la micrometástasis detectada por IHQ. MM IHQ: micrometástasis detectada mediante IHQ.

3.2. Expresión de marcadores de EMT en ganglio centinela

Del mismo modo que en el punto anterior, analizamos la expresión de los marcadores de EMT en GC. En este caso cabe destacar que no se comparó la expresión de los genes relacionados con EMT en GC con un tejido sano de referencia.

En primer lugar, dicotomizamos la expresión de estos genes en función del gen control *GAPDH* en la misma muestra de GC. De este modo, un valor de *Ct* del gen de interés menor que el valor *Ct* de *GAPDH* indica una alta expresión y, por el contrario, si el *Ct* es mayor que el del control indica una baja expresión del marcador.

Así pues, el análisis reveló una baja expresión de *CDH1* en 33 (34,74%) muestras de GC y una alta expresión de *CDH2* en 58 (61,05%) de ellas. Además, 49 pacientes (51,58%) mostraron una elevada expresión de *TWIST1*, 59 (62,10%) de *VIM*, 52 (55,32%) de *SNAI1*, 57 (60,00%) de *SNAI2*, 59 (62,77%) de *ZEB1* y 54 (58,06%) de *ZEB2* (Figura 16A).

En GC también evaluamos la relación entre la presencia de micrometástasis y los marcadores de EMT. El análisis estadístico reveló que *VIM* mostró diferencias en la distribución en función de la micrometástasis por qPCR ($p=0,000024$, Figura 16B).

Resultados

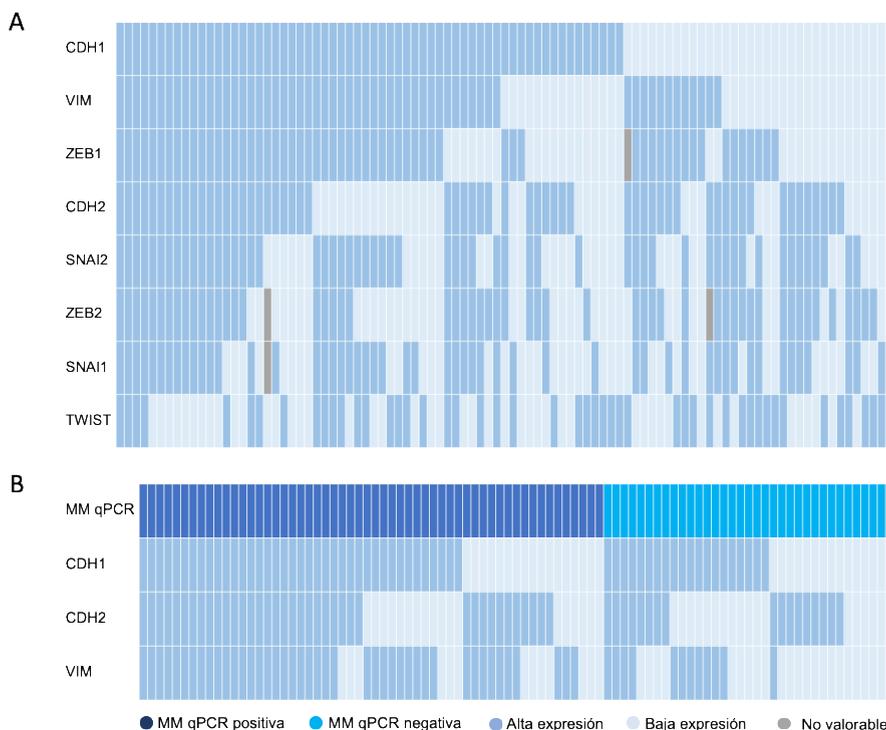


Figura 16. Expresión de los marcadores de EMT en GC. A. Distribución de la expresión de los marcadores de EMT en GC de cada paciente. B. Representación de los marcadores CDH1, CDH2 y VIM en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

Además, cuando se analizaron los valores de expresión de los marcadores como una variable continua (ΔCt respecto de *GAPDH*), únicamente *CDH2* mostró una expresión significativamente mayor en GC en función de la micrometástasis detectada por qPCR ($p=0,029$, Figura 17A), lo que indica un fenotipo más mesenquimal. Por otra parte, y atendiendo también a los valores de expresión, *TWIST* mostró una menor expresión en pacientes con micrometástasis positiva por IHQ ($p=0,047$, Figura 17B). Es

importante recordar que un menor valor de ΔCt en realidad indica una mayor expresión respecto al gen control.

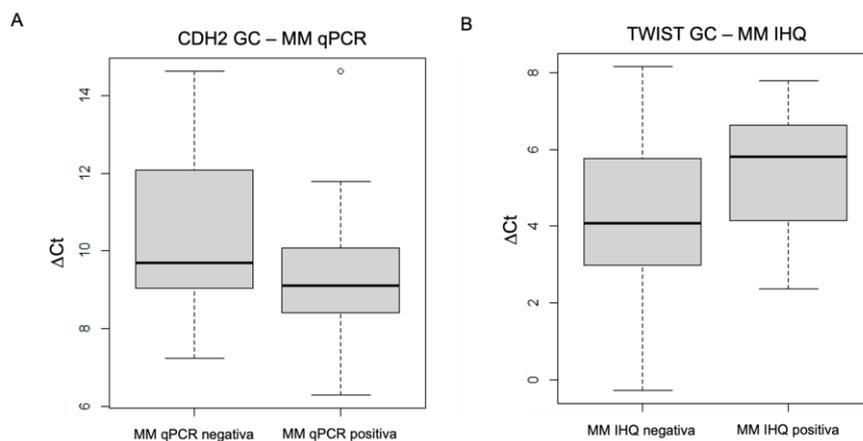


Figura 17. Expresión de marcadores de EMT en GC en función de la micrometástasis. A. Expresión del gen CDH2 en GC según la presencia de micrometástasis detectada por qPCR. B. Expresión del gen TWIST en GC según la presencia de micrometástasis detectada por IHQ. MM qPCR: micrometástasis determinada por qPCR, MM IHQ: micrometástasis detectada mediante IHQ.

3.3. Correlación entre marcadores de EMT en tumor primario y GC

Como parte del estudio, llevamos a cabo un análisis de correlación entre los distintos marcadores de EMT, tanto dentro del mismo tejido como comparando ambos (tumor y GC). Solamente consideramos aquellas correlaciones con un valor de coeficiente de Pearson (r) mayor que 0,75.

Resultados

El análisis de correlación mostró una fuerte asociación ($r > 0,75$, $p < 0,05$) entre los marcadores *SNAI1*, *ZEB1*, *ZEB2* y *VIM* tanto en tumor como en GC, dentro del mismo tejido (Tabla 9, valores en negrita). En el caso del GC, además de los marcadores anteriores, observamos una correlación con *SNAI2* (Tabla 9, valores en negrita). Es necesario comentar que no apreciamos correlaciones destacables entre el tumor y el GC.

Por otra parte, calculamos las ratios *CDH1/CDH2* y *CDH1/VIM*, con el objetivo de determinar si el fenotipo era más epitelial o mesenquimal. En primer lugar, únicamente observamos diferencias significativas en la ratio *CDH1/CDH2* en GC, con un mayor número de pacientes con una baja ratio ($p = 0.03$). Además, y a pesar de haber correlaciones significativas, tampoco encontramos una fuerte correlación con otros marcadores; ni dentro del mismo tejido, ni comparando tumor y GC (Tabla 9).

Tabla 9. Correlación entre todos los marcadores de EMT estudiados entre tumor y GC. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p < 0,05$). Aquellas correlaciones con un valor superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

3.4. Correlación entre marcadores de EMT en tumor primario y GC y micrometástasis

De igual modo que en el punto anterior, estudiamos la correlación de los marcadores de EMT en aquellos pacientes que presentaron micrometástasis positiva determinada por qPCR (Tabla 10).

En este contexto, observamos, además de las correlaciones anteriores, una correlación significativa entre *SNAI1* en tumor y *SNAI2*, *VIM*, *ZEB1* y *ZEB2* en GC, aunque con un valor menor que 0,75 (Tabla 10).

Tabla 10. Correlación entre todos los marcadores de EMT estudiados entre tumor y GC en pacientes con un resultado positivo para micrometástasis. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p < 0,05$). Aquellas correlaciones con un valor igual o superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

4. Expresión de marcadores de sistema inmunitario

Durante el desarrollo de un tumor, las células tumorales expresan antígenos que resultan extraños al sistema inmunitario, el cual las reconoce como malignas y activa una respuesta para eliminarlas.

Es por esto que el estudio de la activación del sistema inmunitario a través de la expresión de marcadores de diferentes vías y de células infiltradas nos podría ayudar a diferenciar las metástasis que van a progresar de las que no.

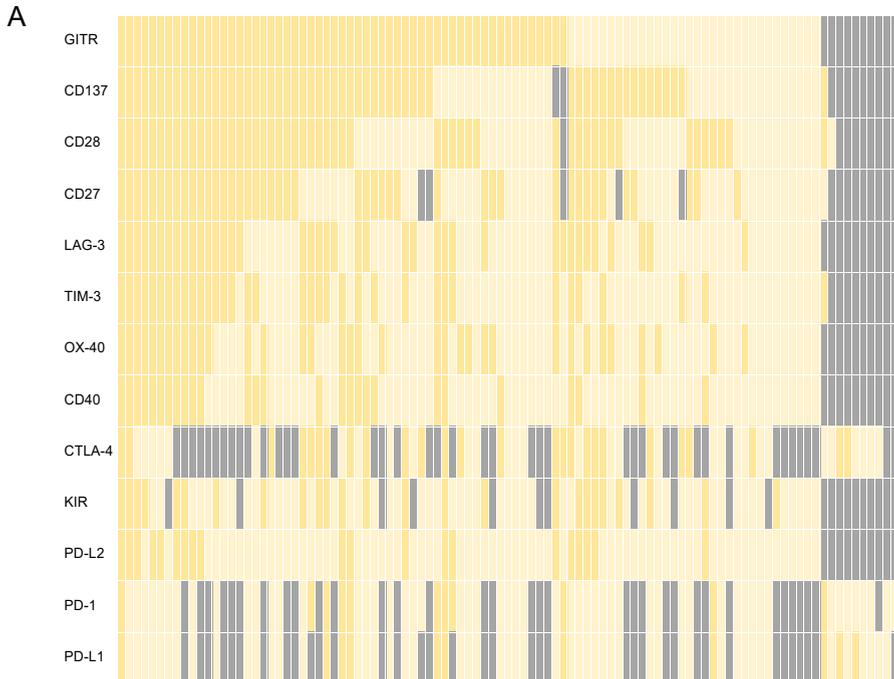
4.1 Expresión de marcadores de sistema inmunitario en tumor primario

En los tumores primarios encontramos, comparando con tejido normal, que los marcadores con alta expresión que aparecieron con mayor frecuencia fueron *GITR* (64,04%) y *CD137* (63,64%), mientras que *PD-1* y *PD-L1* fueron los que mostraron una menor frecuencia (16,92% y 17,71%, respectivamente) (Tabla 11, Figura 18A).

El análisis de distribución, según la presencia o no de micrometástasis, mostró diferencias significativas para los marcadores *CD27* ($p=0,038$) y *CD137* ($p=0,042$) en los pacientes con MM positiva determinada mediante qPCR (Figura 18B).

Tabla 11. Distribución de los pacientes con alta y baja expresión de los marcadores inmunológicos en tejido tumoral.

| Marcador | Alta expresión (%) | Baja expresión (%) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| CD27 | 44 (51,76) | 41 (48,24) |
| CD28 | 51 (56,67) | 39 (43,33) |
| CD40 | 27 (30,34) | 62 (69,66) |
| CD137 | 56 (63,64) | 32 (36,36) |
| CTLA-4 | 26 (45,61) | 31 (54,39) |
| GITR | 57 (64,04) | 32 (35,96) |
| KIR | 25 (28,09) | 64 (71,91) |
| LAG-3 | 39 (43,82) | 50 (56,18) |
| OX-40 | 35 (39,33) | 54 (60,67) |
| PD-1 | 11 (16,92) | 54 (83,08) |
| PD-L1 | 11 (17,74) | 51 (82,26) |
| PD-L2 | 20 (22,47) | 69 (77,53) |
| TIM-3 | 35 (38,89) | 55 (61,11) |



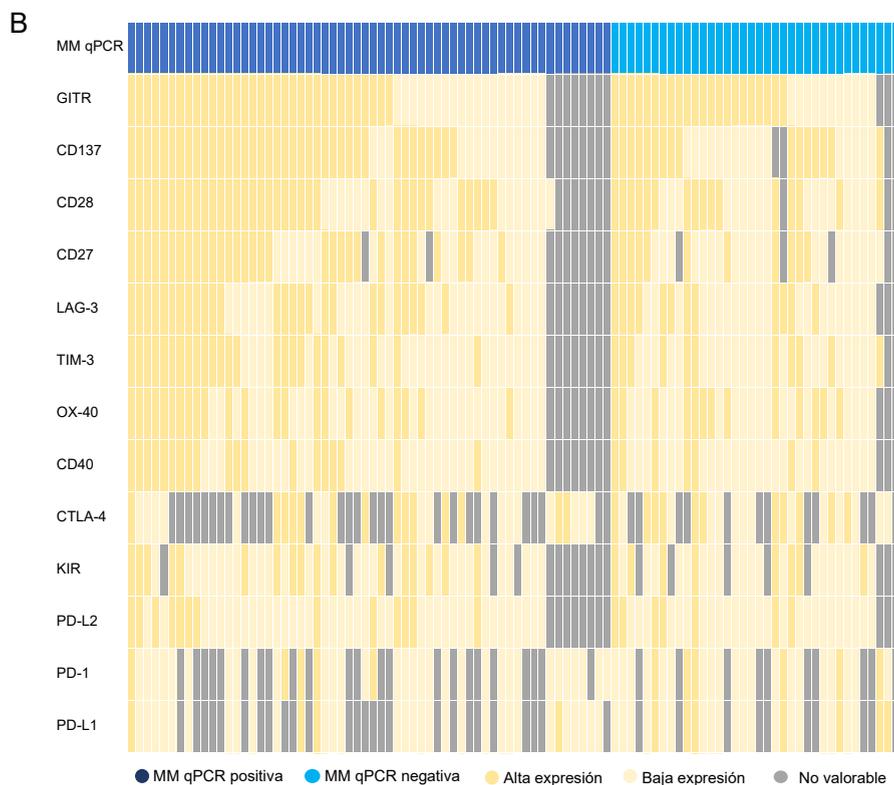


Figura 18. Expresión de los marcadores inmunológicos en tumor. A. Distribución de la expresión de los marcadores de inmunológicos en tumor de cada paciente. B. Representación de los mismos marcadores en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

Por otra parte, cuando analizamos la expresión de forma cuantitativa en función de la micrometástasis, encontramos una mayor expresión de *CD27* ($p=0,005$, Figura 19A), *CD28* ($p=0,029$, Figura 19C) y *CD40* ($p=0,025$, Figura 19D) en los tumores de los pacientes con micrometástasis positiva por qPCR. Sin embargo, la expresión de *CD27* fue menor en pacientes con micrometástasis positiva detectada mediante IHQ ($p=0,014$, Figura 19B).

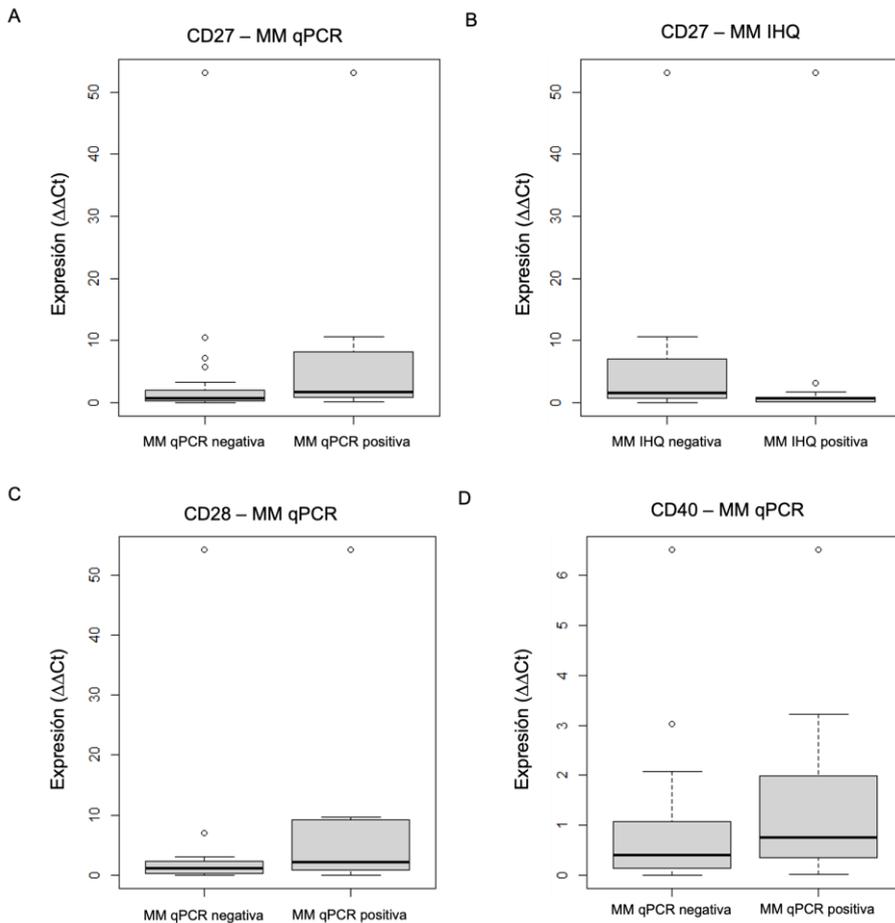


Figura 19. Expresión de marcadores inmunológicos en tumor en función de la micrometástasis. Todos los marcadores con diferencias de expresión significativas en micrometástasis positivas por qPCR (A, CD27; C, CD28; D, CD40) mostraron una mayor expresión. A su vez CD27 mostró una mayor expresión en los pacientes con un resultado negativo de para la micrometástasis detectada por IHQ (B). MM qPCR: micrometástasis determinada por qPCR, MM IHQ: micrometástasis detectada mediante IHQ.

4.2 Expresión de marcadores de sistema inmunitario en GC

Para estudiar la expresión de los marcadores del sistema inmunitario en GC dicotomizamos los datos de la misma manera que hicimos con los marcadores de EMT (punto 3.2 de los resultados).

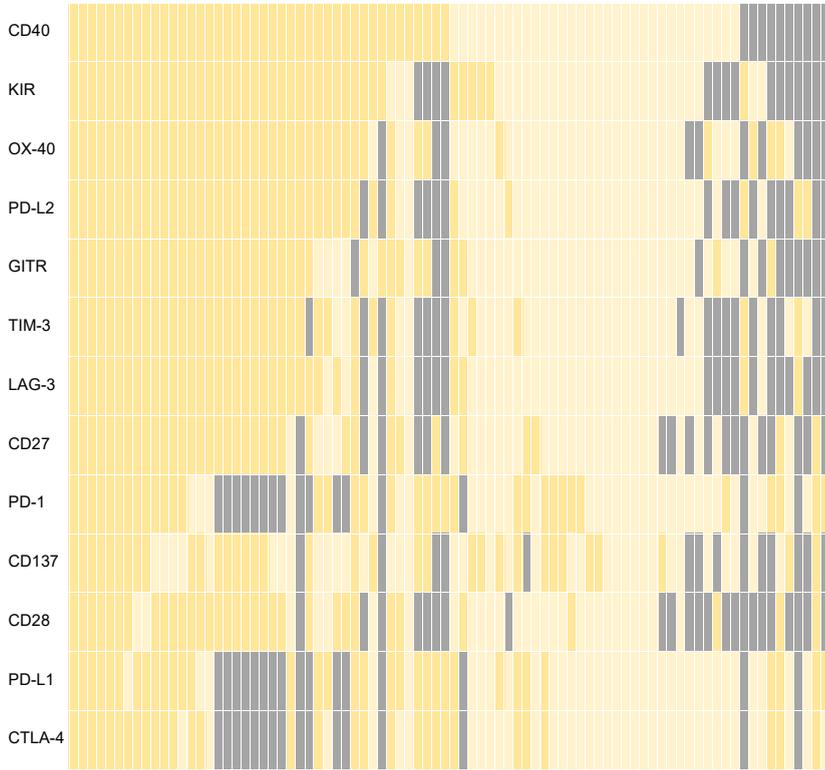
En GC encontramos que los marcadores con alta expresión que aparecieron con mayor frecuencia fueron *GITR* (59,68%), igual que en tumor, y *KIR* (59,42%) (Tabla 12, Figura 20A).

El análisis de distribución en función del resultado de micrometástasis obtenido mediante qPCR mostró que los pacientes con un resultado positivo presentaron una mayor expresión de los marcadores *LAG-3* ($p=0,038$) y *CD137* ($p=0,022$) (Figura 20B).

Tabla 12. Distribución de los pacientes con alta y baja expresión de los marcadores inmunológicos en GC.

| Marcador | Alta expresión (%) | Baja expresión (%) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| CD27 | 35 (53,03) | 31 (46,97) |
| CD28 | 33 (54,10) | 28 (45,90) |
| CD40 | 42 (56,76) | 32 (43,24) |
| CD137 | 34 (48,57) | 36 (51,43) |
| CTLA-4 | 30 (44,12) | 38 (55,88) |
| GITR | 37 (59,68) | 25 (40,32) |
| KIR | 41 (59,42) | 28 (40,58) |
| LAG-3 | 35 (52,24) | 32 (47,76) |
| OX-40 | 41 (56,16) | 32 (43,84) |
| PD-1 | 35 (51,47) | 33 (48,53) |
| PD-L1 | 33 (48,53) | 35 (51,47) |
| PD-L2 | 39 (56,52) | 30 (43,48) |
| TIM-3 | 36 (53,73) | 31 (46,27) |

A



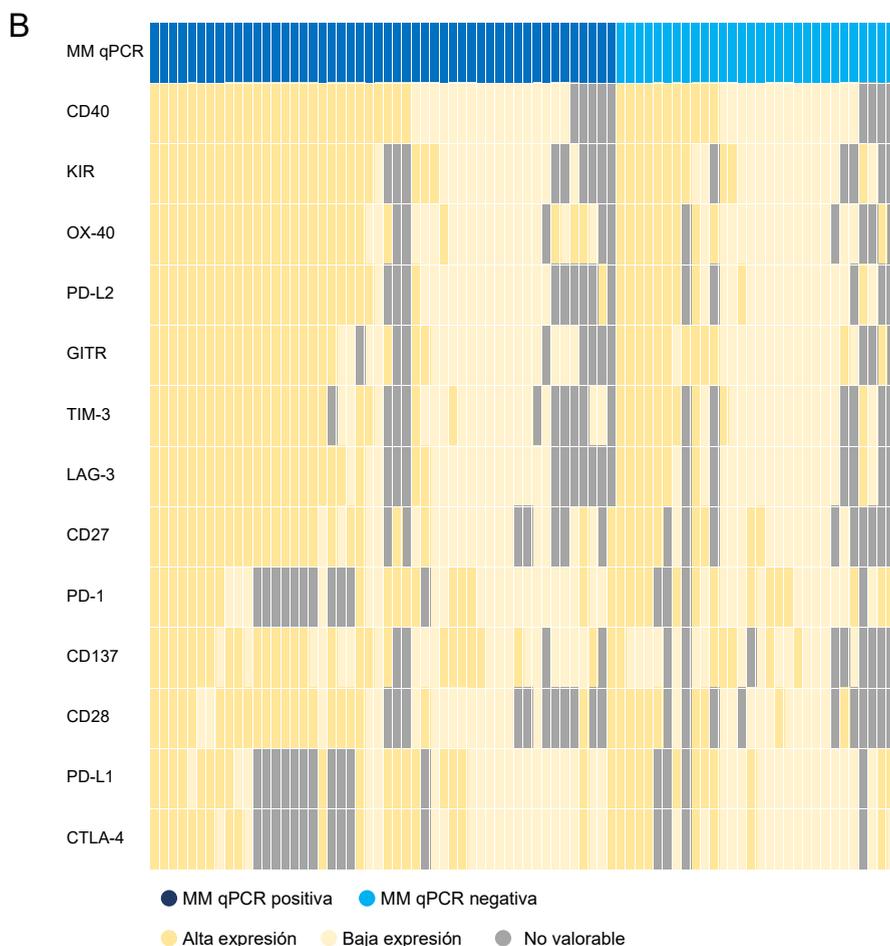


Figura 20. Expresión de los marcadores inmunológicos en GC. A. Representación de la expresión de los marcadores de inmunológicos en tumor de cada paciente. B. Distribución de los mismos marcadores en función de la micrometástasis determinada por qPCR.

El análisis de la expresión en función de la micrometástasis, reveló una mayor expresión de los marcadores *CD40* ($p=0,034$, Figura 21A), *KIR* ($p=0,017$, Figura 21B), *PD-L2* ($p=0,012$, Figura 21C) y *OX-40* ($p=0,026$, Figura 21D) en los pacientes con

micrometástasis positiva determinada mediante qPCR. Como ya indicamos en el punto 3.2 de este mismo apartado, un menor valor de ΔCt indica una mayor expresión respecto al gen control.

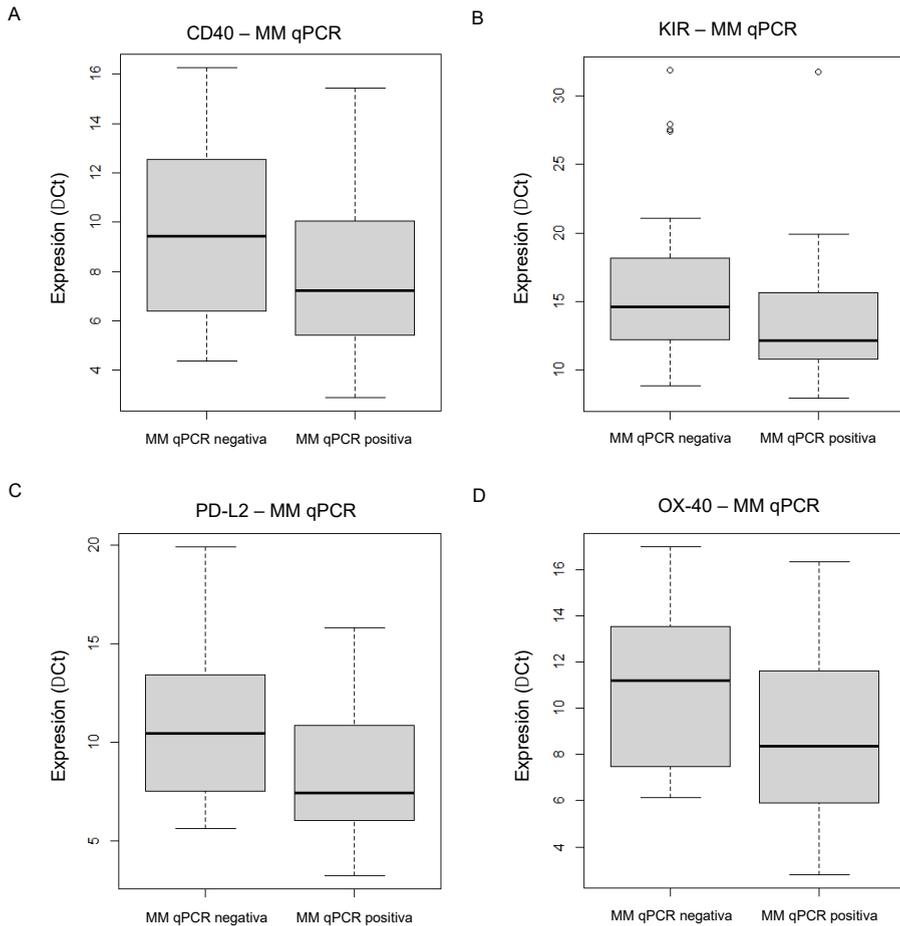


Figura 21. Expresión de marcadores del sistema inmunitario en GC en función de la micrometástasis detectada por qPCR. Todos los marcadores con diferencias de expresión significativas (A, CD40; B, KIR; C, PDC; D, T4) mostraron una mayor expresión en los pacientes con micrometástasis positivas por qPCR. MM qPCR: micrometástasis determinada por qPCR.

4.3 Correlación entre marcadores de sistema inmunitario en tumor primario y GC

Del mismo modo que hicimos con los marcadores de EMT, estudiamos la relación de los marcadores del sistema inmunitario tanto dentro del mismo tejido, como comparando tumor y GC, y únicamente consideramos relevantes las correlaciones con un valor de coeficiente mayor que 0,75.

El análisis de correlación no reveló una fuerte asociación entre marcadores en tumor. Sin embargo, en GC todos los marcadores presentaron una correlación significativa entre sí excepto *CD137*, cuya correlación más importante fue con *CD137* en tumor ($r=-1$, $p<0,05$). Es necesario comentar que debido al uso de distintos métodos de análisis de expresión en tumor y en GC, un valor negativo del coeficiente entre el tumor y el GC en realidad indica una relación directa. Además, dentro del GC es destacable la correlación entre *CD27* y *CD28* con *CD40* y *GITR* (todos $r >0,75$, $p<0,05$), *PD-1*, *PDL-1* y *CTLA-4* entre sí. *CD40* en GC fue el marcador para el que observamos un mayor número de correlaciones con otros marcadores en GC con un $r>0,75$ (*TIM-3*, *PD-L2*, *LAG-3*, *CD27*, *CD28*, *GITR* y *OX-40*) (Tabla 13).

Tabla 13. Correlación entre todos los marcadores del sistema inmunitario estudiados entre tumor y GC. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p<0,05$). Aquellas correlaciones con un valor superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

4.4 Correlación entre marcadores de sistema inmunitario en tumor primario y GC y micrometástasis

De igual manera, estudiamos la correlación de estos mismos marcadores en aquellos pacientes que presentaron micrometástasis positiva determinada por qPCR (Tabla 14).

En general observamos las mismas correlaciones, aunque con un mayor valor del coeficiente de correlación (ej: CD27 y CD28 con T4 en GC). Es especialmente destacable que encontramos un mayor grado de correlación entre los marcadores CD27 y T9 en tumor ($r=1$, $p<0,05$) (Tabla 14).

Tabla 14. Correlación entre todos los marcadores del sistema inmunitario estudiados entre tumor y GC en pacientes con un resultado positivo para micrometástasis. En azul se indican las correlaciones positivas y en rojo las negativas. Los valores indicados corresponden al coeficiente de correlación y son significativos ($p<0,05$). Aquellas correlaciones con un valor igual o superior a 0,75 están resaltadas en negrita. T, tumor; GC, ganglio centinela.

5. Expresión de los marcadores moleculares según las características clínico-patológicas

En nuestro estudio analizamos la expresión de los distintos marcadores, tanto de EMT como del sistema inmunitario, en función de las características clínico-patológicas.

En tumor, observamos diferencias significativas en la expresión *SNAI2* entre hombres y mujeres (siendo más alta en hombres), y de *CDH2* y *VIM* en función del tipo de tumor (Tabla 15). En cuanto al GC, observamos una mayor expresión de *SNAI1* en mujeres, así como diferencias en la expresión de *CDH1* y de *TWIST* en función de la histología y del estadio del tumor, respectivamente (Tabla 16).

Tabla 15. Expresión de los marcadores de EMT en tejido tumoral en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 16. Expresión de los marcadores de EMT en GC en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 15. Expresión de los marcadores de EWMT en tejido tumoral.

| Variables | n | CDH1 | CDH2 | TWIST | VIM | SNAI1 | SNAI2 | ZEB1 | ZEB2 |
|-------------------------|----|----------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
| Edad | | | | | | | | | |
| > 65 | 57 | 1,62 (0,60, 5,66) | 1,03 (0,16, 11,35) | 1,02 (0,41, 1,37) | 0,19 (0,10, 0,65) | 0,71 (0,24, 1,54) | 0,71 (0,32, 2,29) | 0,43 (0,12, 1,38) | 0,40 (0,12, 1,02) |
| ≤ 65 | 44 | 1,04 (0,29, 2,95) | 2,45 (0,53, 17,07) | 0,86 (0,38, 1,57) | 0,23 (0,11, 0,64) | 0,55 (0,25, 1,82) | 0,94 (0,19, 2,99) | 0,28 (0,15, 1,23) | 0,20 (0,11, 0,95) |
| Sexo | | | | | | | | | |
| Hombre | 81 | 1,21 (0,37, 3,86) | 1,65 (0,35, 12,67) | 0,94 (0,51, 1,47) | 0,19 (0,10, 0,66) | 0,58 (0,24, 1,61) | 1,13 (0,32, 3,20) | 0,42 (0,13, 1,34) | 0,36 (0,10, 1,07) |
| Mujer | 20 | 1,89 (0,78, 5,11) | 0,91 (0,19, 90,75) | 0,63 (0,34, 1,09) | 0,26 (0,15, 0,56) | 0,82 (0,27, 1,61) | 0,33 (0,14, 0,59) | 0,35 (0,23, 1,06) | 0,32 (0,19, 0,69) |
| Tabaquismo | | | | | | | | | |
| Fumador | 42 | 1,21 (0,37, 3,86) | 2,82 (0,36, 16,86) | 0,72 (0,20, 1,22) | 0,17 (0,05, 0,57) | 0,65 (0,29, 1,68) | 1,18 (0,29, 3,66) | 0,39 (0,10, 1,19) | 0,37 (0,08, 1,21) |
| No fumador | 18 | 2,36 (0,87, 6,71) | 1,46 (0,12, 86,43) | 1,04 (0,59, 1,62) | 0,18 (0,11, 0,60) | 0,77 (0,08, 1,61) | 0,45 (0,17, 1,04) | 0,45 (0,23, 1,30) | 0,35 (0,21, 0,82) |
| Ex fumador | 32 | 0,92 (0,28, 3,40) | 1,01 (0,39, 5,55) | 0,97 (0,64, 1,49) | 0,27 (0,12, 0,90) | 0,58 (0,28, 1,83) | 0,97 (0,30, 2,79) | 0,22 (0,15, 1,25) | 0,19 (0,12, 1,02) |
| Histología | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 62 | 1,34 (0,63, 3,86) | 1,03 (0,25, 3,35) | 0,85 (0,39, 1,43) | 0,30 (0,16, 0,92) | 0,66 (0,30, 1,51) | 0,93 (0,26, 2,29) | 0,40 (0,15, 1,46) | 0,36 (0,14, 1,54) |
| Epidermoide | 23 | 1,13 (0,30, 3,91) | 2,81 (0,30, 13,90) | 0,98 (0,51, 1,32) | 0,10 (0,05, 0,23) | 0,53 (0,18, 1,57) | 1,44 (0,61, 4,93) | 0,31 (0,13, 1,08) | 0,28 (0,09, 0,98) |
| Adenoescamoso | 4 | 0,50 (0,34, 5,18) | 1,73 (1,37, 24,77) | 2,03 (1,24, 3,49) | 0,11 (0,09, 0,31) | 0,55 (0,16, 1,66) | 1,12 (0,33, 2,48) | 0,14 (0,09, 0,46) | 0,10 (0,08, 0,34) |
| Neuroendocrino | 12 | 1,59 (0,32, 8,29) | 23,84 (4,70, 119,22) | 0,78 (0,26, 2,16) | 0,14 (0,06, 0,19) | 1,42 (0,20, 2,10) | 0,33 (0,10, 0,75) | 0,49 (0,14, 0,85) | 0,24 (0,09, 0,46) |
| Estadio | | | | | | | | | |
| I | 71 | 1,34 (0,47, 3,53) | 1,46 (0,29, 10,77) | 0,86 (0,35, 1,38) | 0,25 (0,13, 0,72) | 0,88 (0,23, 1,68) | 0,94 (0,29, 2,15) | 0,42 (0,14, 1,52) | 0,43 (0,14, 1,08) |
| II | 21 | 0,73 (0,26, 3,27) | 1,57 (0,35, 21,56) | 0,94 (0,63, 1,51) | 0,14 (0,10, 0,26) | 0,41 (0,24, 0,93) | 0,75 (0,21, 2,08) | 0,18 (0,15, 0,73) | 0,14 (0,10, 0,20) |
| III | 6 | 6,26 (1,87, 23,95) | 10,29 (1,30, 126,97) | 0,67 (0,19, 0,89) | 0,51 (0,06, 1,28) | 0,57 (0,33, 1,60) | 3,64 (1,59, 3,93) | 0,83 (0,21, 3,32) | 0,32 (0,10, 2,32) |
| IV | 1 | 19,03 (19,03, 19,03) | 2,32 (2,32, 2,32) | 1,24 (1,24, 1,24) | 0,06 (0,06, 0,06) | 0,62 (0,62, 0,62) | 0,66 (0,66, 0,66) | 0,56 (0,56, 0,56) | 0,06 (0,06, 0,06) |
| Grado de diferenciación | | | | | | | | | |
| I | 40 | 1,77 (0,42, 4,51) | 0,86 (0,19, 13,99) | 1,03 (0,47, 1,61) | 0,27 (0,18, 0,73) | 0,74 (0,18, 1,60) | 0,76 (0,27, 2,03) | 0,46 (0,24, 1,57) | 0,44 (0,20, 1,07) |
| II | 32 | 1,21 (0,67, 2,78) | 2,15 (0,36, 5,00) | 0,69 (0,28, 1,04) | 0,16 (0,10, 0,66) | 0,56 (0,41, 2,21) | 1,80 (0,70, 3,68) | 0,24 (0,14, 1,35) | 0,18 (0,09, 2,55) |
| III | 24 | 0,73 (0,31, 4,36) | 3,31 (0,58, 33,87) | 0,90 (0,44, 1,32) | 0,17 (0,05, 0,61) | 0,59 (0,23, 1,66) | 0,61 (0,22, 1,63) | 0,16 (0,09, 1,18) | 0,17 (0,07, 0,44) |
| IV | 2 | 11,32 (7,46, 15,17) | 60,67 (31,49, 89,84) | 1,20 (1,17, 1,22) | 0,15 (0,10, 0,20) | 1,16 (0,89, 1,43) | 0,80 (0,73, 0,87) | 0,67 (0,62, 0,73) | 0,27 (0,17, 0,38) |

Tabla 16. Expresión de los marcadores de EMT en GC.

| Variables | n | CDH1 | CDH2 | TWIST | VIM | SNAI1 | SNAI2 | ZEB1 | ZEB2 |
|-------------------------|----|---------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Edad | | | | | | | | | |
| > 65 | 57 | 5,19 (3,75, 6,59) | 9,06 (8,41, 10,86) | 4,09 (2,98, 5,69) | 0,67 (-0,55, 2,70) | 8,10 (6,21, 10,04) | 6,63 (5,67, 8,66) | 6,29 (5,18, 8,71) | 4,52 (2,83, 5,83) |
| ≤ 65 | 44 | 5,33 (3,60, 6,37) | 9,50 (8,95, 10,19) | 4,58 (3,09, 6,37) | 0,67 (-0,41, 1,59) | 7,86 (6,78, 8,30) | 6,14 (5,54, 7,50) | 6,18 (5,22, 7,16) | 3,75 (2,54, 4,67) |
| Sexo | | | | | | | | | |
| Hombre | 81 | 5,35 (3,82, 6,55) | 9,49 (8,70, 10,42) | 4,33 (3,04, 5,99) | 0,73 (-0,35, 1,92) | 8,12 (7,03, 9,14) | 6,58 (5,51, 8,62) | 6,33 (5,22, 8,12) | 4,04 (2,90, 5,55) |
| Mujer | 20 | 3,86 (3,10, 5,56) | 8,90 (8,06, 10,73) | 4,54 (3,57, 5,14) | -0,39 (-0,94, 1,69) | 6,51 (5,65, 8,15) | 6,13 (5,77, 7,16) | 5,81 (4,87, 7,72) | 3,26 (2,01, 5,22) |
| Tabaquismo | | | | | | | | | |
| Fumador | 42 | 5,56 (4,38, 6,69) | 9,52 (8,70, 10,73) | 3,74 (3,03, 4,79) | 1,02 (0,04, 2,02) | 7,99 (6,32, 9,04) | 6,38 (5,38, 8,22) | 6,17 (5,21, 7,14) | 3,63 (3,02, 5,46) |
| No fumador | 18 | 4,04 (2,41, 5,33) | 9,09 (8,46, 11,46) | 4,16 (3,11, 5,28) | -0,16 (-1,07, 1,97) | 7,28 (5,65, 8,67) | 6,46 (5,73, 7,61) | 6,40 (5,09, 7,99) | 3,55 (2,25, 5,21) |
| Ex fumador | 32 | 5,27 (3,81, 6,27) | 9,18 (8,44, 10,32) | 5,72 (3,00, 7,02) | 0,71 (-0,38, 1,92) | 8,18 (7,42, 9,28) | 7,18 (6,14, 8,89) | 6,33 (5,43, 8,76) | 4,45 (2,90, 5,95) |
| Histología | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 62 | 4,87 (3,66, 6,13) | 9,25 (8,42, 10,25) | 5,03 (3,06, 5,96) | 0,22 (-0,53, 1,37) | 7,83 (6,32, 8,70) | 6,42 (5,86, 7,93) | 6,21 (5,36, 7,66) | 4,05 (3,01, 5,07) |
| Epidermoide | 23 | 6,34 (5,46, 7,94) | 9,89 (8,99, 11,39) | 4,07 (3,29, 6,22) | 1,43 (0,48, 4,30) | 8,16 (7,59, 11,04) | 7,50 (5,83, 9,68) | 7,12 (5,18, 9,94) | 5,51 (2,69, 7,93) |
| Adenoescamoso | 4 | 2,76 (1,77, 4,02) | 9,01 (8,31, 9,42) | 5,05 (4,27, 6,28) | 0,78 (-0,20, 1,32) | 8,66 (7,92, 9,60) | 6,28 (5,56, 6,70) | 5,60 (5,30, 6,10) | 3,16 (2,91, 3,59) |
| Neuroendocrino | 12 | 4,50 (3,48, 11,48) | 8,95 (8,12, 11,81) | 3,17 (2,24, 4,83) | 0,87 (-0,56, 3,05) | 6,86 (5,38, 8,72) | 5,65 (4,93, 6,90) | 5,80 (4,55, 7,09) | 2,02 (1,48, 4,18) |
| Estadio | | | | | | | | | |
| I | 71 | 5,35 (3,75, 7,06) | 9,49 (8,65, 11,28) | 3,98 (2,97, 5,75) | 0,24 (-0,59, 2,02) | 7,98 (6,21, 8,98) | 6,64 (5,92, 8,62) | 6,29 (5,17, 8,71) | 4,16 (2,50, 5,36) |
| II | 21 | 4,59 (3,48, 5,60) | 9,16 (8,22, 9,39) | 5,81 (4,09, 7,13) | 0,65 (0,12, 1,24) | 8,09 (7,42, 9,61) | 6,11 (5,48, 7,32) | 6,33 (5,22, 7,16) | 3,46 (3,04, 5,29) |
| III | 6 | 5,30 (5,02, 6,13) | 9,69 (9,15, 11,82) | 3,43 (3,12, 4,66) | 1,27 (0,76, 1,81) | 7,37 (6,25, 8,00) | 6,41 (5,89, 7,34) | 5,92 (5,55, 6,85) | 3,86 (3,18, 4,79) |
| IV | 1 | 5,92 (5,92, 5,92) | 10,93 (10,93, 10,93) | 2,19 (2,19, 2,19) | 3,33 (3,33, 3,33) | 12,18 (12,18, 12,18) | 9,38 (9,38, 9,38) | 9,64 (9,64, 9,64) | 7,60 (7,60, 7,60) |
| Grado de diferenciación | | | | | | | | | |
| I | 40 | 4,73 (3,64, 6,34) | 9,09 (8,46, 10,53) | 4,70 (3,00, 5,81) | -0,34 (-0,77, 1,88) | 7,94 (6,36, 8,76) | 6,80 (5,63, 8,65) | 6,12 (5,02, 8,33) | 4,14 (2,25, 5,29) |
| II | 32 | 5,35 (4,26, 6,05) | 9,38 (8,31, 9,88) | 4,47 (3,04, 5,99) | 1,07 (0,02, 1,95) | 7,91 (6,18, 9,12) | 6,40 (6,00, 7,31) | 6,33 (5,19, 8,35) | 3,89 (3,13, 6,55) |
| III | 24 | 5,87 (3,88, 9,00) | 9,91 (9,21, 11,00) | 4,09 (3,37, 6,18) | 0,97 (0,32, 1,89) | 7,83 (6,59, 9,96) | 6,62 (5,47, 8,50) | 6,42 (5,82, 7,14) | 3,56 (2,98, 5,07) |
| IV | 2 | 2,54 (0,85, 4,23) | 7,33 (5,52, 9,13) | 1,31 (0,87, 1,75) | -2,14 (-4,88, 0,59) | 12,18 (12,18, 12,18) | 8,32 (7,79, 8,85) | 9,64 (9,64, 9,64) | 7,60 (7,60, 7,60) |

En el análisis de marcadores del sistema inmunitario en tejido tumoral observamos diferencias significativas en la expresión de *TIM-3*, *GITR*, *OX-40*, *CD28*, *PD-L1* y *CTLA-4* en función de la histología, y en *PD-L2* y *CD40* en función del estadio (Tabla 17). En GC, únicamente observamos diferencias en la expresión de *PD-L2* según la histología del tumor (Tabla 18).

Tabla 17. Expresión de los marcadores del sistema inmunitario en tumor en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 18. Expresión de los marcadores del sistema inmunitario en GC en función de las características clínico-patológicas de los pacientes. Se representa la mediana y el rango intercuartílico. Las diferencias estadísticamente significativas entre grupos están marcadas en negrita y se llevaron a cabo mediante un test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Tabla 17. Expresión de los marcadores del sistema inmunitario en GC.

| Variables | n | TIM-3 | PD-L2 | LAG-3 | MR | CD40 | GITR | OX-40 | CD137 | CD27 | CD28 | PD-1 | PD-L1 | CTLA-4 |
|-------------------------|----|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| Edad | | | | | | | | | | | | | | |
| > 65 | 57 | 0.54 (0.18, 3.58) | 0.45 (0.22, 1.71) | 1.47 (0.51, 3.90) | 0.28 (0.06, 1.46) | 0.58 (0.32, 1.02) | 2.08 (0.58, 20.44) | 0.84 (0.35, 2.06) | 3.41 (1.05, 11.55) | 1.51 (0.64, 7.21) | 1.80 (0.76, 6.73) | 0.29 (0.06, 0.40) | 0.21 (0.05, 0.86) | 0.67 (0.17, 2.27) |
| ≤ 65 | 44 | 0.51 (0.15, 1.60) | 0.56 (0.21, 1.39) | 1.15 (0.41, 2.91) | 0.35 (0.09, 1.09) | 0.44 (0.17, 1.23) | 1.71 (1.06, 8.75) | 0.93 (0.27, 2.99) | 1.95 (0.40, 6.11) | 1.09 (0.56, 3.84) | 1.36 (0.38, 3.07) | 0.30 (0.10, 0.48) | 0.32 (0.09, 1.76) | 0.84 (0.14, 2.42) |
| Sexo | | | | | | | | | | | | | | |
| Hombre | 81 | 0.51 (0.17, 1.72) | 0.48 (0.21, 1.07) | 1.17 (0.50, 3.86) | 0.33 (0.07, 1.49) | 0.49 (0.22, 1.09) | 2.08 (0.80, 13.41) | 0.84 (0.27, 2.66) | 1.92 (0.55, 6.99) | 1.23 (0.56, 3.94) | 1.48 (0.37, 3.65) | 0.21 (0.06, 0.46) | 0.25 (0.08, 0.93) | 0.84 (0.17, 2.76) |
| Mujer | 20 | 0.54 (0.19, 3.59) | 0.44 (0.26, 1.39) | 1.17 (0.43, 3.11) | 0.21 (0.10, 5.21) | 0.61 (0.37, 1.07) | 1.71 (0.65, 3.71) | 0.93 (0.31, 3.04) | 4.47 (1.14, 11.79) | 1.58 (0.56, 6.77) | 1.75 (0.74, 9.51) | 0.27 (0.20, 0.40) | 0.21 (0.10, 1.08) | 0.67 (0.14, 1.85) |
| Tabaquismo | | | | | | | | | | | | | | |
| Fumador | 42 | 0.29 (0.14, 1.53) | 0.40 (0.13, 1.46) | 1.24 (0.53, 3.76) | 0.24 (0.07, 1.09) | 0.44 (0.24, 1.09) | 1.77 (0.73, 10.02) | 1.04 (0.25, 2.74) | 1.44 (0.36, 3.34) | 1.09 (0.60, 3.13) | 1.59 (0.39, 6.59) | 0.22 (0.05, 0.45) | 0.22 (0.05, 1.22) | 0.61 (0.17, 2.42) |
| No fumador | 18 | 0.40 (0.15, 1.75) | 0.35 (0.16, 1.11) | 0.67 (0.35, 1.80) | 0.26 (0.11, 42.10) | 0.60 (0.26, 1.15) | 0.97 (0.50, 2.26) | 0.90 (0.23, 2.59) | 5.21 (0.69, 13.95) | 0.72 (0.31, 4.17) | 1.49 (0.08, 2.87) | 0.22 (0.15, 0.40) | 0.21 (0.05, 0.89) | 0.56 (0.03, 1.52) |
| Ex fumador | 32 | 1.14 (0.27, 4.91) | 0.59 (0.34, 1.46) | 1.87 (0.85, 34.62) | 0.71 (0.19, 3.55) | 0.60 (0.23, 2.06) | 3.75 (1.10, 30.66) | 0.83 (0.45, 3.00) | 3.23 (1.16, 11.04) | 1.91 (0.75, 10.48) | 1.77 (0.79, 8.15) | 0.13 (0.06, 0.44) | 0.22 (0.10, 1.56) | 0.84 (0.16, 2.71) |
| Histología | | | | | | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 62 | 0.69 (0.21, 4.17) | 0.57 (0.25, 1.47) | 1.18 (0.41, 3.71) | 0.47 (0.07, 3.76) | 0.60 (0.27, 1.99) | 1.71 (0.71, 6.23) | 1.19 (0.48, 4.26) | 2.68 (0.77, 8.46) | 1.58 (0.71, 8.15) | 1.75 (0.78, 6.79) | 0.21 (0.07, 0.45) | 0.38 (0.11, 1.59) | 1.06 (0.27, 2.42) |
| Epidermoide | 23 | 0.68 (0.22, 1.81) | 0.45 (0.23, 1.08) | 2.66 (0.74, 4.26) | 0.20 (0.10, 1.09) | 0.57 (0.18, 1.53) | 13.27 (2.25, 450.09) | 0.63 (0.21, 1.73) | 2.03 (0.67, 7.91) | 1.23 (0.63, 2.86) | 1.69 (0.37, 3.03) | 0.21 (0.07, 0.66) | 0.14 (0.07, 0.36) | 0.59 (0.11, 2.05) |
| Adenocarcinoma mucinoso | 4 | 0.57 (0.15, 1.17) | 0.21 (0.08, 0.59) | 0.46 (0.05, 2.02) | 0.04 (0.03, 50.96) | 0.45 (0.19, 0.72) | 1.44 (0.77, 4.89) | 0.44 (0.09, 0.93) | 2.44 (1.14, 4.62) | 0.47 (0.39, 0.48) | 0.25 (0.03, 0.56) | 0.44 (0.37, 0.46) | 0.61 (0.44, 0.89) | 8.14 (5.68, 31.35) |
| Neuroendocrino | 12 | 0.15 (0.11, 0.22) | 0.24 (0.09, 0.39) | 1.00 (0.68, 1.21) | 0.35 (0.12, 0.74) | 0.31 (0.18, 0.35) | 0.72 (0.41, 1.57) | 0.37 (0.25, 1.89) | 0.41 (0.18, 3.17) | 0.51 (0.18, 1.96) | 0.35 (0.09, 2.42) | 0.16 (0.05, 0.29) | 0.04 (0.02, 0.19) | 0.01 (0.00, 0.35) |
| Estado | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 71 | 0.95 (0.19, 2.38) | 0.57 (0.23, 1.47) | 1.17 (0.48, 4.50) | 0.41 (0.06, 3.84) | 0.77 (0.34, 1.92) | 2.26 (0.84, 13.34) | 1.06 (0.40, 3.04) | 3.05 (1.04, 9.48) | 1.84 (0.74, 7.34) | 1.81 (0.66, 6.91) | 0.15 (0.06, 0.40) | 0.17 (0.05, 0.74) | 0.63 (0.08, 1.93) |
| II | 21 | 0.34 (0.13, 1.13) | 0.36 (0.25, 0.64) | 1.17 (0.86, 1.84) | 0.29 (0.14, 1.05) | 0.23 (0.13, 0.57) | 1.83 (0.60, 7.07) | 0.98 (0.27, 1.07) | 1.39 (0.32, 3.31) | 0.82 (0.52, 1.65) | 1.38 (0.57, 2.41) | 0.35 (0.30, 0.75) | 0.26 (0.07, 1.62) | 1.56 (0.51, 3.62) |
| III | 6 | 0.51 (0.11, 0.62) | 0.06 (0.05, 0.12) | 1.23 (0.57, 2.27) | 0.23 (0.15, 0.26) | 0.18 (0.16, 0.39) | 1.54 (0.54, 8.94) | 0.84 (0.25, 2.66) | 0.31 (0.15, 11.09) | 0.46 (0.21, 0.80) | 0.46 (0.16, 6.73) | 0.17 (0.09, 0.29) | 0.93 (0.67, 1.45) | 0.37 (0.24, 0.87) |
| IV | 1 | 0.05 (0.05, 0.05) | 0.23 (0.23, 0.23) | 1.86 (1.85, 1.85) | 349.71 (349.71, 349.71) | 0.57 (0.57, 0.57) | 0.11 (0.11, 0.11) | 0.11 (0.11, 0.11) | 3.66 (3.66, 3.66) | 0.55 (0.55, 0.55) | 0.21 (0.21, 0.21) | 0.36 (0.36, 0.36) | 0.32 (0.32, 0.32) | 4.11 (4.11, 4.11) |
| Grado de diferenciación | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 40 | 0.89 (0.24, 2.21) | 0.55 (0.28, 1.15) | 0.96 (0.50, 3.41) | 0.28 (0.06, 2.17) | 0.60 (0.37, 1.91) | 2.08 (0.71, 12.88) | 0.97 (0.52, 2.76) | 2.87 (0.94, 11.00) | 1.84 (0.86, 11.63) | 1.91 (0.62, 6.85) | 0.27 (0.13, 0.40) | 0.21 (0.10, 0.74) | 0.87 (0.14, 1.74) |
| II | 32 | 0.74 (0.24, 2.93) | 0.57 (0.18, 1.94) | 1.17 (0.53, 3.41) | 0.97 (0.10, 2.91) | 0.60 (0.20, 1.23) | 1.86 (0.34, 5.66) | 0.96 (0.32, 2.99) | 2.86 (1.27, 6.87) | 1.13 (0.66, 2.85) | 1.64 (1.10, 2.51) | 0.18 (0.07, 0.60) | 0.74 (0.10, 2.86) | 1.24 (0.28, 2.31) |
| III | 24 | 0.20 (0.11, 1.79) | 0.29 (0.06, 0.48) | 1.24 (0.57, 8.88) | 0.24 (0.06, 0.77) | 0.34 (0.16, 1.54) | 1.58 (0.68, 13.55) | 0.64 (0.13, 2.10) | 0.50 (0.17, 3.73) | 0.80 (0.47, 1.96) | 0.76 (0.12, 2.81) | 0.20 (0.03, 0.39) | 0.14 (0.07, 0.49) | 0.36 (0.15, 1.98) |
| IV | 2 | 0.65 (0.35, 0.95) | 0.62 (0.42, 0.82) | 2.917.38 (1.459.62, 4.375.15) | 225.07 (162.75, 287.39) | 1.07 (0.82, 1.32) | 7.27 (3.68, 10.84) | 1.15 (0.63, 1.67) | 7.77 (5.71, 9.82) | 2.19 (1.37, 3.01) | 13.37 (6.79, 19.96) | 0.19 (0.10, 0.27) | 0.16 (0.09, 0.24) | 2.11 (1.10, 3.11) |

Tabla 18. Expresión de los marcadores del sistema inmunitario en GC.

| Variables | n | TIM-3 | PDL-2 | LAG-3 | KIR | CD40 | GITR | OX-40 | CD137 | CD27 | CD28 | PD-1 | PD-L1 | CTLA-4 |
|--------------------------------|----|--------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Edad | | | | | | | | | | | | | | |
| > 65 | 57 | 7.62 (5.07, 9.50) | 9.18 (6.35, 12.68) | 11.45 (9.41, 15.34) | 13.44 (11.61, 16.59) | 8.51 (6.04, 11.14) | 14.75 (11.86, 17.96) | 9.54 (6.53, 12.18) | 4.95 (2.64, 9.11) | 6.66 (3.91, 9.07) | 7.92 (4.63, 11.34) | 13.04 (8.97, 16.31) | 13.58 (9.42, 16.07) | 12.68 (7.88, 14.88) |
| ≤ 65 | 44 | 7.39 (5.80, 9.30) | 7.87 (6.58, 9.31) | 11.96 (9.85, 13.57) | 11.86 (10.35, 14.88) | 6.57 (5.48, 10.19) | 14.24 (11.64, 15.77) | 8.21 (6.60, 11.87) | 5.81 (3.91, 7.59) | 6.23 (4.25, 10.14) | 7.57 (5.00, 9.54) | 11.50 (6.71, 15.52) | 11.75 (9.37, 15.98) | 11.61 (6.42, 14.91) |
| Sexo | | | | | | | | | | | | | | |
| Hombre | 81 | 7.37 (5.18, 9.90) | 8.12 (6.63, 12.74) | 11.14 (9.31, 14.41) | 12.60 (11.03, 16.26) | 7.55 (6.02, 11.12) | 14.25 (11.86, 17.43) | 8.75 (6.54, 11.94) | 6.13 (2.49, 8.99) | 5.76 (4.12, 9.35) | 6.61 (4.63, 10.27) | 12.85 (8.70, 16.22) | 12.61 (9.30, 16.08) | 12.46 (7.19, 14.87) |
| Mujer | 20 | 8.21 (5.84, 9.61) | 10.01 (6.07, 10.88) | 13.02 (9.96, 15.17) | 13.35 (11.28, 15.95) | 8.17 (5.21, 10.21) | 14.97 (10.89, 17.45) | 11.07 (6.56, 11.68) | 3.74 (0.44, 6.71) | 7.98 (5.38, 10.16) | 9.28 (5.88, 10.98) | 12.58 (11.43, 14.54) | 14.73 (11.97, 15.91) | 14.27 (10.51, 15.41) |
| Tabaquismo | | | | | | | | | | | | | | |
| Fumador | 42 | 7.30 (5.19, 9.25) | 7.60 (6.92, 11.59) | 10.82 (9.87, 13.25) | 12.22 (10.99, 15.18) | 7.33 (6.20, 9.80) | 13.84 (11.68, 15.24) | 8.19 (6.33, 11.08) | 5.86 (4.16, 7.76) | 5.68 (4.24, 9.07) | 6.77 (4.78, 9.32) | 12.59 (8.66, 15.20) | 11.95 (9.64, 15.09) | 12.05 (7.57, 14.59) |
| No fumador | 18 | 9.11 (6.24, 9.84) | 10.48 (6.01, 11.29) | 13.02 (9.73, 14.41) | 13.96 (13.07, 15.95) | 8.62 (5.43, 11.35) | 16.41 (11.90, 17.71) | 11.54 (7.72, 12.57) | 3.74 (3.96, 9.25) | 8.56 (7.60, 10.87) | 10.55 (6.79, 11.88) | 12.66 (10.52, 14.64) | 14.49 (13.39, 15.49) | 13.70 (12.38, 15.83) |
| Ex fumador | | | | | | | | | | | | | | |
| | 32 | 8.37 (5.75, 12.21) | 10.88 (6.62, 14.16) | 14.40 (9.22, 16.71) | 14.04 (11.24, 17.18) | 9.04 (6.21, 11.81) | 16.15 (12.74, 18.60) | 11.07 (7.17, 13.46) | 5.26 (0.51, 9.19) | 6.66 (4.28, 9.62) | 9.15 (5.87, 11.71) | 14.91 (9.34, 17.02) | 16.13 (9.39, 17.58) | 13.66 (7.22, 15.75) |
| Histología | | | | | | | | | | | | | | |
| Adenocarcinoma | 62 | 6.04 (4.98, 9.15) | 7.43 (6.05, 9.83) | 10.68 (9.28, 14.41) | 12.02 (10.28, 15.18) | 6.75 (5.50, 10.34) | 14.05 (11.49, 17.73) | 8.37 (6.31, 11.59) | 4.42 (0.78, 7.19) | 6.66 (4.16, 9.29) | 7.35 (4.98, 10.52) | 11.97 (8.82, 15.92) | 13.28 (9.34, 16.11) | 12.68 (7.33, 14.78) |
| Epidermoide | 23 | 9.25 (7.82, 12.29) | 12.80 (8.56, 14.64) | 13.40 (11.53, 16.88) | 15.26 (12.40, 18.49) | 8.51 (6.21, 12.34) | 14.61 (11.66, 18.02) | 9.50 (7.00, 13.94) | 6.93 (4.30, 10.29) | 5.68 (2.96, 7.45) | 7.76 (4.70, 10.94) | 14.64 (8.86, 16.38) | 13.51 (9.50, 16.71) | 12.69 (6.74, 14.98) |
| Adenocarcinoma | 4 | 6.74 (5.42, 13.42) | 7.15 (6.34, 7.64) | 10.05 (9.01, 11.44) | 14.39 (13.60, 14.52) | 8.86 (6.28, 12.56) | 12.92 (12.50, 17.02) | 11.95 (10.22, 14.47) | 8.49 (6.33, 8.69) | 8.67 (7.08, 12.47) | 7.07 (6.06, 8.09) | 12.59 (10.96, 15.29) | 11.10 (10.75, 14.85) | 8.46 (7.82, 13.07) |
| Neuroendocrino | 12 | 8.60 (6.83, 10.02) | 8.89 (7.30, 11.35) | 11.98 (11.18, 13.23) | 12.92 (11.42, 13.40) | 7.71 (6.79, 9.86) | 14.78 (13.97, 16.29) | 10.34 (7.98, 12.37) | 7.49 (4.45, 9.52) | 8.56 (4.87, 12.19) | 7.14 (4.91, 10.78) | 9.91 (8.22, 15.61) | 11.13 (10.32, 14.80) | 12.36 (10.91, 14.15) |
| Estado | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 71 | 8.32 (5.18, 10.62) | 9.31 (5.99, 12.43) | 12.39 (9.34, 14.88) | 13.15 (11.00, 16.41) | 8.27 (5.83, 11.35) | 14.92 (11.51, 17.79) | 9.62 (6.36, 11.92) | 4.80 (1.32, 8.99) | 7.27 (3.58, 10.57) | 7.76 (4.63, 10.76) | 13.96 (8.79, 17.18) | 14.55 (9.25, 16.16) | 13.28 (7.53, 15.35) |
| II | 21 | 6.27 (5.73, 9.71) | 7.21 (6.68, 12.26) | 10.75 (9.33, 14.86) | 12.60 (10.88, 14.64) | 6.53 (5.69, 9.07) | 12.70 (11.65, 14.78) | 8.21 (6.91, 12.92) | 6.71 (4.53, 8.61) | 5.05 (4.16, 6.87) | 6.97 (5.19, 9.95) | 13.08 (10.77, 15.15) | 11.95 (10.41, 15.93) | 10.33 (7.18, 14.60) |
| III | 6 | 6.32 (5.18, 7.37) | 8.23 (7.43, 8.89) | 10.68 (10.30, 12.89) | 11.93 (11.90, 13.27) | 7.07 (6.41, 7.27) | 14.76 (13.04, 15.98) | 7.66 (6.60, 8.67) | 6.26 (3.42, 6.29) | 8.73 (4.91, 9.47) | 9.48 (5.66, 12.26) | 8.75 (6.78, 10.06) | 10.95 (10.67, 11.36) | 7.97 (6.38, 10.69) |
| IV | 1 | 9.25 (9.25, 9.25) | 8.56 (8.56, 8.56) | | | | | | | | | 13.43 (13.43, 13.43) | 14.03 (14.03, 14.03) | 14.79 (14.79, 14.79) |
| Grado de diferenciación | | | | | | | | | | | | | | |
| I | 40 | 8.06 (4.81, 9.69) | 9.18 (6.05, 11.66) | 11.93 (9.48, 14.79) | 12.95 (11.21, 15.62) | 6.91 (5.43, 9.88) | 13.68 (11.05, 17.22) | 9.29 (6.31, 11.87) | 2.66 (-1.47, 8.90) | 6.04 (4.62, 8.79) | 8.83 (5.61, 10.88) | 11.59 (8.64, 15.23) | 14.25 (9.17, 16.07) | 12.80 (7.07, 15.03) |
| II | 32 | 6.94 (5.20, 11.46) | 7.97 (6.21, 13.10) | 11.36 (9.14, 14.17) | 11.93 (10.15, 16.06) | 7.40 (5.84, 11.98) | 13.59 (11.15, 17.27) | 9.12 (6.94, 13.08) | 5.19 (3.64, 6.91) | 6.47 (2.80, 8.90) | 7.16 (4.67, 9.41) | 13.08 (10.30, 16.40) | 13.39 (10.25, 16.42) | 12.52 (7.58, 15.04) |
| III | 24 | 6.95 (5.72, 10.43) | 7.68 (6.92, 11.84) | 11.96 (10.08, 15.41) | 13.27 (11.44, 15.69) | 7.94 (6.42, 11.37) | 14.88 (12.60, 18.46) | 8.94 (7.17, 11.07) | 7.59 (4.68, 9.52) | 6.95 (4.24, 11.27) | 6.21 (4.68, 11.38) | 11.13 (9.98, 15.93) | 11.13 (9.57, 15.95) | 12.05 (7.18, 14.57) |
| IV | 2 | 8.76 (8.54, 9.01) | 8.56 (8.56, 8.56) | | | | 16.33 (16.33, 16.33) | 12.19 (12.19, 12.19) | 4.46 (-4.45, 4.46) | | | 16.51 (14.97, 18.05) | 14.51 (14.27, 14.75) | 14.88 (14.83, 14.93) |

6. Valor pronóstico de los marcadores moleculares

En nuestra serie de pacientes, observamos una menor SG de aquellos que presentaron un resultado positivo de micrometástasis determinada por IHQ ($p=0,023$, Figura 22A). La mediana de supervivencia de dichos pacientes fue de 33 meses, mientras que los presentaron un resultado negativo no alcanzaron el 50% de fallecimientos. Sorprendentemente, no observamos diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes en función del resultado de micrometástasis determinada por qPCR, y en ningún caso se alcanzó el 50% de fallecimientos ($p=0,54$, Figura 22B).

Cuando analizamos la SLE, no observamos diferencias significativas en función de la micrometástasis ($p>0,05$, Figura 22C, D). Sin embargo, se observa una clara tendencia cuando el resultado de micrometástasis fue positivo por IHQ, con una mediana de 22 meses, mucho más baja que la de los pacientes que presentaron un resultado negativo (48 meses).

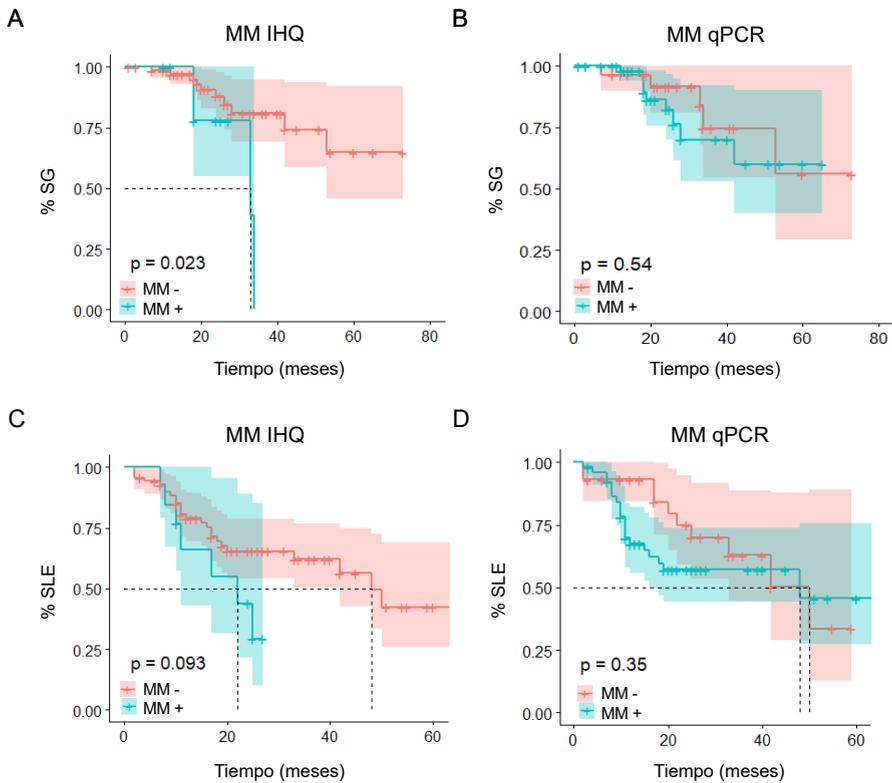


Figura 22. Curvas de SG y SLE de la serie de pacientes en función de la micrometástasis determinada por IHQ (A, C) o qPCR (B, D).

Además, llevamos a cabo el estudio de la SG y SLE de los distintos marcadores moleculares estudiados, tanto en tejido pulmonar como en GC, y de las características clínico-patológicas.

El análisis de los marcadores de EMT como posible factor pronóstico mostró que los pacientes con una baja ratio *CDH1/CDH2* en GC presentaron peor SG ($p=0,014$, Figura 23A) y SLE ($p=0,0067$, Figura 23B). Igualmente, una alta expresión de los marcadores *VIM*

Resultados

($p=0,016$, Figura 23C) y *ZEB1* ($p=0,029$, Figura 23D) en GC resultó en una menor SG.

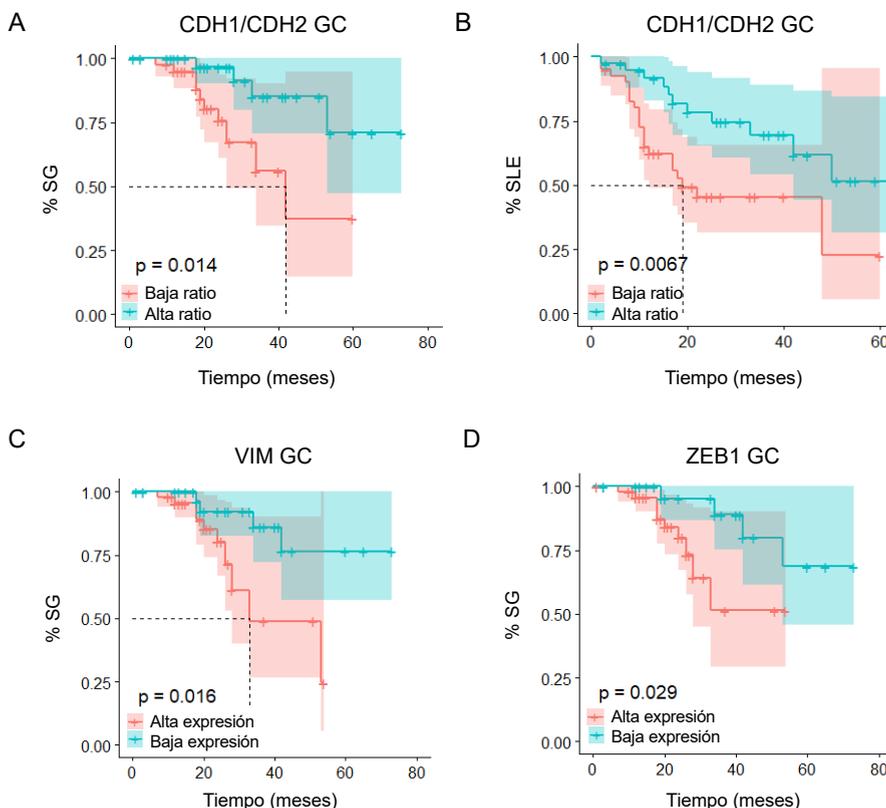


Figura 23. Curva de SG (A) y SLE (B) de la serie de pacientes en función de la ratio CDH1/CDH2 y de la SG en función expresión de VIM (C) y ZEB1 (D) en el GC.

En cuanto a los marcadores del sistema inmunitario, los pacientes con una baja expresión de *CD27* ($p=0,026$, Figura 24A) y aquellos con una alta expresión de *KIR* ($p=0,048$, Figura 24B) en tumor mostraron una menor SG. Además, una alta expresión en tumor tanto de *PD-1* ($p=0,035$, Figura 24C) como de su ligando *PD-L1* ($p=0,023$, Figura 24D) mostraron un peor pronóstico.

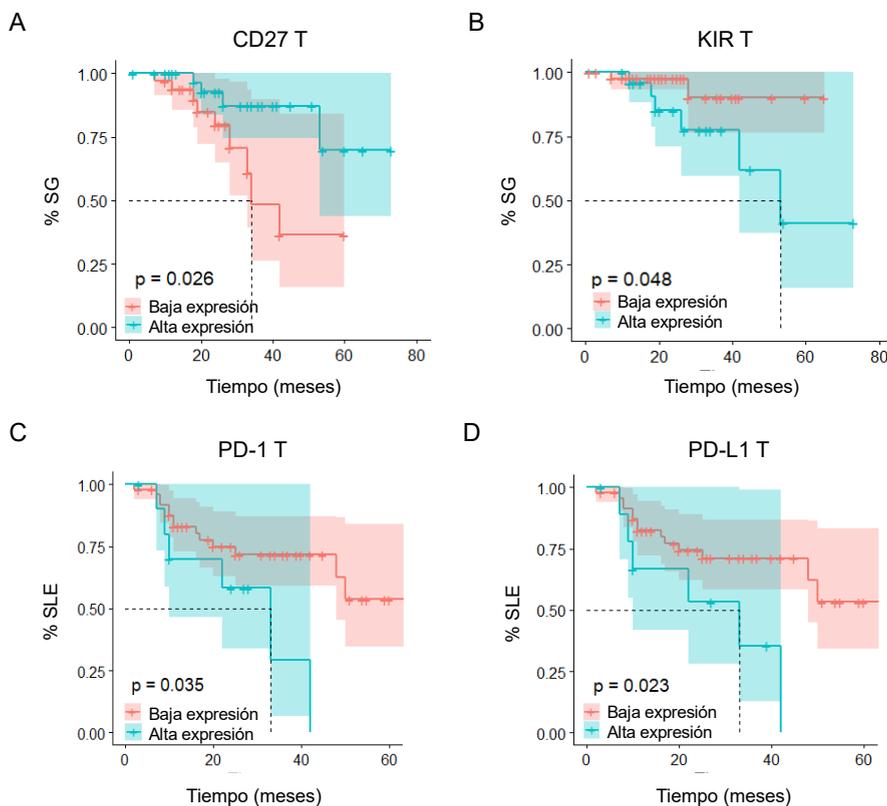


Figura 24. Curvas de SG y SLE de la serie de pacientes en función de los marcadores del sistema inmunitario en tumor. A. SG según la expresión de CD27. B. SG según la expresión de KIR. C. SLE según la expresión de PD-1. D. SLE según la expresión de PD-L1.

En el estudio de marcadores en GC encontramos que los pacientes con una alta expresión de *TIM-3* mostraron tanto una menor SG ($p=0,045$, Figura 25A) como SLE ($p=0,014$, Figura 25B). Del mismo modo, aquellos pacientes con una alta expresión de los marcadores *CD40* ($p=0,018$, Figura 25C), *CTLA-4* ($p=0,028$, Figura 25D), *LAG-3* ($p=0,011$, Figura 25E) y *PD-L2* ($p=0,0093$, Figura 25F) en GC presentaron una menor SLE.

Resultados

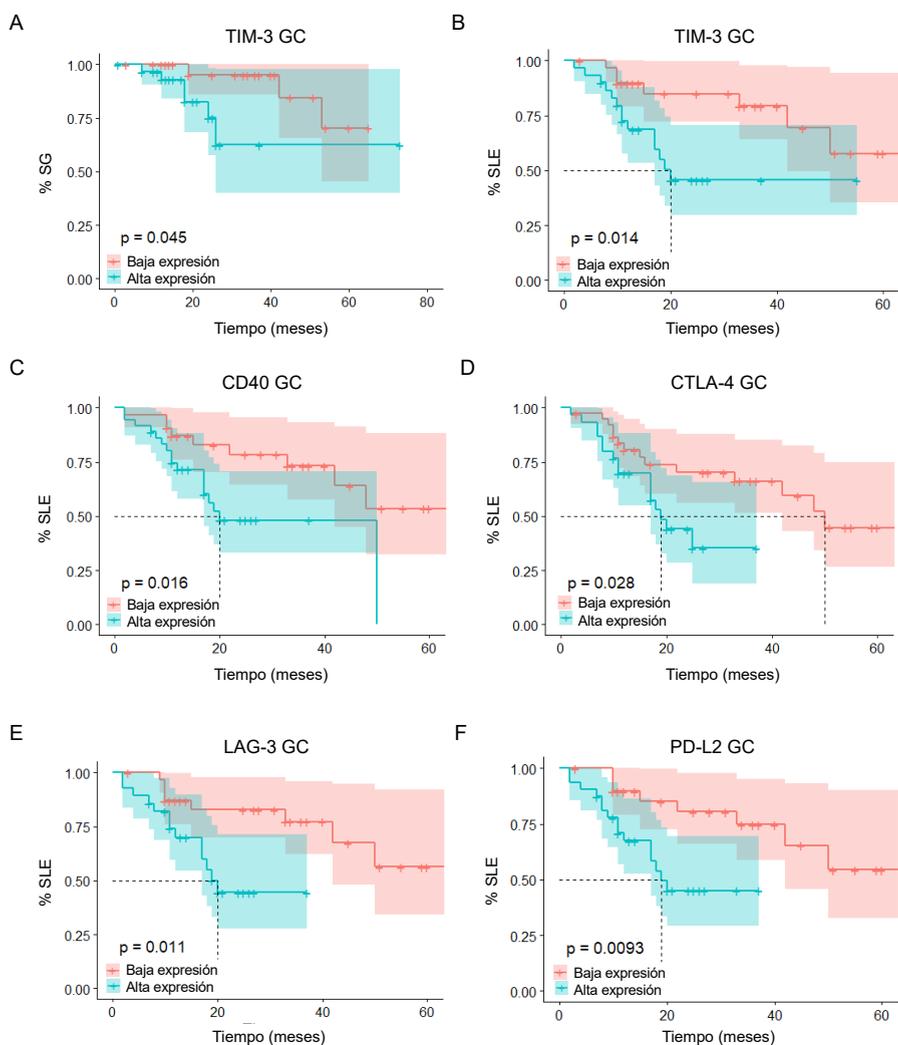


Figura 25. Curvas de SG y SLE de la serie de pacientes en función de los marcadores del sistema inmunitario en GC. SG (A) y SLE (B) según la expresión de TIM-3. SLE según la expresión de CD40 (C), CTLA-4 (D), LAG-3 (E) y PD-L2 (F) en GC.

Por último, con el objetivo de integrar todos los datos obtenidos, llevamos a cabo un análisis multivariante del conjunto de

variables. Para un mejor análisis de los resultados, el estudio se llevó a cabo por separado en tumor y en GC.

Como ya hemos comentado con anterioridad, el análisis individual de las variables mostró un efecto sobre la supervivencia del estadio, el grado de diferenciación, la presencia de micrometástasis detectadas por IHQ y los marcadores *CD27*, *KIR*, *PD-1* y *PD-L1* en tumor. Sin embargo, en el análisis multivariante sólo resultó significativo el estadio de diferenciación ($p=0,0051$) y una alta expresión de *PD-1* ($p=0,0126$) en tumor (Tabla 19). Los pacientes con un tumor en estadio II, III o IV mostraron una tasa de riesgo de recaída y/o muerte 5,68 veces mayor que aquellos en estadio I (Tabla 19). Por otra parte, aquellos con una alta expresión de *PD-L1* en tumor mostraron una tasa de riesgo 5,2 veces mayor (Tabla 19).

Es importante comentar que los pacientes con una alta expresión de *KIR* en tumor presentaron una mayor tasa de riesgo de muerte ($HR=5,13$). Por el contrario, los pacientes con una alta expresión de *CD27* presentaron una menor tasa de riesgo (85% menos) (Tabla 19). A pesar de estas claras diferencias, el resultado no es estadísticamente significativo.

Resultados

Tabla 19. Análisis multivariante mediante regresión de Cox de las variables clínicas y los marcadores de EMT y del sistema inmunitario en tumor. HR, *Hazard rate*; IC, Intervalo de confianza.

| Variables | SLE | | SG | |
|-------------------------|-------------------|----------------|-------------------|---------|
| | HR (95% IC) | p-valor | HR (95% IC) | p-valor |
| Histología | | | | |
| Epidermioide | 0,87 (0,27-2,83) | 0,8229 | 0,49 (0,02-10,75) | 0,6479 |
| Adenoescamoso | 2,35e9 (0-Inf) | 0,9986 | 5,59e10 (0-Inf) | 0,9994 |
| Neuroendocrino | 0 (0-Inf) | 0,9989 | 0 (0-Inf) | 0,9996 |
| Tabaquismo | | | | |
| No fumador | 0 (0-Inf) | 0,9981 | 0 (0-Inf) | 0,9991 |
| Estadio | | | | |
| II, III, IV | 5,68 (1,68-19,13) | 0,0051* | 6,37 (0,51-79,97) | 0,1515 |
| Grado de diferenciación | | | | |
| III, IV | 2,27 (0,78-6,61) | 0,132 | 0,49 (0,03-8,91) | 0,6314 |
| PD-1 T | | | | |
| Alta | 5,2 (1,42-18,99) | 0,0126* | - | - |
| KIR T | | | | |
| Alta | - | - | 5,13 (0,47-56,2) | 0,1803 |
| CD27 T | | | | |
| Alta | - | - | 0,15 (0,01-1,67) | 0,123 |

En cuanto al GC, el análisis individual de las variables mostró un efecto sobre la supervivencia de los marcadores de EMT *VIM* y *ZEB1* y la ratio *CDH1/CDH2*, y de los marcadores del sistema inmunitario *CD40*, *CTLA-4*, *LAG-3*, *PD-L2* y *TIM-3*. Por su parte, el análisis multivariante confirmó la importancia de la expresión de *ZEB1* y la ratio *CDH1/CDH2* en GC en la supervivencia de los pacientes de CP (Tabla 20). La baja expresión de *ZEB1* en GC está asociada a una tasa de riesgo de muerte un 90% menor ($p=0,0274$) y una alta ratio *CDH1/CDH2* con una tasa de riesgo un 83% menor ($p=0,0183$). Es también destacable, aunque los datos no son estadísticamente significativos, que los pacientes con una alta

expresión de *CD40* en GC presentaron una tasa de riesgo casi 3 veces mayor (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis multivariante mediante regresión de Cox de las variables clínicas y los marcadores de EMT y del sistema inmunitario en GC. HR, *Hazard rate*; IC, Intervalo de confianza.

| Variables | SLE | | SG | |
|-------------------------|-------------------|---------|---------------------|----------------|
| | HR (95% IC) | p-valor | HR (95% IC) | p-valor |
| Histología | | | | |
| Epidermoide | 0.91 (0.18-4.53) | 0,9092 | 0.57 (0.1-3.25) | 0,5269 |
| Adenoescamoso | 2.59 (0.2-33.27) | 0,4649 | 20.54 (0.72-582.57) | 0,0766 |
| Neuroendocrino | 0 (0-Inf) | 0,998 | 0 (0-Inf) | 0,9989 |
| Tabaquismo | | | | |
| No fumador | 0.17 (0.01-2.6) | 0,2027 | 0 (0-Inf) | 0,9988 |
| Estadio | | | | |
| II, III, IV | 1.77 (0.52-6) | 0,358 | 4.07 (1.15-14.4) | 0,0293* |
| Grado de diferenciación | | | | |
| III, IV | 1.92 (0.57-6.54) | 0,2948 | 1.76 (0.51-6.08) | 0,3705 |
| ZEB1 GC | | | | |
| Baja | - | - | 0.09 (0.01-0.76) | 0,0274* |
| CDH1/CDH2 GC | | | | |
| Alta | 0.26 (0.05-1.27) | 0,0953 | 0.17 (0.04-0.74) | 0,0183* |
| CD40 GC | | | | |
| Alta | 2.96 (0.63-13.85) | 0,1689 | - | - |

DISCUSIÓN

1. Análisis descriptivo de la serie de pacientes

El cáncer de pulmón (CP) es uno de los cánceres con mayor incidencia y el más importante en cuanto a mortalidad, con una supervivencia global a 5 años inferior al 15%, representando el cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) el 80-85% de todos los cánceres de pulmón (Inamura K, 2017). Es altamente resistente a la terapia convencional y metastásico, debido en parte al efecto clínico limitado de los tratamientos en la mayoría de los pacientes (Herbst *et al.*, 2018).

El CP es una enfermedad multifactorial, siendo el tabaquismo la principal causa de su desarrollo, como queda patente en el aumento de la mortalidad en mujeres vinculado al incremento en el consumo de tabaco (Cabanes *et al.*, 2009).

En los últimos años se ha incrementado el uso de herramientas moleculares para mejorar la detección y el diagnóstico del CP, pero sigue siendo necesario encontrar nuevos marcadores moleculares que ayuden a identificar y clasificar de manera más precisa el CP.

Con este claro objetivo, llevamos a cabo nuestro estudio en un total de 101 pacientes que agrupamos, según la edad, en mayores y menores de 65 años. Atendiendo a este criterio, no encontramos diferencias en la supervivencia, tanto SG como SLE. Del mismo modo, observamos que el sexo no es un factor que influya significativamente en la supervivencia, aunque sí observamos una mayor SG y SLE en las mujeres, lo que coincide con estudios de

otros grupos (Sagerup *et al.*, 2011; Office for National Statistics, UK) y con los datos recogidos a nivel nacional (SEOM 2020).

En nuestra serie de pacientes el 80% de ellos fueron hombres, lo que supone una proporción 4/1 con respecto a las mujeres. Esta relación ha ido disminuyendo en los últimos años, siendo de 10/1 en los años 80 y 90 (Cabanés *et al.*, 2009). Este claro descenso en la relación hombres/mujeres con CP se debe al aumento del tabaquismo en la mujer (SEOM 2020; Jemal *et al.*, 2018; Fidler-Benaoudia *et al.*, 2020).

A pesar de la importancia del tabaquismo en la incidencia del CP, y aunque sí observamos una tendencia a favor de los no fumadores, nuestros datos no muestran un efecto del tabaquismo sobre la supervivencia de los pacientes, como ya ha sido observado con anterioridad (Meguid *et al.*, 2010). Además, hemos de tener en cuenta que hay otros factores influyen en la aparición del CP, sin poder descartar tampoco el tabaquismo ambiental como posible causa (Planchard y Besse, 2015; Bhopal *et al.*, 2019).

El tipo de tumor más representativo de nuestra serie de datos es el adenocarcinoma de estadio I. Este tipo de tumor es el más común en CP y está asociado con el tabaquismo. Además, es el más diagnosticado en pacientes nunca fumadores (Sun *et al.*, 2007). Tanto el estadio como el grado de diferenciación, son importantes para la supervivencia. En ambos casos, el grado I determina una mejor SG y SLE.

En general, atendiendo a los resultados observados en el análisis de supervivencia, podemos afirmar que nuestra serie de

datos es representativa de la población y coincide con los estudios publicados hasta la fecha.

2. Detección de la micrometástasis en GC

La presencia de metástasis en el GC es el principal factor pronóstico en el CP localizado por lo que es importante su correcta detección.

Para ello, estudiamos la expresión de los genes *CK7*, *CEACAM5* y *BPIFA*. Estos tres genes se expresan exclusivamente en pulmón por lo que su presencia en GC se considera indicativa de células derivadas del pulmón y, por tanto, de micrometástasis (Benlloch *et al.*, 2009; Galbis-Caravajal *et al.*, 2014).

En nuestra serie de datos observamos que *BPIFA1* siempre mostró expresión concomitante con alguno de los otros genes. En base a estos resultados podríamos decir que no sería necesario incluirlo en futuras determinación molecular de la micrometástasis en GC. Sin embargo, sí es necesario determinar la expresión de *CK7* y *CEACAM5*, dado que estos dos marcadores pueden aparecer estar presentes de forma individual o concomitantemente.

Por otra parte, también determinamos la presencia de micrometástasis en GC mediante IHQ, detectando la expresión de *CK7* a nivel proteico en secciones de muestras incluidas en parafina.

Discusión

Es importante destacar que el 54% de las muestras con resultado negativo mediante IHQ resultaron ser positivas mediante qPCR, lo que podría explicarse por la mayor sensibilidad de la PCR respecto a la IHQ. Por el contrario, el 40% de muestras positivas por IHQ obtuvo un resultado negativo mediante qPCR, probablemente atribuible a la falta de células que expresan dicho marcador en la muestra de GC a analizar.

Tampoco podemos obviar que, a pesar de las diferencias entre las dos técnicas, observamos que la presencia micrometástasis detectada por qPCR no influye en la supervivencia de los pacientes. Este resultado contradice estudios anteriores del grupo (Benlloch *et al.*, 2009), aunque estas diferencias podrían explicarse por el menor número de pacientes incluidos en nuestro estudio y por el estudio de un distinto tipo de ganglio (mediastino). Sin embargo, cuando clasificamos los pacientes en función del resultado mediante IHQ, sí que observamos que aquellos con resultado positivo mostraron una peor SLE.

El uso de una técnica sensible como la qPCR nos permite detectar un bajo número de células metastásicas que no aparecen marcadas en la IHQ. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos podríamos decir que la IHQ es más útil clínicamente, puesto que los resultados obtenidos con la misma mostraron tener un mayor valor pronóstico que utilizando la qPCR. Sería conveniente, por tanto, encontrar otros marcadores moleculares de micrometástasis en GC que nos permitan detectarla en aquellos pacientes que acaban sufriendo recaídas.

3. Estudio de la expresión de marcadores de EMT en tumor primario y GC

El proceso de EMT se asocia con riesgo de metástasis y un peor pronóstico en pacientes de CP y otros tumores malignos (Xiao y He, 2010, Karlsson *et al.*, 2017; Chae *et al.*, 2018), siendo la pérdida de E-cadherina (*CDH1*) distintiva de la diseminación del tumor en un proceso canceroso (Markiewicz *et al.*, 2014). Además, estudios anteriores han señalado que alteraciones en otros marcadores de EMT como *TWIST*, N-cadherina (*CDH2*) o *SNAI* se han relacionado con un potencial metastásico (Blanco *et al.*, 2002; Xiao y He, 2010; Toll *et al.*, 2013; Yusup *et al.*, 2017). Sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados hasta hoy han estudiado los marcadores de EMT en tejido tumoral y pocos se han centrado en el GC.

En nuestro trabajo no encontramos diferencias en la expresión de marcadores de EMT entre los tumores de los pacientes con micrometástasis en GC detectada mediante qPCR y los que no la presentaban. Del mismo modo, no encontramos diferencias en la expresión de *CDH1* y *CDH2* en tumores primarios con micrometástasis detectada por IHQ, aunque sí observamos una mayor expresión de *SNAI1*, *VIM*, *ZEB1* y *ZEB2*. Nuestros datos de expresión contrastan con estudios anteriores de otros grupos que observaron una menor expresión de E-cadherina y una mayor expresión de marcadores mesenquimales en distintos tejidos tumorales con mayor potencial metastásico (Wang *et al.*, 2011; Markiewicz *et al.*, 2012; Maeng *et al.*, 2014; Nakamura *et al.*, 2014;

Discusión

Wen *et al.*, 2016). Estas discrepancias podrían deberse a que los tumores se detectaron en una fase temprana, con baja capacidad para desarrollar tumores secundarios, y por ello todavía no habían empezado a progresar.

Por otra parte, en el análisis del estado molecular de la EMT del GC, observamos que la micrometástasis por qPCR e IHQ se relacionó con una alta expresión de *CDH2* y un mayor número de pacientes con alta expresión de *VIM*. Estas diferencias en la expresión de dichos genes no las observamos en los pacientes con micrometástasis positiva por IHQ (aunque sí observamos una menor expresión de *TWIST*), lo que sugiere que el proceso de EMT sucede en el GC sin micrometástasis por IHQ. Por esto, y en línea con lo expuesto anteriormente (punto 2 de la discusión), pensamos que el análisis mediante qPCR sería más preciso para detectar las micrometástasis en GC.

A pesar de que nuestros datos muestran una alta expresión de marcadores mesenquimales en GC con micrometástasis positiva por qPCR, el análisis de la ratio *CDH1/CDH2* de estos mismos GC indicaba un fenotipo más epitelial. Estudios previos han detectado una re-expresión de E-cadherina en células tumorales de GC metastásicos comparados con el tumor primario (Markiewicz *et al.*, 2012; Nakamura *et al.*, 2014; Wen *et al.*, 2016). Esto sugiere que la reversión de la EMT, proceso que se conoce como transición mesénquima-epitelio (MET), es importante para la formación de las lesiones. Se ha propuesto que ambos procesos, EMT y MET, ocurren en los mismos órganos a distintos tiempos para colonizar y,

más tarde, establecer tumores secundarios (Aramaki *et al.*, 2016). Así, nuestros resultados sugieren que el cambio en E-cadherina es un factor clave implicado en el cambio EMT-MET en momentos tempranos del proceso, similar a los resultados que otros grupos han obtenido mediante IHQ en muestras de pacientes con tumores cutáneos y gástricos (Toll *et al.*, 2013; Okubo *et al.*, 2017).

En cuanto al valor pronóstico, el análisis de supervivencia mostró un peor pronóstico en los pacientes con una baja ratio *CDH1/CDH2* en GC (tanto SLE como SG). Sin embargo, exceptuando la alta expresión de *VIM* y *ZEB1* en GC, podemos decir que la expresión de los marcadores de EMT no tiene valor pronóstico por sí misma, tanto en tumor como en GC. La asociación entre la supervivencia de los pacientes y el fenotipo de EMT en GC metastásicos, pero no en tumor primario, se ha observado en diferentes órganos, para los que se ha propuesto el GC como una herramienta con valor pronóstico en CP y otros procesos tumorales (Markiewicz *et al.*, 2012; Okubo *et al.*, 2017; Chae *et al.*, 2018). En consonancia con estos estudios, en nuestra serie observamos que la tanto la alta expresión de *ZEB1* como la baja ratio *CDH1/CDH2* tienen valor pronóstico independiente, asociándose a una peor supervivencia. La expresión de *VIM* en GC se ha relacionado anteriormente con un peor pronóstico en pacientes con CP (Al-Saad *et al.*, 2008). Sin embargo, un meta-análisis reciente no mostró ningún valor pronóstico independiente para la expresión de este gen, pero su sobre-expresión se relacionó con otros factores como estados TNM avanzados, metástasis en GC o carcinoma escamoso celular (Ye *et al.*, 2018).

Discusión

El estudio de la expresión de los marcadores de EMT ha sido ampliamente utilizado para determinar el estado EMT en varios tipos de cáncer, con el objetivo de poder establecer una asociación clínica relevante (Santamaria *et al.*, 2017). En el carcinoma hepatocelular, un perfil de expresión de genes relacionados con el proceso de EMT se ha asociado con un peor pronóstico del paciente (Kim *et al.*, 2010). Además, un análisis reciente de marcadores de EMT llevado a cabo por la TCGA en 10244 muestras de mRNA de 32 tipos diferentes de tumores, estableció un perfil de 16 genes de EMT en el que los genes más mesenquimales (*CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST*, *VIM* y *ZEB2* entre otros) se asociaron significativamente con un peor pronóstico en todos los tipos tumorales, mientras que los genes epiteliales (*CDH1*) tendían a asociarse con un mejor pronóstico (Gibbons y Creighton, 2018). Estos trabajos ponen de manifiesto que la expresión de marcadores de EMT se podría usar como una herramienta de cribado rutinaria para la clasificación de los pacientes.

Con todo, nuestros datos sugieren que la expresión de marcadores de EMT en GC se podría utilizar para mejorar la clasificación de los pacientes y predecir un pronóstico para los pacientes en estadio temprano de CP. Este análisis complementaría la evaluación histopatológica para estudiar la micrometástasis mediante métodos moleculares con mayor profundidad y así detectar aquellos pacientes de CP en estadio temprano que recaen pero que no son detectados mediante los análisis histopatológicos rutinarios.

4. Estudio de la expresión de marcadores del sistema inmunitario en tumor primario y GC

Hasta la fecha, los tratamientos de elección más comunes para tratar el CP han sido dirigidos contra el tumor, aunque recientemente se han desarrollado nuevos tratamientos con fármacos específicos dirigidos contra vías de señalización (Chen *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha observado la aparición de resistencias a dichos tratamientos.

Como alternativa, se ha propuesto estimular el sistema inmunitario del propio paciente con el objetivo de restaurar una respuesta antitumoral efectiva (Pardoll D, 2012 y 2015), dados los buenos resultados obtenidos en otros tipos de tumor como melanoma y cáncer de riñón (Villaruz *et al.*, 2014; Garon EB, 2015).

Por esto, pensamos que el estudio de la expresión de los marcadores de las diferentes vías de control inmunológico en el tumor y GC de los pacientes podría contribuir a identificar nuevas dianas susceptibles de ser bloqueadas mediante inmunoterapia. Además, la relación de la expresión de estos marcadores con las características clínico-patológicas de los pacientes podría ofrecer una mejor clasificación de la enfermedad y una mejora en la elección del tratamiento.

En un primer análisis de los marcadores del sistema inmunitario en tejido tumoral, encontramos que alrededor del 60% de

Discusión

los pacientes mostraron una alta expresión de *CD137* y *GITR*, mientras que menos del 20% mostraron una alta expresión de *PD-1* y *PD-L1*. De todos los marcadores estudiados, únicamente *CD27* y *CD137* aparecieron en mayor frecuencia en los pacientes con micrometástasis positiva por qPCR.

Por otra parte, el estudio mostró valores más altos de expresión de los marcadores *CD27*, *CD28* y *CD40* en los tumores de pacientes con un resultado positivo de micrometástasis por qPCR. Sorprendentemente, la expresión de *CD27* fue menor en los pacientes con micrometástasis positiva detectada median IHQ. Como ya hemos discutido en el punto 2, la técnica de qPCR nos permite detectar positivos que no podemos determinar mediante IHQ. Es probable que muchos de los pacientes con alta expresión de *CD27* con resultado negativo mediante IHQ tenga un resultado positivo mediante qPCR.

Los receptores celulares *CD27*, *CD28* y *CD40* son moléculas co-estimuladoras que modulan la respuesta inmunitaria mediada por células T. Mientras que *CD27* y *CD28* estimulan la respuesta de las células T, *CD40* es esencial para desencadenar una respuesta inmunitaria específica y está involucrada en la diferenciación y supervivencia celular y apoptosis (Sundar *et al.*, 2014).

La señalización mediante *CD27* tiene un papel inmunitario importante y se podría usar como terapia antitumoral ya que se ha visto que linfocitos infiltrados en el tumor sólido expresan *CD27* (Starzer y Berghoff, 2020). *CD28* amplifica la señalización mediada

por los receptores de linfocitos T y pertenece a la misma familia que los receptores CTLA-4 y PD-1, los cuales antagonizan con el primero y tienen un papel importante en CP (discutido en detalle más adelante) (Callahan *et al.*, 2016; Eisenstein *et al.*, 2016). En cuanto a CD40, estudios anteriores han observado su expresión en diversos tipos de tumores (van der Oord *et al.*, 1996; Cooke *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2008; Slobodova *et al.*, 2011) tales como el CP (Ishikawa *et al.*, 2008), con resultados similares a los nuestros, en los que aproximadamente el 50% de los pacientes mostraron expresión de CD40 en tejido tumoral. Sin embargo, la presencia de este marcador en CP resultaba en un peor pronóstico (Sabel *et al.*, 2000; Ishikawa *et al.*, 2008).

El análisis de supervivencia mostró una menor SG de los pacientes con baja expresión de *CD27* en tejido tumoral. Además, aquellos con una alta expresión de *KIR*, *PD-1* y *PD-L1* también mostraron menor supervivencia, en este caso SLE.

Como ya hemos comentado, *CD27* podría usarse como terapia antitumoral, concretamente mediante el uso de anticuerpos agonistas (Starzer y Berghoff, 2020). En este contexto, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal humano denominado varlilumab que ya se encuentra en fase clínica (Burriss *et al.*, 2017; Ansell *et al.*, 2020). Además, se está estudiando la posibilidad de usar anticuerpos agonistas de *CD27* en combinación con el bloqueo de CTLA-4 y PD-1. De hecho, se han llevado a cabo estudios en fase preclínica con resultados prometedores (Ahrends *et al.*, 2016; Buchan *et al.*, 2018).

Discusión

La vía de PD-1 juega un papel importante en la inhibición del efecto inmune citotóxico (Brahmer JR, 2012; Callahan *et al.*, 2016; Eisenstein *et al.*, 2016). El receptor PD-1, presente en diversas células T, en linfocitos B y las células NK, interacciona con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2), e inhibe la activación de las células T (Domagala-Kulawik J, 2015). Por el momento se han aprobado tratamientos con anticuerpos monoclonales, tanto contra PD-1 (pembrolizumab y nivolumab), como contra PD-L1 (atezolizumab), cuyo uso terapéutico ha mostrado una mejora en la supervivencia de los pacientes con CP (Reck *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018). Es conveniente destacar que la eficacia de pembrolizumab depende de la expresión de PD-L1 como biomarcador. Solo aquellos pacientes con más del 50% de células con expresión de este marcador (determinado mediante IHQ) responden al tratamiento, lo que pone de manifiesto la importancia de su correcta determinación. En este sentido, es importante el uso de la qPCR, ya que nos va a permitir identificar con mayor sensibilidad y precisión la expresión tanto de este como de otros biomarcadores. De hecho, la importancia de la determinación de este marcador queda clara cuando observamos que su alta expresión en tejido tumoral en nuestra serie de pacientes podría usarse como marcador con valor pronóstico independiente.

KIR es un receptor de membrana que participa en la activación de las células NK (Lanier LL, 2005). Trabajos anteriores en diversos tipos de cáncer han puesto de manifiesto el posible papel como biomarcador de este gen (Jobim *et al.*, 2013; De Re *et al.*, 2014), incluyendo el CP (He *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019). Nuestro análisis de supervivencia basada en la expresión de los marcadores

sugiere que una alta expresión de *KIR* se puede usar como biomarcador que indica un peor pronóstico, aunque no podemos decir que tiene valor pronóstico independiente.

En cuanto al GC, observamos que un mayor número de pacientes con micrometástasis positiva por qPCR presentaba una alta expresión de los marcadores *CD137* y *LAG-3*. Es destacable que *CD137* también mostró una alta expresión con mayor frecuencia en las muestras de tejido tumoral de estos pacientes. De hecho, este marcador mostró una alta correlación entre ambos tejidos. *CD137*, también denominado receptor del factor de necrosis tumoral TNFRSF9, posee, al igual que *CD27*, *CD28* y *CD40*, actividad estimuladora sobre las células T, aunque también es importante en otras células del sistema inmunitario como las células *NK*, células dendríticas y linfocitos B, entre otras (Vinay y Kwon, 2011). Desde hace años se conoce el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales anti-*CD137* (Melero *et al.*, 1997), sin embargo, los datos que existen hasta el momento muestran distintos efectos en función del tipo de tumor (Chu *et al.*, 2019; Ye *et al.*, 2020) por lo que sería conveniente investigar terapias combinatorias con otros anticuerpos. Nosotros no podemos más que especular al respecto, pero dada la correlación que encontramos entre los marcadores *CD27* y *CD137* y su similar vía de actuación, quizá se podría explorar el uso de una terapia combinatoria con anticuerpos para ambas vías.

El gen *LAG-3* codifica para una proteína que se une al complejo mayor de histocompatibilidad II e inhibe la proliferación y

Discusión

activación de linfocitos T (Huang *et al.*, 2004). Además, posee un efecto sinérgico con la vía de PD-1/PD-L1 (Okazaki *et al.*, 2011; Takaya *et al.*, 2015). Estudios han encontrado una correlación entre LAG-3 y PD-1/PD-L1 en tejido tumoral y linfocitos infiltrados, que se ha relacionado con un peor pronóstico en pacientes de CP (He *et al.*, 2017). En nuestro caso no encontramos esta correlación en nuestra serie de pacientes, pero podría deberse a la falta de datos para alguno de los pacientes o al bajo número de ellos, lo que supone una clara limitación a la hora de llevar a cabo un estudio completo de este tipo.

En el análisis de expresión de los marcadores del sistema inmunitario observamos que los pacientes con un resultado positivo de micrometástasis por qPCR mostraron mayores niveles de expresión de *CD40*, *KIR*, *OX-40* y *PD-L2*. Es destacable que los pacientes con micrometástasis detectada por qPCR mostraron mayores niveles de expresión de *CD40* tanto en tejido tumoral como en GC, y que una mayor expresión en GC está relacionada con una menor SLE y un mayor riesgo de recaída. A pesar de la clara relación de este marcador con una menor supervivencia, la expresión de este gene no presenta valor pronóstico independiente, probablemente debido al bajo número de pacientes del estudio con datos completos.

El ligando PD-L2 actúa a través de su receptor PD-1 para inhibir la proliferación de células T (Latchman *et al.*, 2001). PD-L2 no se ha estudiado tanto como PD-L1, pero un meta-análisis reciente que incluye muestras de diferentes tumores sólidos de más de 3500

pacientes mostró que los pacientes con una alta expresión de PD-L2 presentaron un peor pronóstico (Yang *et al.*, 2019). Nuestros datos coinciden con lo expuesto en este estudio; los pacientes con valores altos de expresión de *PD-L2* mostraron una menor SLE, aunque en nuestro caso esta elevada expresión se da en el GC.

El receptor del factor de necrosis tumoral TNFRSF4 es comúnmente conocido como OX-40 y se expresa en células T activadas tras su estimulación a través del receptor. Además, su capacidad para regular células T lo convierte en candidato para terapia antitumoral (Croft *et al.*, 2009). De hecho, tratamiento con anticuerpos monoclonales agonistas que incluyen terapia combinatoria con PD-1, CD27 y CD137 se han testado en fase clínica (Deng *et al.*, 2019). Nuestros datos mostraron una mayor expresión de *OX-40* en el GC de los pacientes con micrometástasis positiva. Nuestros datos de expresión no se relacionan significativamente con la supervivencia de los pacientes por lo que no podemos asignarle un valor pronóstico. Sin embargo, trabajos recientes al respecto son contradictorios. Mientras que un estudio muestra que la alta expresión de este marcador (determinada por IHQ) en infiltrado inmunitario en tumores de CP se asocia con un pronóstico favorable (Massarelli *et al.*, 2019), otro concluye que niveles altos de *OX-40* en sueros de pacientes con adenocarcinoma avanzado están relacionados con un peor pronóstico (Kashima *et al.*, 2020).

En el análisis de supervivencia, además de los marcadores identificados en GC ya comentados (*LAG-3* y *PD-L2*) encontramos

Discusión

que la alta expresión de *TIM-3* se relacionó con una menor SG y SLE y que la alta expresión de *CD40*, *CTLA-4*, *LAG* y *PDC* se relacionó con una menor SLE.

El gen *CTLA-4* codifica para un receptor presente en los linfocitos T y su estimulación resulta en la inhibición de los propios linfocitos (Pardoll D, 2012). El bloqueo de esta vía mediante el uso de anticuerpos se ha utilizado como terapia antitumoral en CP, aunque con una baja tasa de respuesta (Buchbinder y Desay, 2016). Dada la relación que existe entre *CTLA-4* y la vía PD-1/PD-L1, se han propuesto tratamientos basados en terapia combinatoria contra PD-1 y *CTLA-4*. En este caso se ha observado un aumento de la eficacia del tratamiento en CP, lo que resulta en una mayor supervivencia de los pacientes (Hellman *et al.*, 2019). Un estudio que evaluó la expresión de *CTLA-4* en tejido tumoral de pacientes con CP, observó que una mayor expresión de este gen correlacionaba con una mayor supervivencia (Salvi *et al.*, 2012). Nuestros datos apuntan en la dirección opuesta, ya que una mayor expresión de *CTLA-4* se correlaciona con una menor SLE, si bien es cierto que estos datos proceden de GC y no del tumor. En este sentido, un estudio anterior encontró que una alta expresión de *CTLA-4* en nódulos linfáticos con metástasis de pacientes con CP se asociaba con una menor supervivencia (Paulsen *et al.*, 2017), lo que pone de manifiesto la importancia de la detección de este marcador.

TIM-3, es también un receptor que se encuentra en los linfocitos T y otras células del sistema inmunitario y cuya función principal es inhibir la actividad de las células T (Monney *et al.*, 2002).

En estudios anteriores se ha observado que una alta expresión de este gen en tejido de diversos tumores sólidos (Das *et al.*, 2017), incluyendo el CP (Gao *et al.*, 2012; Zhuang *et al.*, 2012), se asocia con un peor pronóstico. Nuestros datos coinciden con estos estudios, ya que en nuestra serie una alta expresión de *TIM-3* en GC se asocia con una menor SG y SLE.

El bloqueo de *TIM-3* se ha propuesto como inmunoterapia para el tratamiento del cáncer. En este sentido, se ha probado en distintos estudios clínicos la eficacia de los inhibidores de *TIM-3*. Además, estudios preclínicos han observado que la inhibición combinada de *TIM-3* y otros factores, como *PD-1* o *CD137*, es más efectiva que por separado (Das *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

1. En nuestra serie de pacientes, la edad, el sexo, el tabaquismo y la histología del tumor no son factores pronósticos. Sin embargo, el estadio y el grado de diferenciación sí mostraron valor pronóstico.
2. Pese a que la detección de micrometástasis en GC mediante qPCR es más sensible, no encontramos correlación con la supervivencia de los pacientes.
3. Los pacientes con una alta expresión de *VIM* y *ZEB1* tienen menor riesgo de supervivencia. Los pacientes con una ratio baja *CDH1/CDH2* en GC con tienen mayor riesgo de recaída y de supervivencia.
4. El estudio de la expresión de genes de EMT *ZEB1* y la ratio *CDH1/CDH2* del GC se puede usar como factor pronóstico independiente de pacientes con CP en estadio temprano y constituye una nueva herramienta para una mejor clasificación de los pacientes y predicción del pronóstico.
5. La baja expresión de *CD27* y la alta expresión de *KIR*, *PD-1* y *PD-L1* en tumor se asocian con una menor supervivencia de los pacientes. De hecho, la alta expresión de *PD-1* en tumor tiene valor pronóstico independiente.
6. La elevada expresión de *CD40*, *CTLA-4*, *LAG-3*, *PD-L2* y *TIM-3* en GC de pacientes con CP se asocian con una menor supervivencia.
7. El estudio del perfil de expresión de los marcadores del sistema inmunitario nos permite establecer un mejor pronóstico y clasificación

Conclusiones

del paciente con el objetivo de mejorar el tratamiento con inmunoterapia.

BIBLIOGRAFIA

A

Ahmedin Jemal, D.V.M., Ph.D., Kimberly D. Miller, M.P.H., Jiemin Ma, Ph.D., Rebecca L. Siegel, M.P.H., Stacey A. Fedewa, Ph.D., Farhad Islami, M.D., Ph.D., Susan S. Devesa, Ph.D., and Michael J. Thun, M.D. Higher Lung Cancer Incidence in Young Women Than Young Men in the United States. *N Engl J Med* 2018; 378:1999-2009

Ahrends T, Bąbala N, Xiao Y, Yagita H, van Eenennaam H, Borst J. CD27 Agonism Plus PD-1 Blockade Recapitulates CD4+ T-cell Help in Therapeutic Anticancer Vaccination. *Cancer Res.* 2016;76(10):2921-2931.

Al-Saad S, Al-Shibli K, Donnem T, Persson M, Bremnes RM, Busund LT. The prognostic impact of NF-kappaB p105, vimentin, E-cadherin and Par6 expression in epithelial and stromal compartment in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(9):1476-1483.

Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132: 29S-55S.

Alexander Spira. Multidisciplinary management of lung cancer. *N Engl J Med.* 2004;350 (6): 379–92.

American Thoracic Society. Medical section of the American Lung Association. Clinical staging of primary lung cancer. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127(5):659-664.

Bibliografia

Ansell SM, Flinn I, Taylor MH, et al. Safety and activity of varlilumab, a novel and first-in-class agonist anti-CD27 antibody, for hematologic malignancies. *Blood Adv.* 2020;4(9):1917-1926.

Aramaki N, Ishii G, Yamada E, et al. Drastic morphological and molecular differences between lymph node micrometastatic tumors and macrometastatic tumors of lung adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016;142(1):37-46.

Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non- small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350:351-60.

Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Tsuchiya R, Miyaoka E. How should the TNM staging system for lung cancer be revised? A simulation based on the Japanese Lung Cancer Registry populations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132: 316-9.

Asamura H. Treatment of choice for stage I non-small cell lung cancer: surgery or radiotherapy? *J Thorac Oncol* 2006; 1:766-7.

B

Barr LC, Baum M. Time to abandon TNM staging of breast cancer? *Lancet* 1992;339: 915-7.

Benlloch S, Galbis JM, Alenda C, Sanchez M, Rodriguez JM, Baschwitz B, et al. Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC):

Prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases. *Ann Oncol.* 2009; 20 :91–7.

Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012;30:863-70.

Berraondo P, Minute L, Ajona D, Corrales L, Melero I, Pio R. Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. *Immunol Rev.* 2016; 274 (1): 290-306.

Bhopal, A., Peake, M. D., Gilligan, D., & Cosford, P. (2019). Lung cancer in never-smokers: a hidden disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 112(7), 269–271.

Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrio D, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene.* 2002;21(20):3241-3246.

Brahmer JR. PD-1-targeted immunotherapy: recent clinical findings. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2012;10(10):674-675.

Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Eighth ed. Oxford, UK; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2017

Bubendorf, L., Büttner, R., Al-Dayel, F. *et al.* Testing for *ROS1* in non-small cell lung cancer: a review with recommendations. *Virchows Arch* **469**, 489–503 (2016).

Bibliografía

Buchan SL, Fallatah M, Thirdborough SM, et al. PD-1 Blockade and CD27 Stimulation Activate Distinct Transcriptional Programs That Synergize for CD8⁺ T-Cell-Driven Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res.* 2018;24(10):2383-2394.

Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol.* 2016;39(1):98-106.

Burke H, Henson DE. Criteria for prognostic factors and for an enhanced prognosis system. *Cancer* 1993; 72:3131–35.

Burriss HA, Infante JR, Ansell SM, et al. Safety and Activity of Varlilumab, a Novel and First-in-Class Agonist Anti-CD27 Antibody, in Patients With Advanced Solid Tumors *J Clin Oncol.* 2017;35(18):2028-2036.

C

Cabanes Domenech A, Pérez-Gómez B, Aragonés N, Pollán M, López-Abente G. La situación del cáncer en España, 1975-2006. Madrid: Instituto de Salud Carlos III; 2009.

Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. Targeting T Cell Co-receptors for Cancer Therapy. *Immunity.* 2016;44(5):1069-1078.

Campesato LF, Barroso-Sousa R, Jimenez L, et al. Comprehensive cancer-gene panels can be used to estimate mutational load and predict clinical benefit to PD-1 blockade in clinical practice. *Oncotarget* 2015; 6:34221-7.

Chae [YK](#), [Chang S](#), [Ko T](#), [Anker J](#), [Agte S](#), [Iams W](#), et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) signature is inversely associated with T-cell infiltration in non-small cell lung cancer (NSCLC). [Sci Rep](#). 2018; 8(1): 2918.

Chen R, Tao Y, Xu X, et al. The efficacy and safety of nivolumab, pembrolizumab, and atezolizumab in treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Discov Med*. 2018;26(143):155-166.

Chen Z, Fillmore CM, Hammerman PS, Kim CF, Wong KK. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases [published correction appears in *Nat Rev Cancer*. 2015 Apr;15(4):247]. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(8):535-546.

Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2012; 22 (1): 23- 32.

Chu DT, Bac ND, Nguyen KH, et al. An Update on Anti-CD137 Antibodies in Immunotherapies for Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8):1822.

Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: Diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007;75(1):56–63.

Cooke PW, James ND, Ganesan R, Wallace M, Burton A, Young LS. CD40 expression in bladder cancer. *J Pathol*. 1999;188(1):38-43.

COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Accessed August 16 2017); 2016 (<http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)

Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The significance of OX40 and

Bibliografía

OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev.* 2009;229(1):173-191.

D

D'Amico TA, Massey M, Herndon JE, Moore MB, Harpole DH. A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 480 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:736-43.

Darling GE, Allen MS, Decker PA, Ballman K, Malthaner RA, Inculet RI, et al. Number of lymph nodes harvested from a mediastinal lymphadenectomy. Results of the Randomized, Prospective American College of Surgeons Oncology Group Z0030 Trial. *Chest.* 2011; 139:1124–9.

Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev.* 2017;276(1):97-111.

Datos epidemiológicos sobre cáncer de pulmón en la Comunidad Valenciana 2005 y 2007. Plan Oncológico de la Comunidad Valenciana. Consellería de Sanitat.

De Re V, Caggiari L, De Zorzi M, et al. Genetic diversity of the KIR/HLA system and outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy. *PLoS One.* 2014;9(1):e84940.

De Wever W, Vankan Y, Stroobants S, Verschakelen J. Detection of extrapulmonary lesions with integrated PET/CT in the staging of lung

cancer. *Eur Respir J.* 2007;29(5):995–1002.

Deng J, Zhao S, Zhang X, et al. OX40 (CD134) and OX40 ligand, important immune checkpoints in cancer. *Onco Targets Ther.* 2019; 12:7347-7353.

Denoix PF. Enquête permanent dans les centres anticancereaux. *Bull Inst Nat Hyg* 1946;1: 70-5.

Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest.* 2017;151(1):193–203

Detterbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street?. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;155(1):356–9

Devesa SS, Bray F, Vizcaino P, Parkin M. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer* 2005; 117:294-9.

Dianbo Y, Chaoliu D, Songlin P. Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2011;9(12):1608-20.

Domagala-Kulawik J. The role of the immune system in non-small cell lung carcinoma and potential for therapeutic intervention. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(2):177-90.

Dongre, A., Weinberg, R.A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat*

Bibliografía

Rev Mol Cell Biol 2019; 20: 69–84.

Donington JS, Le QT, Wakelee HA. Lung cancer in women: exploring sex differences in susceptibility, biology, and therapeutic response. *Clin Lung Cancer* 2006; 8:22-9.

Duma N, Santana-Davila R, Molina JR. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2019;94(8):1623-1640.

E

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL. En:Trotti III A, editor. *Cancer staging manual*. 7 th ed. New York: Springer. 2010.

Esensten JH, Helou YA, Chopra G, Weiss A, Bluestone JA. CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity.* 2016;44(5):973-988.

Estrategia contra el cáncer de la Comunitat Valenciana 2019-2022 (2019).

F

Felip E, Rosell R, Maestre J, Rodríguez-Paniagua JA, Morán T, Astudillo J, et al. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3138-45.

Feng SH, Yang ST. The new 8th TNM staging system of lung cancer and its potential imaging interpretation pitfalls and limitations with CT image demonstrations. *Diagn Interv Radiol*. 2019;25(4):270–279.

Ferrer I, Zugazagoitia J, Herbertz S, et al. KRAS-mutant non-small cell lung cancer: from biology to therapy. *Lung Cancer*. 2018; 124:53–64

Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012; 23 (8): 6-9.

Freire J, Ajona D, de Biurrun G, et al. Silica-induced chronic inflammation promotes lung carcinogenesis in the context of an immunosuppressive microenvironment. *Neoplasia*. 2013;15(8):913-924.

Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 2015; 527: 472– 6.

Friboulet L, Li N, Katayama R et al/ The ALK inhibitor Ceritinib overcomes Crizotinib resistance in non - small cell lung Cancer. *Cancer Discov* 2014; 4: 662–73

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D and Birchmeier W. E-cadherin- mediated cell cell-adhesion prevents invasiveness of human carcinoma-cells. *J Cell Biol* 1991:113, 173–85.

Bibliografía

Fuxe J and Karlsson MC. Tgf-beta-induced epithelial-mesenchymal transition: a link between cancer and inflammation. *Semin Cancer Biol* 2012; 22; 455– 61.

G

Galbis, JM; Cremades, A; Zuñiga, A; Estors, M; Tembl, A; Martinez, N; et al. El ganglio centinela en el carcinoma pulmonar. Estudio molecular tras detección con radio isótopo. *Cir Esp* 2014; 92: 1-3.

Galbis J, Lafuente A, Estors M, Martinez N, Fuster C, Cremades A, Zuñiga A. Topography of the sentinel node according to the affected lobe in lung cancer. *Clin Transl Oncol* 2017; 19 (7): 858 – 64.

Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, et al. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. *Blood*. 2006;108(7):2280-2289.

Gao X, Zhu Y, Li G, et al. TIM-3 expression characterizes regulatory T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One*. 2012;7(2):e30676.

Garon EB. Current Perspectives in Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Semin Oncol*. 2015;42 Suppl 2:S11-S18.

Gibbons DL, Creighton CJ. Pan-cancer survey of epithelial-mesenchymal transition markers across the Cancer Genome Atlas. *Dev Dyn*. 2018;247(3):555-564.

Giroux DJ, Rami-Porta R, Chansky K, Crowley JJ, Groome PA, Postmus PE, et al., on behalf of the International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee The IASLC lung cancer staging project. Data elements for the prospective project. *J Thorac Oncol*. 2009; 4:679–83.

Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the stage grouping in the forthcoming (8th) edition of the TNM classification of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 39–51.

Gridelli C, Ardizzoni a., Le Chevalier T, Manegold C, Perrone F, Thatcher N, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer patients with ECOG performance status 2: Results of an European Experts Panel. *Ann Oncol*. 2004;15(3):419–26.

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell*. 2010; 140 (6): 883-99.

Gu CD, Osaki T, Oyama T, Inoue M, Kodate M, Dobashi K, et al. Detection of micrometastasis cells in pN0 lymph nodes of patients with completely resected nonsmall cell lung cancer: Impact on recurrence and survival. *Ann Surg*. 2002; 235: 133–9.

H

Hallberg B, Palmer RH (October 2013). "Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology". *Nature Reviews*.

Bibliografia

Cancer. **13** (10): 685–700.

Hay ED. An overview of epithelio- mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)*. 1995; 154:8-20.

He Y, Bunn PA, Zhou C, Chan D. KIR 2D (L1, L3, L4, S4) and KIR 3DL1 protein expression in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016;7(50):82104-82111.

He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch FR. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Onco Targets Ther*. 2018; 11:7005-9. Published 2018 Oct 16.

Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(21):2020-31.

Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 2018;553(7689):446-54.

Hsu CP, Hsia JY, Chang GC, Chuang CY, Shai SE, Yang SS, et al. Surgical– pathologic factors affect long-term outcomes in stage IB (pT2 N0 M0) non–small cell lung cancer: a heterogeneous disease. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138: 426-33.

Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*. 2004;21(4):503-513.

Hwangbo B, Kim SK, Lee HS, Lee HS, Kim MS, Lee JM, et al. Application of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle

aspiration following integrated PET/CT in mediastinal staging of potentially operable non-small cell lung cancer. *Chest*. 2009;135(5):1280–7.

I

Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol*. 2017; 7:193.

Ishikawa K, Miyamoto M, Yoshioka T, et al. Up-regulation of CD40 with juxtacrine activity in human nonsmall lung cancer cells correlates with poor prognosis. *Cancer*. 2008;113(3):530-41.

J

Jobim MR, Jobim M, Salim PH, et al. Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. *Hum Immunol*. 2013;74(9):1130-3.

Jones DR, Daniel TM, Denlinger CE, Rundall BK, Smolking ME, Wick MR. Stage IB nonsmall cell lung cancers: are they all te same? *Ann Thorac Surg* 2006;81: 1958-62.

K

Kajiyama H, Shibata K, Terauchi M, Yamashita M, Ino K, Nawa A and Kikkawa F. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells. *Int J Oncol* 2007; 31: 277 – 83.

Bibliografia

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.

Karlsson C, Gonzalez S, Josefin Welin J, Fuxe J. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis through the lymphatic system. *Molecular Oncology* 2017; 11: 781 – 97.

Karnofsky DA BJ. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer. In Macleod CM (ed.): *Evaluation of Chemotherapeutic Agents.* New York, NY: Columbia. The clinical evaluation of chemotherapeutic agents in cancer In Macleod CM (ed): *Evaluation of Chemotherapeutic Agents* New York, NY: Columbia University Press. 1949: 199–205.

Kashima J, Okuma Y, Hosomi Y, Hishima T. High Serum OX40 and OX40 Ligand (OX40L) Levels Correlate with Reduced Survival in Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma. *Oncology.* 2020;98(5):303-10.

Kataru RP, Lee YG and Koh GY. Interactions of immune cells and lymphatic vessels. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2014; 214: 107–18.

Kazandjian D, Blumenthal GM, Luo L, He K, Fran I, Lemery S, Pazdur R. Benefit-Risk Summary of Crizotinib for the Treatment of Patients With ROS1 Alteration-Positive, Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncologist.* 2016 Jun 21. pii: theoncologist.2016-0101.

Kim J, Hong SJ, Park JY, et al. Epithelial-mesenchymal transition gene signature to predict clinical outcome of hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2010;101(6):1521-8.

Kratz JR, He J, Van Den Eeden SK, Zhu ZH, Gao W, Pham PT, et al. A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet* 2012; 379:823-32.

Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, IA. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363:1693–703.

L

Lamouille S, Xu J and Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15; 178– 96.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:225-74.

Las cifras del cáncer en España. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). 2020

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-8.

Levi F, Bossetti C, Fernandez E, Hill C, Lucchini F, Negri E, et al. Trends in lung cancer among young European women: the rising epidemic in France and Spain. *Int J Cancer* 2007; 121:462-5.

Bibliografía

Li Y, Liu S, Hong C, et al. The association of *HLA/KIR* genes with non-small cell lung cancer (adenocarcinoma) in a Han Chinese population. *J Cancer*. 2019;10(20):4731-8.

Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S. The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg*. 2018;8(7):709–18.

Liu X, Wang P, Zhang C, Ma Z. Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer. *Oncotarget*. 2017;8(30):50209-50220.

Loganathan RS, Stover DE, Shi W, Venkatraman E. Prevalence of COPD in women compared to men around the time of diagnosis of primary lung cancer. *Chest* 2006;129 :1305–12.

López-Encuentra A, Duque-Medina JL, Rami-Porta R, Gómez de la Cámara A, Ferrando P. Staging in lung cancer: is 3 cm a prognostic threshold in pathologic stage I non-small cell lung cancer? A multicenter study of 1.020 patients. *Chest* 2002;121 :1515-20.

M

Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Aokage K, Nishimura M, et al. Long-term survival and risk factors for recurrence in stage I non-small cell lung cancer patients with tumors up to 3 cm in maximum dimension. *Chest* 2010;138: 357-62.

Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Poor prognostic factors in patients with stage IB non-small cell lung cancer according to the seventh edition TNM classification. *Chest* 2011;139: 855-61.

Maeng YI, Kim KH, Kim JY, et al. Transcription factors related to epithelial mesenchymal transition in tumor center and margin in invasive lung adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4095-4103.

Malumbres, M. and Barbacid, M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer.* 2003; 3: 459–465

Markiewicz A, Ahrends T, Wełnicka-Jaśkiewicz M, et al. Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer. *J Transl Med.* 2012; 10:226.

Markiewicz A, Wełnicka-Jaśkiewicz M, Seroczyńska B, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers in lymph node metastases and primary breast tumors - relation to dissemination and proliferation. *Am J Transl Res.* 2014;6(6):793-808.

Massarelli E, Papadimitrakopoulou V, Welsh J, Tang C, Tsao AS. Immunotherapy in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(1):53-63.

Massarelli E, Lam VK, Parra ER, et al. High OX-40 expression in the tumor immune infiltrate is a favorable prognostic factor of overall survival in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer.*

Bibliografia

2019;7(1):351.

Mathot L, Steninger J. Behavior of seeds and soil in the mechanism of metastasis: a deeper understanding. *Cancer Sci.* 2012;103(4):626-31.

Meguid RA, Hooker CM, Harris J, et al. Long-term survival outcomes by smoking status in surgical and nonsurgical patients with non-small cell lung cancer: comparing never smokers and current smokers. *Chest.* 2010;138(3):500-509. doi:10.1378/chest.08-2991

Mehta AC, Kathawalla SA, Chan CC AA. Role of bronchoscopy in the evaluation of solitary pulmonary nodule. *J Bronchol.* 1995; 2:315-22.

Minamiya Y, Ito M, Hosona Y, Kawai H, Saito H, Katayose Y, et al. Subpleural injection of tracer improves detection of mediastinal sentinel lymph nodes in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardio Thor Surg.* 2007;770-5.

Miranda M, Fidler - Benaoudia Lindsey A, Torre Freddie Bray Jacques Ferlay Ahmedin Jemal. Lung cancer incidence in young women vs. young men: A systematic analysis in 40 countries. *Int. J. Cancer* 2020; 147:811-9.

Misthos P, Sepsas E, Kokotsakis J, Skottis I, Lioulias A. The significance of one station N2 disease in the prognosis of patients with nonsmall-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2008; 86:1626-31.

Mittra I. Failure of the TNM system. *Lancet Oncol* 2003;4: 59.

Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin–paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361:947-57.

Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002;415(6871):536-41.

Mountain CF, Carr Dt, Anderson WAD. A system for the clinical staging of lung cancer. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 1974;120: 130-8.

N

Nakamura M, Onoda N, Noda S, et al. E-cadherin expression and cell proliferation in the primary tumor and metastatic lymph nodes of papillary thyroid microcarcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2014;2(2):226-32.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA and Thiery JP (2016) EMT: 2016. *Cell* 166, 21–45.

Noguchi M, Morikawa a., Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. Small adenocarcinoma of the lung: Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 1995;75(12):2844–52.

Nomori H, Kohno M, Izumi Y, Ohtsuka T, Asakura K. Sentinel nodes in lung cancer: Review of our 10-year experience. *Surg Today*. 2011; 41:889–95.

O

Office for National Statistics, Cancer survival by stage at diagnosis for England, 2019.

Okazaki T, Okazaki IM, Wang J, et al. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. *J Exp Med*. 2011;208(2):395-407.

Oken MM, Creech RH TD. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982; 5:649-55.

Okubo K, Uenosono Y, Arigami T, et al. Clinical significance of altering epithelial-mesenchymal transition in metastatic lymph nodes of gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2017; 20(5):802-10.

Ou S-H. I, Zell JA. Prognostic significance of the number of lymph nodes removed at lobectomy in stage IA non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2008; 3:880–6.

P

Padilla J, Calvo V, Peñalver JC, Sales G, Morcillo A. Surgical results and prognostic factors in early non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1997;63: 324-6.

Pang MF, Georgoudaki AM, Lambut L, Johansson J, Tabor V, Hagikura K, Jin Y, Jansson M, Alexander JS, Nelson CM et al. (2016) Tgf-beta1-induced emt promotes targeted migration of breast cancer

cells through the lymphatic system by the activation of ccr7/ ccl21-mediated chemotaxis. *Oncogene* 2016;35: 748–60.

Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-64.

Pardoll D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol*. 2015;42(4):523-38.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55: 74 - 108.

Patel JD. Lung cancer in women. *J Clin Oncol* 2005; 23:3212-8.

Paulsen EE, Kilvaer TK, Rakaee M, et al. CTLA-4 expression in the non-small cell lung cancer patient tumor microenvironment: diverging prognostic impact in primary tumors and lymph node metastases. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(11):1449-1461. doi:10.1007/s00262-017-2039-2

Planchar D, Besse B. Lung cancer in never smokers. *Eur Respir J* 2015; 45:1214-7.

R

Rami-Porta R, Call S, Doooms C, et al. Lung cancer staging: a concise update. *Eur Respir J* 2018; 51: 1800190

Reck M, Paz-Ares L. Immunologic checkpoint blockade in lung cancer. *Semin Oncol*. 2015; 42(3):402-17.

Bibliografia

Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-33.

Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale D a., et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(18):5731–4.

Riquet M, Bagan P, Le Pimpec Barthes F, Banu E, Scotte F, Foucault C, et al. Completely resected non-small cell lung cancer: Reconsidering prognostic value and significance of N2 metastases. *Ann Thorac Surg*. 2007; 84: 1818 – 24.

Risolino M, Mandia N, Lavarone F. Transcription factor PREP1 induces EMT and metastasis by controlling the TGF- β –SMAD3 pathway in non-small cell lung adenocarcinoma. *PNAS* 2014; E3775–E3784

Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361 (10):958–67.

Russell PA, Wainer Z, Wright GM, Daniels M, Conron M, Williams RA. Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: a clinicopathologic study based on the New International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society. International Multidisciplinary Lung Adenocarcinoma Classification. *J Thorac Oncol* 2011; 6:1496-504.

S

Sabel MS, Yamada M, Kawaguchi Y, Chen FA, Takita H, Bankert RB. CD40 expression on human lung cancer correlates with metastatic spread. *Cancer Immunol Immunother*. 2000;49(2):101-8.

Sagerup CM, Småstuen M, Johannesen TB, Helland Å, Brustugun OT. Sex-specific trends in lung cancer incidence and survival: a population study of 40,118 cases. *Thorax*. 2011;66(4):301-7.

Salvi S, Fontana V, Boccardo S, et al. Evaluation of CTLA-4 expression and relevance as a novel prognostic factor in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(9):1463-72.

Sánchez de Cos Escuín J, Miravet L, Abal J, Núñez A, Hernández J, Castañar AM, et al. Estudio multicéntrico epidemiológico-clínico de cáncer de pulmón en España (estudio EpicliCP-2003). *Arch Bronconeumol* 2006;42: 446-52.

Sánchez de Cos J, Hernández Hernández J, Jiménez López MF, Padrones Sánchez S, Rosell Gratacós A, Rami Porta R. Normativa SEPAR sobre estadificación del cáncer de pulmón. *Arch Bronconeumol*. 2011; 47(9):454 – 65.

Santamaria PG, Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. EMT: Present and future in clinical oncology. *Mol Oncol*. 2017;11(7):718-38.

Sato R, Semba T, Saya H, Arima Y. Concise review: Stem cells and epithelial- mesenchymal transition in cancer: Biological implications

Bibliografia

and therapeutic targets. *Stem Cells*. 2016; 34:1997-2007.

Shaw AT, Solomon B. Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17 (8):2081–6.

Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014; 371(21):1963-71.

Shi Y, Au JS-K, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai C-M, Khoa MT, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol*. 2014; 9(2):154–62.

Shields JD (2011) Lymphatics: at the interface of immunity, tolerance, and tumor metastasis. *Microcirculation* 2011;18: 517 – 31.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(1):7-30.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistic, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69: 7-34.

Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Lab Invest*. 2014; 94(2):129-37.

Silvestri G a., Gould MK, Margolis ML, Tanoue LT, McCrory D, Toloza E, et al. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition).

Chest. 2007;132 (3 SUPPL.).

Slobodova Z, Ehrmann J, Krejci V, Zapletalova J, Melichar B. Analysis of CD40 expression in breast cancer and its relation to clinicopathological characteristics. *Neoplasma*. 2011;58(3):189-97.

Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y MH. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561–6.

Sommers CL, Heckford SE, Skerker JM, Worland P, Torri JA, Thompson EW, Byers SW and Gelmann EP. Loss of epithelial markers and acquisition of vimentin expression in adriamycin-resistant and vinblastine-resistant human breast-cancer cell-lines. *Can Res* 1992;52: 5190– 7.

Souttou B, Carvalho NB, Raulais D, Vigny M. Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogenactivated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2001; 9526–31.

Starzer AM, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: CD27 (TNFRSF7). *ESMO Open*. 2020;4(Suppl 3): e000629.

Steinestel K, Eder S, Schrader AJ. Clinical significance of epithelial mesenchymal transition. *Clin Transl Med* 2014; 3: 17.

Bibliografía

Sugi K, Kobayashi S, Yagi R, Matsouka T. Usefulness of sentinel lymph node biopsy for the detection of lymph node micrometastasis in early lung cancer. *Int Cardiovasc Thorac Surg.* 2008; 913–5.

Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):778-90.

Sundar R, Soong R, Cho BC, Brahmer JR, Soo RA. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2014;85(2):101-9.

T

Takaya S, Saito H, Ikeguchi M. Upregulation of Immune Checkpoint Molecules, PD-1 and LAG-3, on CD4+ and CD8+ T Cells after Gastric Cancer Surgery. *Yonago Acta Med.* 2015; 58(1):39-44.

Teixidó C, Karachaliou N, González-Cao M, Morales-Espinosa D, Rosell R. Assays for predicting and monitoring responses to lung cancer immunotherapy. *Cancer Biol Med* 2015; 12:87-95.

Toll A, Masferrer E, Hernández-Ruiz ME, et al. Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci.* 2013;72(2):93-102.

Tomasini, P., Walia, P., Labbe, C., Jao, K., & Leighl, N. B. (2016). Targeting the KRAS Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *The*

oncologist, 21(12), 1450–60.

Tournoy KG, Maddens S, Gosselin R, Van Maele G, van Meerbeeck JP, Kelles a. Integrated FDG-PET/CT does not make invasive staging of the intrathoracic lymph nodes in non-small cell lung cancer redundant: a prospective study. *Thorax*. 2007; 62(8):696–701.

Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe T, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011; 6:244-85.

Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, 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(9):1243-60.

Treasure T, Utlely M. Survival after resection for primary lung cancer. *Thorax* 2006; 61:649-50.

Troncoso D, Madarriaga I, Aldana S, Herreño A, Chaparro V, Molina M, Rey L, Ramírez A, Montoya C, Valderrama A, Cañas A, Rojas A. Transición epitelio mesénquima: de lo molecular a lo fisiológico. *Univ Med*. 2017;58 (4).

U

Union International Contre le Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours. Second Edition. Geneva, UICC. 1975.

V

van den Oord JJ, Maes A, Stas M, et al. CD40 is a prognostic marker in primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol*. 1996;149(6):1953-61.

Varlotto JM, Recht A, Nikolov M, Flickinger JC, de Camp MM. Extent of lymphadenectomy and outcome for patients with stage I non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2009;115: 851–8.

Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(4):281-284. doi:10.1038/cmi.2010.82

Viola P, Maurya M, Croud J, Gazdova J, Suleman N, Lim E, Newsom-Davis T, Plowman N, Rice A, Montero MA, Gonzalez de Castro D, Popat S, Nicholson AG. A Validation Study for the Use of ROS1 Immunohistochemical Staining in Screening for ROS1 Translocations in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016 Jul;11(7):1029 - 39.

Vogeltanz-Holm N, Schwartz GG. Radon and lung cancer: What does the public really know? *J Environ Radioact*. 2018; 192:26-31.

W

Wang G, Dong W, Shen H, et al. A comparison of Twist and E-cadherin protein expression in primary non-small-cell lung carcinoma and corresponding metastases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011; 39(6):1028-32.

Wen J, Luo KJ, Liu QW, et al. The epithelial-mesenchymal transition phenotype of metastatic lymph nodes impacts the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Oncotarget*. 2016;7(25):37581-37588.

Wheatley-Price P, Shepherd FA. Epidermal growth factor inhibitors in the treatment of lung cancer: reality and hopes. *Curr Opin Oncol* 2008; 20:162-75.

Whitson B, Groth S, Maddaus M. Surgical assessment and intraoperative management of mediastinal lymph nodes in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2007;84: 1059–65.

William D. Travis, MD, Elisabeth Brambilla, MD, Masayuki Noguchi, MD, Andrew G. Nicholson, MD, Kim R. Geisinger, MD, Yasushi Yatabe, MD, David G. Beer, PhD, Charles A. Powell, MD, Gregory J. Riely, MD, Paul E. Van Schil, MD, Kavita Garg, MD, John H. M. Au M. HHS Public Access. *J Thorac Oncol*. 2011;6 (2):244–85.

Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol*. 2015; 33: 445-474.

Wright G, Manser RL, Byrnes G, Hart D, Campbell DA. Surgery for

Bibliografia

non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Thorax* 2006; 61:597-603.

Wu Y, Wang L, He X, et al. Expression of CD40 and growth-inhibitory activity of CD40 ligand in colon cancer ex vivo. *Cell Immunol.* 2008;253(1-2):102-109.

X

Xiao D, He J. Epithelial mesenchymal transition and lung cancer. *J Thorac Dis* 2010; 2:154 – 9

Y

Yanan L, Gang Z. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *J Immunother.* 2012; 35 (4): 299-308.

Yang H, Zhou X, Sun L, Mao Y. Correlation Between PD-L2 Expression and Clinical Outcome in Solid Cancer Patients: A Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2019; 9:47.

Yasufuku K, Fujisawa T. Staging and diagnosis of non-small cell lung cancer: Invasive modalities. *Respirology.* 2007;12(2):173–83.

Ye L, Jia K, Wang L, et al. CD137, an attractive candidate for the immunotherapy of lung cancer. *Cancer Sci.* 2020;111(5):1461-7.

Ye Z, Zhang X, Luo Y, Li S, Huang L, Li Z, et al. Prognostic Values of Vimentin Expression and Its Clinicopathological Significance in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis of Observational Studies with 4118 Cases. PLOS ONE. 2016; 11(9): e0163162

Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, Sima CS, Gerald WL, Kris MG, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. Mod Pathol 2011; 24:653-64.

Young RP, Hopkins RJ, Christmas T, Black PN, Metcalf P, Gamble GD. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. Eur Respir J 2009; 34:380-6.

Yulong S, Xiqiang C, Daiming F. Roles of epithelial-mesenchymal transition in cancer drug resistance. Curr Cancer Drug Targets. 2013;13(9):915-29.

Yusup A, Huji B, Fang C, et al. Expression of trefoil factors and TWIST1 in colorectal cancer and their correlation with metastatic potential and prognosis. *World J Gastroenterol.* 2017;23(1):110-120.

Z

Zhang S, Anjum R, Squillace R et al/ The potent ALK inhibitor Brigatinib (AP26113) overcomes mechanisms of resistance to first - and second - generation ALK inhibitors in preclinical models. Clin Cancer Res 2016; 22: 5527–38.

Bibliografia

Zheng X, Carstens JL, Kim J, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*. 2015; 527(7579):525–30.

Zhuang X, Zhang X, Xia X, et al. Ectopic expression of TIM-3 in lung cancers: a potential independent prognostic factor for patients with NSCLC. *Am J Clin Pathol*. 2012; 137(6):978-85.