



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**FACTORES PRONÓSTICOS EN EL  
CÁNCER DE PULMÓN NO CÉLULA  
PEQUEÑA EN ESTADIOS INICIALES**

Tesis doctoral

Programa de Doctorado en  
Medicina Clínica y Salud Pública

Nuria Cárdenas Quesada

Granada, febrero de 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Nuria Cárdenas Quesada  
ISBN: 978-84-1117-864-8  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/82103>

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN  
MEDICINA CLÍNICA Y SALUD PÚBLICA**

**FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE  
PULMÓN NO CÉLULA PEQUEÑA EN ESTADIOS  
INICIALES**

Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por la Licenciada en Medicina  
Dña. Nuria Cárdenas Quesada

Doctoranda

Dña. Nuria Cárdenas Quesada

Directores de Tesis

M<sup>a</sup> Isabel Núñez-Torres  
Catedrático de Universidad  
Departamento de Radiología y  
Medicina Física

Pedro Sánchez-Rovira  
Doctor en Medicina  
Oncología Médica  
Hospital Universitario de Jaén

*A mi familia, con profundo  
agradecimiento y admiración.*

*A todos los que se dedican  
humana y profesionalmente a esta enfermedad.*

*A todos "mis" pacientes.*



## AGRADECIMIENTOS

*“Si quieres ir rápido camina solo,  
si quieres llegar lejos  
ve acompañado”*

Proverbio africano

El acompañamiento es una necesidad humana en muchos ámbitos. En el profesional lo experimento a diario y no solo para llegar lejos, sino para llegar a cualquier meta.

Este trabajo de tesis es buena muestra de ello y podría escribir muchísimos nombres de personas que me han acompañado en distintos momentos del desarrollo de la misma. Todos ellos han sido motor y empuje para llegar al final y se merecen este agradecimiento público que les haré llegar personalmente.

Quiero nombrar expresamente a mis directores de tesis: M<sup>a</sup>Isabel Núñez y Pedro Sánchez, sin su confianza, trabajo diario, impulso constante y optimismo no hubiera empezado ni terminado. Gracias, gracias por todo.

También quiero nombrar al resto de coautores del artículo: Leticia, Carmen, Bégica, Adela y Rafa; realmente con un equipo como vosotros el éxito está asegurado.

Y como expresaba en la dedicatoria: familia, compañeros profesionales y pacientes, gracias por todo lo que me dais “porque es mucho más de lo que pido”.

Jaén, 14 febrero 2023

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ABREVIATURAS .....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	10
INTRODUCCIÓN – RESUMEN DEL TRABAJO .....	13
SUMMARY .....	19
CAPÍTULO 1. EL CPNCP ESTADIO INICIAL HOY .....	25
1.1 EL CP, UN PROBLEMA DE SALUD.....	25
1.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO DE ESTADIOS INICIALES .....	27
1.3 TRATAMIENTO ADYUVANTE.....	27
1.4 INMUNOTERAPIA EN CP .....	28
1.5 SUBGRUPOS DE CP CONSIDERANDO LA BIOLOGÍA MOLECULAR .....	31
1.6 PRONÓSTICO DEL CP ESTADIO INICIAL INTERVENIDO.....	34
CAPÍTULO 2. FACTORES PRONÓSTICOS EN CP .....	35
2.1 CLASIFICACIÓN TNM Y COMITÉ DE TUMORES TORÁCICOS .....	35
2.2 TABAQUISMO .....	37
2.3 CIRUGÍA .....	38
2.4 LINFADENECTOMÍA.....	40
2.5 HISTOPATOLOGÍA .....	43
2.6 MICROAMBIENTE TUMORAL (MAT).....	46
2.6.1 TIL .....	46
2.6.2 Expresión de PD-L1 .....	49
2.6.3 TGF- $\beta$ .....	51

CAPÍTULO 3. MUTACIÓN ACTIVADORA DE EGFR EN CPNCP .....	55
3.1 AVANCES EN BIOLOGÍA MOLECULAR EN CP.....	55
3.2 CAPACIDAD ONCOGÉNICA LIGADA A LA ACTIVACIÓN DE EGFR .....	56
3.3 MUTACIONES ACTIVADORAS DE EGFR (ACTEGFRM) .....	57
3.4 TRATAMIENTO CON ITK ANTI-EGFR EN CP AVANZADO .....	59
3.5 DATOS SOBRE ADYUVANCIA CON ITK ANTI-EGFR .....	60
CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO .....	63
4.1 HIPÓTESIS DEL TRABAJO .....	63
4.2 OBJETIVOS .....	63
CAPÍTULO 5. PACIENTES Y MÉTODOS.....	65
5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN-EXCLUSIÓN Y RECOGIDA DATOS .....	65
5.2 COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN .....	67
5.3 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN.....	67
5.4 ESTUDIO HISTOLÓGICO .....	69
5.4.1 Evaluación de la expresión de PD-L1 .....	70
5.4.2 Evaluación de TIL .....	70
5.4.3 Evaluación de la expresión de TGF- $\beta$ .....	70
5.4.4 Mutaciones de EGFR .....	71
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	73
CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	75
6.1 SG Y SLE TOTALES .....	75
6.2 SG Y SLE SEGÚN LAS DISTINTAS CARACTERÍSTICAS .....	77
6.2.1 Sexo.....	77
6.2.2 Hábito tabáquico .....	79
6.2.3 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).....	85
6.2.4 Tipo de intervención.....	87
6.2.5 Estadio tumoral .....	90
6.2.6 Escamosos vs No escamosos.....	95

6.2.7 Grado de diferenciación y necrosis .....	97
6.2.8 Invasión linfovascular.....	101
6.2.9 Tamaño tumoral .....	103
6.2.10 EGFR .....	105
6.2.11 Expresión PD-L1, TIL y TGF- $\beta$ .....	112
6.3 RECIDIVAS, FALLECIMIENTOS Y SUS CAUSAS .....	122
6.4 SEGUNDOS TUMORES.....	128
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES .....	133
PUBLICACIONES.....	135
ANEXO .....	150
BIBLIOGRAFÍA .....	160



## ABREVIATURAS

actEGFRm	Mutaciones activadoras de EGFR
ADC	Adenocarcinoma
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee of Cancer</i>
ALK	<i>Gen anaplastic lymphoma kinase</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATS	<i>American Thoracic Society</i>
BAC	Carcinoma bronquioloalveolar
CASSANDRA	<i>Cancer Screening, Smoking Cessation And Respiratory Assessment</i>
CDKI	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina
CP	Cáncer de pulmón
CPNCP	Cáncer de pulmón no célula pequeña
EBUS	<i>Endo Bronchial Ultra Sound</i> (Ecobroncoscopia)
ECOG	Escala de estado basal de <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Factor de crecimiento epidérmico)
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Receptor del factor de crecimiento epidérmico)
EML4	<i>Gen echinoderm microtubule-associated protein-like4</i>
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS	<i>European Respiratory Society</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
ESTS	<i>European Society of Thoracic Surgeons</i>
EUS	<i>Endoscopic ultrasonography</i> (Ecoendoscopia esofágica)
FIBAO	Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> (Fluorescencia con hibridación in situ)
HRQoL	Predictores de la calidad de vida relacionada con la salud
HUJ	Hospital Universitario de Jaén
IASLC	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
ICIs	Inhibidores de <i>checkpoint</i> inmunológicos
IHQ	Inmunohistoquímica
IT	Inmunoterapia
ITK	Inhibidor de tirosín quinasa
LNR	Relación de ganglios linfáticos definida como la relación entre los ganglios linfáticos positivos y el total de ganglios linfáticos extraídos o examinados
MAT	Microambiente tumoral
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (Secuenciación de nueva generación)
NK	Célula <i>natural killer</i>
NLST	<i>National Lung Screening Trial</i>
NOS	<i>Not otherwise specified</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
QT	Quimioterapia

RT	Radioterapia
SAS	Sistema Andaluz de Salud
SBRT	<i>Stereotactic Body Radiotherapy</i> (Radioterapia estereotáctica corporal)
SG	Supervivencia global
SEER	Programa de vigilancia, epidemiología y resultados del NCI ( <i>National Cancer Institute</i> )
SECT	Sociedad Española de Cirugía Torácica
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SEPAR	Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
SERAM	Sociedad Española de Radiología Médica
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SLP	Supervivencia libre de progresión
TAMs	Macrófagos asociados al tumor
TBDR	Tomografía computarizada de baja dosis de radiación
TC	Tomografía computarizada
TGF- $\alpha$	<i>Transforming growth factor alpha</i> (Factor de crecimiento transformante alpha)
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> (Factor de crecimiento transformante beta)
TIL	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i> (Infiltrado linfoide tumoral)
TNM	Sistema de estadificación tumor, ganglio linfático, metástasis
TMB	<i>Tumor mutation burden</i> (Carga Mutacional Tumoral)
UICC	<i>Union for International Cancer Control's</i>
VDT	Videotoracoscopía

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Guía clínica de tratamiento de CPNCP con dianas terapéuticas .....	33
Tabla 2a: IASLC/ATS/ERS Clasificación del ADC de pulmón en muestras quirúrgicas.....	44
Tabla 2b: Supervivencia de acuerdo a subtipos de ADC según la clasificación histológica de IASLC/ATS/ERS.....	45
Tabla 3: Mutaciones más frecuentes de dominio tirosina cinasa del gen EGFR .....	58
Tabla 4: Variables recogidas de toda la población de estudio.....	65
Tabla 5: Características de la población de estudio.....	68
Tabla 6: Tipo de intervenciones quirúrgicas .....	87
Tabla 7: Estadio tumoral y fallecimientos .....	90
Tabla 8: Tabla comparativa entre los estudios NLST y NELSON.....	94
Tabla 9: Distribución por grado histológico.....	98
Tabla 10: Presencia de invasión linfovascular en nuestra población .....	101
Tabla 11: Resultado del análisis de actEGFRm en la población seleccionada .....	106
Tabla 12: Distribución de mutaciones EGFR encontradas.....	106
Tabla 13: N° de recidivas en población total según estudio de EGFR .....	108
Tabla 14: N° de recidivas en población total sin carcinoides según estudio de EGFR .....	109
Tabla 15: N° de fallecimientos en población total según estudio de EGFR.....	109
Tabla 16: N° de fallecimientos en población total sin carcinoides según estudio de EGFR .....	109
Tabla 17: Resultado del análisis de actEGFRm en la <i>población seleccionada</i> .....	109
Tabla 18: Estudio comparativo de pacientes con y sin muestra analizable.....	113
Tabla 19: Porcentaje según n° de recidivas .....	123
Tabla 20: Distribución de primeras recidivas.....	123



Tabla 21: Distribución de segundas recidivas .....	123
Tabla 22: Distribución de terceras recidivas .....	123
Tabla 23: Distribución de la localización de las primeras recidivas .....	124
Tabla 24: Seguimiento de los pacientes intervenidos en HUIJ .....	126
Tabla 25: Causas de fallecimiento de la población que no fallece por evolución tumoral .....	128
Tabla 26: Distribución de la población con segundo tumor .....	129
Tabla 27. Características de los pacientes con muestra disponible, y comparación de la distribución según los marcadores de estudio. ....	158

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de acción de los ICIs .....	29
Figura 2: Principales biomarcadores en CPNCP y su fecha de descubrimiento .....	32
Figura 3: Mapa de las áreas ganglionares mediastínicas .....	42
Figura 4: Fases del proceso <i>immunoediting</i> . .....	48
Figura 5: Familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico .....	56
Figura 6: Algoritmo histológico de evaluación de expresión de PD-L1, TILs y TGF- $\beta$ y distribución de frecuencias para dichos biomarcadores.....	72

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Evolución temporal de la incidencia y mortalidad estandarizada por CP en España, por sexos. ....	26
Gráfica 2: SG y SLE en la población de estudio .....	76
Gráfica 3: SG relacionada con las recaídas .....	76
Gráfica 4: Mortalidad por CP en España según sexo .....	78
Gráfica 5: SG y SLE según el sexo en nuestra población .....	79
Gráfica 6: SG según hábito tabáquico (3 grupos) en nuestra población .....	80
Gráfica 7: SG según hábito tabáquico (2 grupos) en nuestra población .....	81
Gráfica 8: SLE según hábito tabáquico (2 grupos) en nuestra población .....	82
Gráfica 9: SLE según hábito tabáquico (3 grupos) en nuestra población .....	83
Gráfica 10: SG entre los grupos de pacientes con o sin EPOC .....	86
Gráfica 11: SLE entre los grupos de pacientes con o sin EPOC .....	87
Gráfica 12: SG según tipo de intervención.....	88
Gráfica 13: SLE según tipo de intervención.....	89
Gráfica 14: SG según estadio I-II vs III .....	91
Gráfica 15: SG según estadios I, II, III.....	92
Gráfica 16: SLE según estadios I, II, III.....	93
Gráfica 17: SG según histología Escamoso / No escamoso .....	95
Gráfica 18: SLE según histología Escamosos / No escamoso.....	96
Gráfica 19: SG según grado histológico.....	98
Gráfica 20: SLE según grado de diferenciación .....	99
Gráfica 21: SG según necrosis tumoral .....	100
Gráfica 22: SLE según necrosis tumoral .....	101
Gráfica 23: SG según invasión linfovascular .....	102
Gráfica 24: SLE según invasión linfovascular .....	103

Gráfica 25: SG según tamaño $> 6 < 4$ cm .....	104
Gráfica 26: SLE según tamaño $> 6 < 4$ cm .....	105
Gráfica 27: SLE población seleccionada vs no seleccionada.....	107
Gráfica 28: SG población seleccionada vs no seleccionada.....	108
Gráfica 29: SG según resultado actEGFRm en la población seleccionada .....	110
Gráfica 30: SG en población mutada vs resto de la población total.....	111
Gráfica 31: SLE en población mutada vs resto de la población total.....	112
Gráfica 32: Análisis de la SG (A) y la SLE (B) según la expresión de PD-L1 $< 1\%$ o $\geq 1\%$ .....	114
Gráfica 33: Análisis de SG (A) y SLE (B) según la expresión intensa o no intensa de TIL.....	116
Gráfica 34: Análisis de SG (A) y SLE (B) según expresión de PD-L1 $< 1\%$ o $\geq 1\%$ y TIL intenso - no intenso .....	117
Gráfica 35: Análisis de SG (A) y SLE (B) en función de la baja o alta expresión de TGF- $\beta$ .....	119
Gráfica 36: Análisis de SG (A) y SLE (B) según la ausencia o presencia de tinción nuclear de TGF- $\beta$ .....	120
Gráfica 37: Análisis de SG (A) y de SLE (B) en función de la intensidad o no intensidad de los TIL y de la ausencia o presencia de tinción nuclear de TGF- $\beta$ .....	121
Gráfica 38: Porcentaje de número de recidivas en nuestra población.....	122
Gráfica 39: Porcentaje según causa de fallecimiento .....	126
Gráfica 40: Regresión de Cox para el riesgo de fallecer según el número de recidivas. ....	127
Gráfica 41: SLP desde cirugía hasta segundo CP .....	130
Gráfica 42: SG desde segundo CP hasta fallecimiento .....	131



## INTRODUCCIÓN – RESUMEN DEL TRABAJO

El cáncer de pulmón (CP) es un problema de salud con alta carga de morbimortalidad y asistencial. Se trata de la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial, con una estimación de 1,8 millones de muertes al año; también en España es la causa más frecuente de fallecimiento por tumor en 2021, como en años anteriores, con una cifra en ambos sexos de 22.438 fallecidos.

El presente proyecto Tesis Doctoral se centra en el cáncer de pulmón no célula pequeña (CPNCP) que supone el 75-80% de todos los CP. Esta patología sigue diagnosticándose en estadios avanzados en la mayoría de los casos y sólo un 20-30% se diagnostican en estadios iniciales con opciones de tratamiento local radical.

La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección en los estadios iniciales para el CP. El objetivo del tratamiento quirúrgico del CPNCP es conseguir una resección completa (R0) de la lesión tumoral. Sólo los pacientes cuya lesión es potencialmente resecable deben ser incluidos para una cirugía curativa; puesto que no existe evidencia del beneficio de la cirugía de reducción de volumen tumoral. A pesar de esta intención curativa en el estadio inicial, el fracaso del tratamiento y la mortalidad de los pacientes como consecuencia de la recidiva a distancia sigue siendo elevada.

El estado general del paciente y el estadio según TNM siguen siendo los dos pilares básicos sobre los que se apoya el pronóstico e indicación de adyuvancia de un paciente con CPNCP intervenido. Actualmente, el tratamiento estándar para estos pacientes es un régimen adyuvante a base de dos fármacos (con cisplatino), que da lugar a una mejora de la supervivencia absoluta del 4-5% a los 5 años.

En los últimos años se han logrado importantes éxitos terapéuticos con las terapias dirigidas y la inmunoterapia (IT) en el CPNCP avanzado, lo que ha conducido a un aumento de la supervivencia global (SG) en este contexto. En la actualidad, se están realizando esfuerzos para reproducir estos logros en el CPNCP en fase inicial. Los avances en conocimiento molecular y clínico de esta enfermedad aún no aportan datos medibles que hagan predecir la evolución de la enfermedad y elegir un tratamiento adyuvante en el momento del diagnóstico en un estadio inicial operable.

Aun así, el concepto de neo y adyuvancia en CP, se está revolucionando de forma exponencial en los últimos años con la incorporación de la IT. También la adyuvancia se está enriqueciendo con la administración de tratamientos dirigidos complementarios al uso de la quimioterapia (QT) estándar.

Se puede afirmar por tanto, que es necesario conocer mejor los factores pronósticos y predictivos en CPNCP estadios iniciales para impactar en la evolución de esta patología.

Entendemos que conocer la realidad clínica, histológica, molecular y terapéutica de estos pacientes en nuestro medio desde un punto de vista científico permitirá aplicar los nuevos avances que se esperan en los próximos años y ayudará a entender qué alcance real tendrán éstos en nuestra práctica asistencial.

En este trabajo hacemos una revisión del impacto pronóstico de los principales factores que influyen en la evolución de los pacientes con CP. Algunos son dependientes del propio paciente, otros de la técnica quirúrgica y otros de la histopatología propia del tumor. Comprobamos que, a pesar de la evidencia actual pronóstica y predictiva de algunos factores histopatológicos, moleculares y del microambiente tumoral (MAT) no se utilizan aún en la práctica clínica habitual para tomar decisiones en cuanto a cambios en la adyuvancia o en el seguimiento tras la cirugía de los pacientes con CPNCP intervenidos.

Nuestra hipótesis de trabajo es que, aparte del TNM, las características histológicas, el MAT y las alteraciones moleculares influyen en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y en la SG de los pacientes con CPNCP, también en estadios iniciales, no sólo en avanzados y, por tanto, es importante incluir estos datos en el manejo asistencial del CPNCP estadio inicial.

Para desarrollar esta hipótesis estudiamos aquellos pacientes operados de CPNCP en nuestro centro en el intervalo 2010-2013 (4 años completos) con los siguientes objetivos de interés observacional, clínico e investigacional:

- Describir las características histológicas, clínicas y de estadio de los pacientes operados en este periodo de tiempo.
- Verificar la capacidad pronóstica del TNM en nuestro medio.
- Analizar la existencia de nuevos factores pronósticos del MAT: infiltrado linfoide tumoral (TIL: *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*), expresión de PD-L1 y TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ); y su implicación pronóstica.
- Analizar las mutaciones de EGFR en todos los pacientes no fumadores, exfumadores de más de 15 años y en todos los no escamosos (como se haría en CPNCP avanzado), determinar la frecuencia de estas mutaciones y su implicación pronóstica.
- Analizar los tipos de recidiva, su relación con la SG y la SLE.

La población de estudio analizada está constituida por 94 pacientes valorados en la Unidad de Oncología Médica del Hospital Universitario de Jaén (HUIJ) con CPNCP que han sido intervenidos entre 2010-2013, es decir, que eran resecables y, por tanto, estadios iniciales de CPNCP; aparte de operables. En una segunda fase del estudio, en 55 pacientes con muestras disponibles, se analizó la presencia de TIL, expresión de PD-L1 y TGF- $\beta$ .

Se han recogido datos evolutivos hasta el 30 de junio de 2018 por lo que la mediana de seguimiento es de 5 años. No sólo se ha señalado la fecha de defunción, sino también

de recidiva y si esta es local o a distancia. Aparte de recoger segundos tumores en los casos que se han presentado.

Tras una mediana de seguimiento de 61,5 meses (1-99 meses), el 55,3% de la población del estudio sigue viva. El tiempo mediano de supervivencia esperado a la defunción desde la cirugía es de 86 meses. Del total de la población, el 39,4% de los pacientes sufren una recidiva, el resto, no tiene recaída en el evolutivo.

En nuestra serie se ha puesto de manifiesto que presentar una recidiva temprana es un factor de riesgo para el fallecimiento. Los pacientes con una recidiva temprana tienen 5,78 veces más riesgo de fallecer que los pacientes que no presentan la recidiva antes de los 24 meses; HR = 5,78 IC 95% (3.06; 10.91). De hecho, los pacientes que recaen en los primeros 2 años después de la cirugía fallecen el 87,5%. Y de todas las recaídas en nuestra serie, se acumulan en los 2 primeros años el 64,8%.

Se comprueba que la cirugía en CP, aunque influye de forma evidente en la supervivencia, no es curativa en todos los casos. En torno a la mitad de los pacientes intervenidos fallecerán en el transcurso de 5 años. Por ello, se hace imprescindible buscar factores pronósticos y relevantes donde poder actuar para aumentar la supervivencia.

En nuestro estudio analizamos la existencia de nuevos factores pronósticos del MAT. Para evaluar la expresión de PD-L1 se ha utilizado la puntuación de proporción tumoral (TPS) descrita en el manual de interpretación de PD-L1 IHC 22C3 pharmDx-NSCLC; la presencia de TIL se analizó mediante microscopía óptica seleccionando el área infiltrante tumoral representativa teñida con hematoxilina y eosina, y en la que hubiera suficientes células tumorales viables sin necrosis. Se evaluó la densidad de la infiltración linfocítica intratumoral a bajo aumento (10×) y se clasificó en dos categorías, "intensa" y "no intensa". La intensidad alta se definió como una infiltración intensa equivalente a la densidad observada en un ganglio linfático metastásico (Brambilla *et al.*, 2016). Por lo que respecta al análisis de TGF- $\beta$ , aparte del método conocido con inmunohistoquímica semicuantitativa, se valoró la tinción nuclear como factor adicional, ya que otros estudios sobre adenocarcinoma (ADC) pancreático consideraron la tinción nuclear como criterio para definir la expresión de TGF- $\beta$  en células tumorales de forma análoga a la interpretación de otros biomarcadores, como el anticuerpo anti-IDH1-R132H en tumores gliales. El análisis de tinción nuclear de TGF- $\beta$ , se llevó a cabo considerando su presencia inequívoca en más del 1% de las células cancerosas viables como positividad de TGF- $\beta$  tumoral.

Los datos de estos análisis (Cárdenas-Quesada *et al.*, 2022) reflejan que ni la variable PD-L1 ni TIL aparecen como posibles factores de riesgo para la SG o la SLE, incluso cuando se ajustó por sexo, edad y estadio. Sin embargo, al analizar la tinción nuclear de TGF- $\beta$ , según la variable dicotómica ausente (n = 25) y presente (n = 30), se encontró significación estadística en las curvas de SLE a favor de la tinción nuclear ausente, con un valor p de 0,045. Este resultado no se observó en la SG; sin embargo, la



significación se mantuvo al ajustar el resultado con las variables edad y sexo [p-valor: 0,044, HRa: 2,832, IC HRa: (1,029-7,794)], y también se mantuvo muy cerca de la significación si el ajuste se realiza por estadiaje [p-valor 0,064, HRa: 2,597, IC HRa: (0,946 - 7,126)]. Por lo tanto, la presencia de tinción nuclear puede ser un posible factor de riesgo de recaída en los pacientes operados de CPNCP en estadio temprano, ya que el riesgo es más del doble en los pacientes con tinción presente que en los pacientes sin tinción nuclear.

Analizamos también las mutaciones de EGFR en todos los pacientes no fumadores, exfumadores de más de 15 años y en todos los no escamosos (como se haría en CPNCP avanzado). El 58,5% de la población (55 pacientes de los 94) cumplen esos criterios clínicos para analizar si tenían algún tipo de mutación EGFR. Este estudio de mutaciones de EGFR se ha realizado en el laboratorio del Hospital Virgen del Rocío siguiendo la técnica Kit Therascreen con la que se analiza mediante PCR en tiempo real mutaciones a nivel de los exones 18, 19, 20, 21 del gen EGFR. Es la técnica que se utiliza habitualmente en la práctica clínica asistencial. Tan sólo 5 pacientes de esta población tiene resultado positivo para mutación. De esto cinco pacientes dos son mujeres y tres hombres, ninguno es fumador. Todos son ADC, tres de ellos del subtipo acinar. Los 5 se intervinieron siendo un estadio I. Dos de ellos han recidivado a distancia, pero ninguno ha fallecido a fecha del corte de seguimiento. Al analizar la SG dentro del grupo de 55 pacientes seleccionados, se observa que hay diferencias estadísticamente significativas a favor de los mutados; p\_valor = 0,028.

Como conclusión, podemos afirmar que sigue siendo un reto retrasar o evitar la recaída tumoral en pacientes con CPNCP. Aunque la IT oncológica con inhibidores de puntos de control inmunitarios ha revolucionado el tratamiento de esta enfermedad, aún carecemos de biomarcadores pronósticos y predictivos precisos que ayuden en la toma de decisiones clínicas. Nuestros resultados preliminares sugieren que la tinción de TGF- $\beta$  puede predecir un mal pronóstico en pacientes de estadio inicial; puesto que al considerar la presencia de tinción nuclear inequívoca en >1% de las células tumorales viables (presentes o ausentes) como un posible factor de riesgo adicional, las curvas de SLE revelaron una clara significación a favor de la tinción nuclear de TGF- $\beta$  ausente. Estos hallazgos parecen prometedores y pueden abrir una nueva línea de investigación.

Como resultado de su capacidad para promover la aparición de tumores, el TGF- $\beta$  y su vía de señalización ofrecen oportunidades potenciales para la terapia dirigida. Como se menciona en el trabajo, se han estudiado o se están desarrollando y evaluando en ensayos clínicos varios agentes dirigidos a diversos componentes de esta vía. Sin embargo, se sabe aún poco sobre la expresión del TGF- $\beta$  en general y en el CPNCP en particular.

A día de hoy, como ocurre con la subclasificación histológica, ninguno de estos factores del MAT se utilizan en la práctica clínica para tomar decisiones en cuanto a tratamiento en un CPNCP estadio inicial: tratamiento quirúrgico, adyuvancia o seguimiento tras la cirugía. Sin embargo, nuestra revisión y análisis refuerza el interés

por descubrir nuevos factores pronósticos útiles para mejorar la evolución del CP y, por tanto, aboga por incluir estas características en los informes de anatomía patológica de las biopsias y piezas quirúrgicas. La evidencia científica con los tratamientos diana y la IT nos está llevando a hacerlo así con las alteraciones moleculares (EGFR por ahora) y la expresión de PD-L1.

El avance científico actual requiere un esfuerzo por parte de todos los profesionales implicados en esta patología por diagnosticar antes y con muestra suficiente para poder analizar todas las características histológicas, moleculares y del MAT que permitan un tratamiento y seguimiento más personalizado de cada uno de nuestros pacientes con CP operable.



## SUMMARY

Lung cancer (LC) is a devastating disease and a major therapeutic burden with poor survival rates. Nowadays, it is the second most common tumour worldwide and is responsible for the highest number of cancer deaths, with an estimated 1.8 million deaths per year. In fact, in Spain it was the main cause of death by tumour in 2021, as in previous years, with an estimation of 22,438 deaths in both men and women.

This Doctoral Thesis focuses on Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC), which accounts for 75-80% of all LC diagnoses. Most NSCLC patients are still diagnosed in advanced stages of the disease, and, in most cases, only 20-30% of the tumours are identified in early stages with radical local treatment options.

Therefore, surgery remains the standard treatment in clinically operable patients, with the aim of achieving a complete resection (R0) of the tumour lesion. Indeed, just the patients whose lesion is potentially resectable should be considered for curative surgery, as there is no evidence of benefit from tumour volume reduction surgery. Despite this curative intent at the early stage of the disease, treatment failure and patient mortality rates remain high, because of distant recurrence.

Patient general condition at diagnosis and TNM stage constitute the two basic pillars on which the prognosis and the indication for adjuvant treatment of an interventional NSCLC case are based. Currently, the standard treatment for these patients consists of a two-drug adjuvant chemotherapy regimen (with cisplatin), which results in an overall improvement in absolute survival of 4-5% at 5 years.

In recent years, targeted therapies, and immunotherapy (IT) have emerged as an important mean of the disease management for patients with NSCLC, as significant therapeutic achievements have been reached, leading to an increase in overall survival (OS) in this setting. Significant efforts are currently underway to replicate these accomplishments in early-stage NSCLC. However, advances in molecular and clinical understanding of this condition do not yet provide measurable data to predict disease progression and eligibility for adjuvant treatment at diagnosis in an early operable stage. Nevertheless, the concept of neo and adjuvant therapy in LC has been revolutionised exponentially in these years with the incorporation of IT. In this sense, adjuvant therapy has also been enriched with the administration of targeted therapies complementary to the use of standard chemotherapy.

Therefore, it has been proved necessary to better understand the prognostic and predictive factors in early-stage NSCLC to have an impact on the evolution of this pathology. Consequently, knowing the clinical, histological, molecular, and therapeutic reality of these patients from a scientific point of view will allow us to apply the new

potential advances that are expected in the coming years and will help us to understand the real scope of these innovations in our healthcare practice.

In this Doctoral Thesis we review the prognostic impact of the main factors that might influence the evolution of patients with LC. Some of these factors are dependent on the patient, while others are related with the surgical technique or the histopathology of the tumour itself. We found that, despite the current prognostic and predictive evidence, some histopathological, molecular and tumour microenvironment (TME) factors are not yet used in standard clinical practice to make decisions about changes in adjuvant treatment or follow-up in patients with NSCLC who have undergone surgery.

Our working hypothesis is that, apart from TNM stage, the tumour histological features, TME and molecular alterations may influence disease-free survival (DFS) and OS of patients with NSCLC, not only in advanced stages of the disease, but also in early stages, and thus, it is important to include these factors in the management of early-stage NSCLC.

To address this hypothesis, we included in our study patients who underwent surgery for NSCLC in the University Hospital of Jaén in the period between 2010 and 2013 (four full years) with the following observational, clinical and research objectives:

- Describe the histological, clinical and stage characteristics of the patients operated on in this period of time.
- Assess the proportion of early-stage diagnoses in our hospital.
- Verify the prognostic capacity of TNM in our setting.
- Analyse the existence of new TME prognostic factors: tumour-infiltrating lymphocytes (TIL), PD-L1 and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) expression, as well as their prognostic implications.
- Identify EGFR mutations in all non-smokers, ex-smokers for more than 15 years and in all non-squamous patients (as would be done in advanced NSCLC), to determine the frequency of these mutations and their prognostic implication.
- Detect and analyse the types of recurrence and their relationship with OS and DFS.

For these purposes, the study population analysed consisted of 94 NSCLC patients evaluated in the Medical Oncology Unit of the University Hospital of Jaén (HUI) who underwent surgery between 2010-2013, that is, who had resectable tumours and, therefore, were in the initial stages of NSCLC. In a second phase of the study, from the 94 patients who underwent surgery for pathological stages I to IIIA NSCLC at our hospital between 2010 and 2013, 55 samples available for analysis were included to evaluate the presence of TILs and the expression of PD-L1 and TGF. Evolutionary data have been gathered until June 30<sup>th</sup>, 2018, with a median follow-up period of 5 years from diagnosis.

Not only the date of death was recorded, but also the time of recurrence and whether it was local or distant. Second tumour samples have also been collected in

those cases in which they have been presented. Our results showed that after a median follow-up of 61.5 months (1-99 months), 55.3% of the study population was still alive. The median expected survival time since surgery was 86 months. Of the total population, 39.4% of patients suffered a recurrence, while the rest had no relapse. In our series, early recurrence has been shown to be a risk factor for death. Thus, patients with early recurrence were 5.78 times more likely to die than patients who did not relapse within 24 months of surgery; Hazard Ratio (HR) = 5.78, Interval Confidence (IC) of 95% (3.06; 10.91). In fact, 87.5% of patients who relapsed within the first two years after surgery died. Interestingly, of all the relapses occurred in our data series, 64.8% were accumulated within the first 24 months. According to these findings, surgery in LC is not curative in all cases, although it has a clear influence on survival.

Since around half of the patients who undergo surgery are at high risk of death within 5 years, the development of affordable and reproducible biomarkers has become essential to predict the adjuvant therapeutic efficacy and recurrence rate for these patients, and ultimately, to identify prognostic and relevant factors where action can be taken to increase survival. In this line, we aimed to evaluate the association of clinicopathologic characteristics and the prognostic value of PDL-1 expression and TILs, and explored the immune microenvironment by assessing their relationship, since they have been suggested as clinically applicable predictive biomarkers in surgically resectable NSCLC. Furthermore, we studied TGF- $\beta$  expression and proposed a more simple and efficient way for its assessment (nuclear staining), since this molecular target has been outlined as a potential prognostic biomarker that may open a new line of research pointed towards TGF- $\beta$  inhibitor therapies in NSCLC, in combination with ICIs in those patients with a worse prognosis.

To assess PD-L1 expression, we used the tumour proportion score (TPS) described in the PD-L1 interpretation manual IHC 22C3 pharmDx-NSCLC; the presence of TIL was analysed by light microscopy by selecting the representative tumour infiltrating area stained with haematoxylin and eosin and in which there were sufficient viable tumour cells without necrosis. The density of intratumoral lymphocytic infiltration was assessed at low magnification (10 $\times$ ) and classified into two categories, 'intense' and 'not intense'. High intensity was defined as intense infiltration equivalent to the density observed in a metastatic lymph node (Brambilla et al., 2016). Regarding TGF- $\beta$  analysis, apart from the known method with semi-quantitative immunohistochemistry, nuclear staining was assessed as an additional factor, as other studies on pancreatic adenocarcinoma (ADC) considered nuclear staining as a criterion to define TGF- $\beta$  expression in tumour cells analogous to the interpretation of other biomarkers, such as anti-IDH1-R132H antibody in glial tumours. Nuclear staining analysis of TGF- $\beta$  was performed considering its unequivocal presence in more than 1% of viable cancer cells as tumour TGF- $\beta$  positivity.

Data from these analyses (Cardenas-Quesada *et al.*, 2022) reflected that neither PD-L1 nor TIL appeared as possible risk factors for OS or DFS, even when adjusted for

sex, age, and stage. However, when analysing TGF- $\beta$  nuclear staining, according to the dichotomous variable absent ( $n = 25$ ) and present ( $n = 30$ ), statistical significance was found in the DFS curves in favour of absent nuclear staining, with a p-value of 0.045. This result was not observed in OS; nevertheless, significance was maintained when adjusting for age and sex [p-value: 0.044, HRa: 2.832, HRa IC: (1.029-7.794)], and remained very close to significance when adjusting for staging [p-value 0.064, HRa: 2.597, HRa IC: (0.946 - 7.126)]. Therefore, the presence of nuclear staining may be considered as a possible risk factor for relapse in patients operated on for early-stage NSCLC, as the risk is more than twice as high in patients with nuclear staining present than in those in whom it is not observed. EGFR mutations were also analysed in all non-smokers, ex-smokers for more than 15 years and in all non-squamous LC patients (as would be done in advanced NSCLC). As a result, 58.5% of the population (55 patients out of 94) met these clinical criteria to test if they had any type of EGFR mutation. This study of EGFR mutations was carried out using the Therascreen Kit technique, which analyses mutations in exons 18, 19, 20 and 21 of the EGFR gene by means of real-time PCR, a technique commonly used in clinical practice. Our findings revealed that only 5 patients had a positive result for EGFR mutation. Of these five patients, two were women and three were men, none of them were smokers. All were diagnosed of adenocarcinoma, three of them of the acinar subtype, and all underwent stage I surgery. Two of them had distant recurrence, but none of them had died at the follow-up cut-off date. When analysing OS within the group of 55 selected patients, statistically significant differences were observed in favour of the mutated patients (p-value = 0.028).

To date, it remains a challenge to delay or prevent tumour relapse in patients with NSCLC. Although oncological IT with immune checkpoint inhibitors has revolutionised the treatment of this disease, we still lack accurate prognostic and predictive biomarkers to aid in clinical decision making. Our preliminary results suggested that TGF- $\beta$  staining may predict poor prognosis in early-stage NSCLC patients; since when considering the presence of unequivocal nuclear staining in  $>1\%$  of viable tumour cells (present or absent) as a possible additional risk factor, DFS curves revealed a clear significance in favour of absent TGF- $\beta$  nuclear staining. These findings appeared to be promising and may open a new line of research.

As a result of its ability to promote tumour development, TGF- $\beta$  and its signalling pathway offer potential opportunities for targeted therapy. As mentioned in the published article, several agents targeting various components of this pathway have been studied or are being developed and evaluated in clinical trials. However, little is still known about TGF- $\beta$  expression in general and in NSCLC in particular.

In conclusion, as occurs with histological subclassification, none of these TME factors are used in clinical practice for decision-making in early-stage NSCLC: surgical treatment, adjuvant, or follow-up after surgery. However, our review and analysis reinforce the importance of discovering new prognostic factors useful to improve the evolution of LC and, therefore, advocate for including these features in anatomical

pathology reports of biopsies and surgical specimens. The scientific evidence with target treatments and IT is leading us to do the same with molecular alterations (EGFR for now) and PD-L1 expression. Current scientific progress would require an effort from all professionals involved in this pathology to be able to early diagnose and ensure a sufficient tumour sample for the analysis of all histological, molecular and TME characteristics that allow for a more personalised treatment and follow-up of each of our patients with resectable LC.





## CAPÍTULO 1. EL CPNCP ESTADIO INICIAL HOY

*En este capítulo se da una visual rápida contextual sobre el CPNCP en la actualidad. En sus seis apartados abarcamos el CP como problema de salud, su tratamiento actual en los estadios iniciales y lo que conocemos hasta la fecha de subgrupos histológicos, moleculares y su repercusión pronóstica.*

### 1.1 EL CP, UN PROBLEMA DE SALUD

El CP es un problema de salud frecuente donde, a pesar de los resultados sobre screening ya publicados 1–3, aún no se ha estandarizado en la práctica clínica habitual pruebas de cribado que hagan aumentar el porcentaje de diagnósticos precoces. En la actualidad siguen diagnosticándose la mayoría de los casos (el 80%) en estadios avanzados, inoperables.

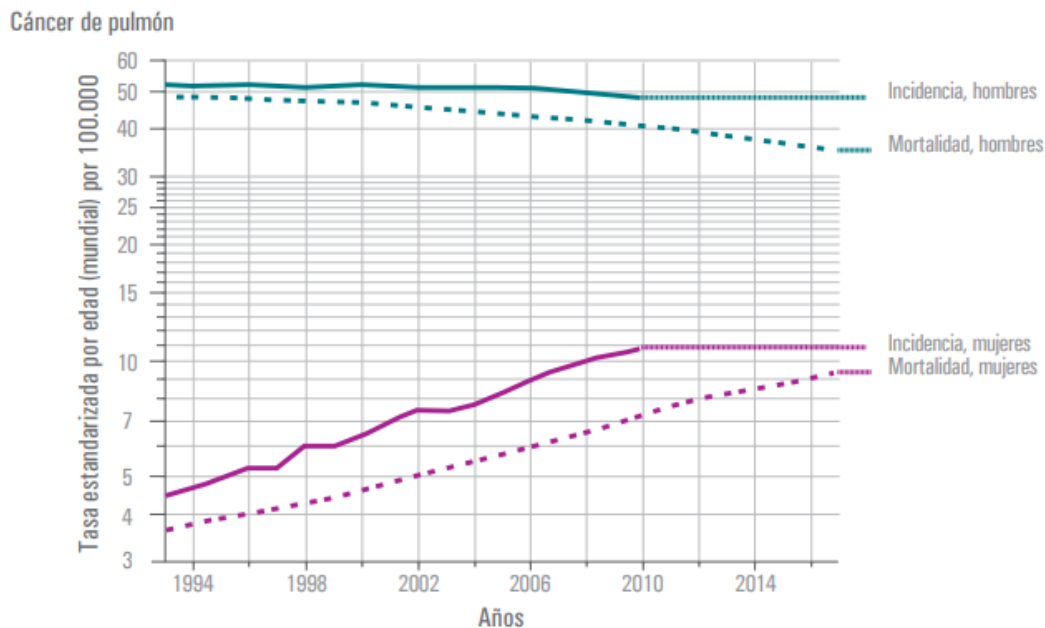
En los últimos años se han mejorado el estadiaje<sup>4,5</sup>, el diagnóstico histopatológico y molecular<sup>6–8</sup> de estos tumores, con implicación en el tratamiento, fundamentalmente en los estadios avanzados<sup>9,10</sup>.

Según los datos publicados en febrero de 2023 por la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) con motivo del día mundial del cáncer<sup>11</sup>, *los cánceres más frecuentemente diagnosticados en España en 2023 serán los de colon y recto (42.721 nuevos casos), mama (35.001), pulmón (31.282), próstata (29.002) y vejiga urinaria (21.694). A mucha distancia, los siguientes cánceres más frecuentes serán los linfomas no hodgkinianos (9.943), el cáncer de páncreas (9.280), el cáncer de riñón (8.626), el melanoma maligno cutáneo (8.049), los cánceres de cavidad oral y faringe (7.882), y los cánceres de cuerpo uterino (7.171), estómago (6.932) e hígado (6.695).*

Además, destaca que el CP *se mantiene como tercer tumor más incidente en mujeres en 2023, desde que en 2019 pasó de ser el cuarto tumor más diagnosticado en mujeres en las estimaciones para el año 2015 al tercero más incidente. Este hecho está en relación con el aumento del consumo de tabaco en mujeres a partir de los años 70. En general, se espera un aumento de la incidencia de los otros tumores relacionados con el tabaco, como los de la cavidad oral y faringe o la vejiga urinaria.*

En cuanto a mortalidad, a nivel mundial, el CP sigue siendo la principal causa de muerte por cáncer, con una estimación de 1,8 millones de muertes (18 %), seguida del cáncer colorrectal (9,4 %), de hígado (8,3 %), de estómago (7,7 %) y de mama en la mujer (6,9 %)<sup>12</sup>. En España, por desgracia, se repite ese dato y la causa más frecuente de fallecimiento por tumor en 2021, como en años anteriores, fue el CP; tanto en ambos sexos (con 22.438 fallecidos) como por sexo en varones (16.772 fallecidos), en mujeres estaría en segundo lugar con 5.666 fallecidas, sólo por debajo del cáncer de mama<sup>11</sup>.

Aunque de forma general, la mortalidad por cáncer en España ha experimentado un fuerte descenso en las últimas décadas, el informe de la SEOM hace un inciso interesante para el tema en cuestión: *este descenso de la mortalidad no es uniforme en todos los tumores ni por sexo, siendo el cáncer de pulmón el caso más significativo, con un fuerte incremento de la mortalidad en mujeres en las últimas décadas debido a la incorporación más tardía de la mujer al hábito tabáquico, mientras que continúa la tendencia descendente en varones* (gráfica 1).



Gráfica 1: Evolución temporal de la incidencia y mortalidad estandarizada por CP en España, por sexos.

Según el Registro Poblacional de Cáncer de Andalucía en Jaén (Delegación Territorial de Salud y Familias), con el que se trabaja desde el HUIJ, durante los años 2009 a 2014 se han registrado un total de 1.405 casos nuevos de CP en la provincia de Jaén y en ambos sexos. Se analiza la supervivencia observada a los 5, a los 3 años y al año desde el diagnóstico de los casos diagnosticados en 2009, 2010 y 2011. Se comprueba que una media de sólo el 12,8% de los pacientes de ambos sexos viven más de 5 años, un porcentaje más elevado en mujeres (21,1%).

Con estos datos queremos ilustrar que, efectivamente, estamos ante un problema de salud pública y ante una enfermedad con aún una baja tasa de supervivencia con lo que supone esto de estímulo a la investigación continua para un mejor diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con CP.

Dentro del CP, se distingue la variante de célula pequeña o microcítica, que supone menos del 15% de casos en la actualidad y que tiene un comportamiento y un tratamiento diferente a la mayoría de casos, por lo que éstos son denominados carcinomas de pulmón no microcítico (CPNM) o no célula pequeña (CPNCP). Este

trabajo de Tesis Doctoral se centrará en el CPNCP que supone el 75-80% de todos los CP.

## 1.2 TRATAMIENTO QUIRÚRGICO EN ESTADIOS INICIALES

En los estadios iniciales de CPNCP (estadios I y II) la cirugía sigue siendo el tratamiento estándar, en aquellos pacientes clínicamente operables<sup>13</sup>.

Hay estudios que comparan la cirugía abierta con videotoracoscopia (VDT) con resultados similares oncológicos, siendo un procedimiento menos traumático y con una recuperación más corta<sup>14-16</sup>. La VDT, aunque sigue estudiándose sus beneficios y repercusión oncológica, es utilizada actualmente en la mayoría de los centros hospitalarios con unidad de cirugía torácica, en aquellos casos técnicamente posibles.

La radioterapia estereotáctica corporal (SBRT) ha surgido como una alternativa de tratamiento a las resecciones sublobares, sobre todo en pacientes “*borderline*” de estado clínico basal para intervenir quirúrgicamente. En general, la supervivencia tras SBRT es peor que después de la cirugía en las comparaciones indirectas, probablemente debido al sesgo de selección, ya que los pacientes más frágiles tienden a recibir SBRT<sup>17,18</sup>.

A la vez que se van mejorando las técnicas de abordaje quirúrgico, se va clarificando la importancia de la evaluación de los ganglios del mediastino para verificar el estadiaje de la enfermedad y, por tanto, para planificar un tratamiento oportuno. En 2014 se consensuaron las normas para la estadificación preoperatoria precisa y están definidos los tipos de linfadenectomía que debe realizarse según el estadio clínico preoperatorio<sup>19</sup>, dichas normas se mantienen actualmente<sup>20</sup>.

## 1.3 TRATAMIENTO ADYUVANTE

A pesar de los avances en los procedimientos y abordajes quirúrgicos, el porcentaje de recaídas tras la cirugía sigue siendo elevado, constituyendo prácticamente el 70% de todas las recurrencias. Históricamente ha costado mucho encontrar beneficio con los tratamientos adyuvantes.

El papel de la radioterapia (RT) adyuvante no estaba claro después de los resultados de un análisis de Cochrane que mostró que las técnicas más antiguas de la RT adyuvante tuvieron un efecto perjudicial sobre la SG<sup>21</sup>. Sin embargo, la utilización de una base de datos epidemiológica retrospectiva (Vigilancia Epidemiología y Resultados Finales [SEER]) sugirió que la RT postoperatoria tenía beneficio en la supervivencia en pacientes con enfermedad N2<sup>22</sup>, en combinación con la QT adyuvante, normalmente de forma secuencial. Así se hacía hasta que, recientemente, se han comunicado los resultados del estudio Lung ART<sup>23</sup>. Se trata de un estudio europeo fase III en pacientes

completamente resecaos y afectación N2. Se randomizan a recibir RT postoperatoria vs no, con o sin QT adyuvante/neoadyuvante. Este estudio no alcanza su objetivo primario de SLE ni tampoco de SG. Se observa además una mayor toxicidad cardiopulmonar grado 3-4 precoz y tardía, y más segundos tumores. Estos resultados, por tanto, establecen la no indicación de RT postoperatoria en estadio IIIAN2 en la práctica clínica como venía haciéndose.

En cuanto a la QT, dos meta-análisis ya clásicos publicados en 2010 demuestran una mejoría absoluta de supervivencia a 5 años del 5,4% y 4% respectivamente, con el tratamiento de QT adyuvante; con mayor beneficio en supervivencia en los estadios II y III<sup>24</sup>. Se intuye por los resultados que, además del estadio de la enfermedad, el tamaño del tumor podría ser un factor predictivo para la eficacia de la QT adyuvante en pacientes con estadio Ib. Diferentes estudios comparan la QT adyuvante con la QT neoadyuvante (preoperatoria); un meta-análisis mostró resultados similares de ambas estrategias<sup>25</sup>. En la práctica clínica, la QT adyuvante se mantiene como opción estándar en aquellos pacientes operables y resecaos de inicio, por el supuesto riesgo de progresión durante la QT neoadyuvante y la mejor viabilidad de la adyuvancia con respecto a la neoadyuvancia y cirugía posterior<sup>26</sup>.

El concepto de neo y adyuvancia en CP, se está revolucionando de forma exponencial en los últimos años con la incorporación de la IT como se verá en el siguiente punto. También la adyuvancia se está enriqueciendo con la administración de tratamientos dirigidos complementarios al uso de la QT estándar; se desarrollará en el punto de anti-EGFR (apartado 3.4).

#### 1.4 INMUNOTERAPIA EN CP

Actualmente, hablar de CP obliga a considerar la IT, puesto que el uso de fármacos con mecanismo de acción en el sistema inmunológico ha supuesto un avance considerable en el tratamiento del CPNCP avanzado y se espera que ese avance sea mejorable y aplicable a otros escenarios del CP.

Se puede afirmar que la carcinogénesis es un proceso dinámico y que los tumores, durante su crecimiento, cambian y se adaptan a su microambiente adquiriendo distintas capacidades e, igualmente, el sistema inmunológico también es dinámico y adaptativo. Por lo que la interacción entre cáncer y sistema inmunitario (inmunoterapia) puede generar un estado de “latencia tumoral”; situación que era impensable con las terapias convencionales del cáncer que conseguían escape o eliminación tumoral<sup>27</sup>.

El eje PD-1/PD-L1 es un mecanismo de control de la respuesta inmunológica fundamental que puede ser bloqueado mediante anticuerpos monoclonales. En este eje es donde más fármacos han demostrado eficacia clínica en CPNCP con o sin QT. Se han denominado inhibidores de *checkpoint* inmunológicos (ICIs) anti-PD-L1. En concreto, actualmente están aprobados en práctica clínica los siguientes fármacos ICIs

en el tratamiento de CPNCP avanzado: nivolumab, pembrolizumab y cemiplimab (anti PD-1) y atezolizumab, avelumab y durvalumab (anti PD-L1). En la figura 1 puede visualizarse el mecanismo de acción de dichos fármacos.

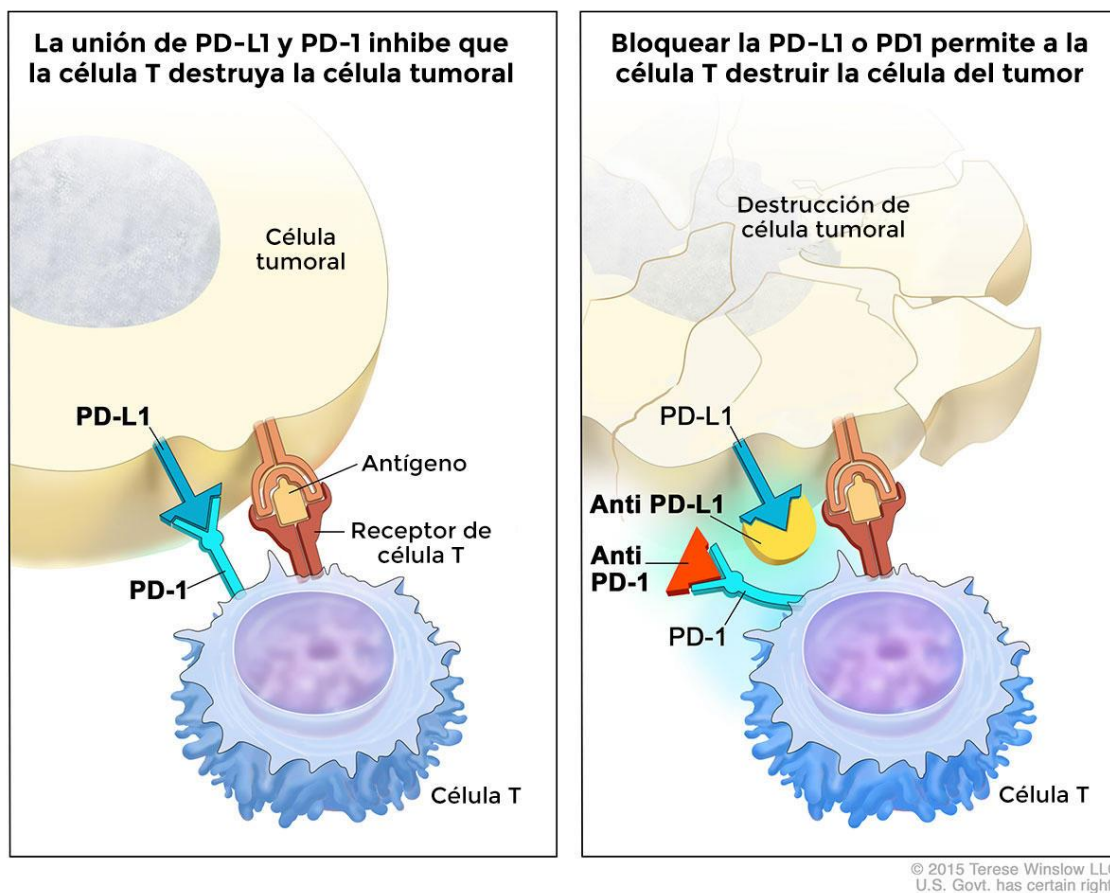


Figura 1: Mecanismo de acción de los ICIs

Fuente: © 2022 Terese Winslow LLC

En primera línea de CPNCP avanzado han demostrado su eficacia en monoterapia o en combinaciones con QT o con ipilimumab (anti CT-L4)<sup>28-33</sup>. Sigue habiendo muchas dudas en el abordaje terapéutico de esta primera línea en pacientes sin *driver*; por ejemplo el tratamiento de distintos subgrupos de pacientes (ECOG 2, ancianos<sup>34</sup>, metástasis cerebrales, enfermedades autoinmunes, etc) o qué hacer si ya han recibido un ICIs en terapias precoces. Por tanto, sigue siendo un desafío y es necesario continuar investigando nuevas opciones terapéuticas y biomarcadores que permitan tratar de forma personalizada con IT a cada paciente.

Con la incorporación en 1ª línea de CPNCP de los tratamientos ICIs, la segunda línea de tratamiento está en continuo estudio para determinar la mejor estrategia tras un tratamiento con IT<sup>35</sup>. Por otro lado, en el escenario de CPNCP irresecable tratado con

QT-RT, es decir estadios III, se ha aprobado el uso de durvalumab secuencial por el incremento significativo de SLE y SG tras respuesta con QT-RT<sup>36,37</sup>.

*The Society for Immunotherapy of Cancer* publicó una guía de consenso para el uso de la IT en CPNCP que se irá actualizando<sup>38</sup>. Del mismo modo, por su repercusión en toda la Oncología Médica, las sociedades científicas americana (ASCO), europea (ESMO) y española (SEOM) organizan un simposio monográfico sobre IT en las diversas patologías tumorales; así como guías de consenso en el manejo de estas terapias.

Como biomarcador se utiliza PD-L1 que, aunque en algunos casos no deja de ser un poco contradictoria su capacidad de predicción de respuesta, se sigue recomendando su análisis por inmunohistoquímica (IHQ) en todos los pacientes con CPNCP estadio IV puesto que es preciso conocer ese dato para la utilización de los fármacos ICIs en monoterapia y ayuda en la toma de decisiones con respecto a otros fármacos anti PD-1 o anti PD-L1. También es necesario su estudio para el uso de durvalumab de mantenimiento durante un año tras el tratamiento estándar con QT-RT. Se le dedicará un apartado específico más adelante (2.6.2).

Se ha utilizado como biomarcador *high tumor mutational burden* (TMB > 10 mut/Mb) o alta carga mutacional en la combinación de ipilimumab y nivolumab<sup>39</sup>; aún está por definir su valor predictivo.

Es lógico pensar que en la evolución tumoral y su respuesta a tratamientos con mecanismo inmunológico influye el MAT y, por tanto, la presencia de infiltrado linfóide tumoral (TIL: *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*) con mayor o menor intensidad<sup>40</sup>. Parece ser que los tumores con ausencia o baja intensidad de TIL no se beneficiarían de IT, pero son muchos otros factores, también clínicos, los que influyen en la eficacia del tratamiento<sup>41-43</sup>. Se desarrollará más adelante (2.6.1).

Actualmente se está generando mucha información científica en el uso de IT en estadios iniciales. Está teniendo mucha repercusión, por ejemplo, el estudio español NADIM. Se trata de un ensayo fase II abierto, multicéntrico, de un solo brazo en el que los pacientes con CPNCP en estadio IIIA, considerados resecables quirúrgicamente, fueron tratados con paclitaxel neoadyuvante y carboplatino más nivolumab durante tres ciclos, seguido de monoterapia adyuvante con nivolumab durante 1 año (240 mg una vez cada 2 semanas durante 4 meses, seguido de 480 mg una vez cada 4 semanas durante 8 meses). La SG a los 36 meses fue del 81,9 % (IC del 95 %, 66,8 a 90,6) en la población por intención de tratar, y aumentó al 91,0 % (IC del 95 %, 74,2 a 97,0) en la población por protocolo. Ni la TMB ni la expresión de PD-L1 fueron predictivos de supervivencia. Por el contrario, los niveles bajos de ctDNA previos al tratamiento se asociaron significativamente con una mejor supervivencia libre de progresión (SLP) y SG (índice de riesgo [HR], 0,20; IC del 95 %, 0,06 a 0,63, y HR, 0,07; IC del 95 %, 0,01 a 0,39, respectivamente). Las respuestas clínicas según los criterios RECIST v1.1<sup>44</sup> no predijeron los resultados de supervivencia. Sin embargo, los niveles indetectables de ctDNA después del tratamiento neoadyuvante se asociaron significativamente con la



SLP y la SG (HR, 0,26; IC del 95 %, 0,07 a 0,93, y HR, 0,04; IC del 95 %, 0,00 a 0,55, respectivamente)<sup>45</sup>. En esta línea podríamos hacer referencia a múltiples ensayos clínicos en el ámbito de la neo y adyuvancia<sup>46</sup>.

### 1.5 SUBGRUPOS DE CP CONSIDERANDO LA BIOLOGÍA MOLECULAR

La eficacia del tratamiento de CPNCP avanzado con fármacos inhibidores de tirosín quinasa (ITK) en pacientes portadores de mutaciones en el EGFR (*epidermal growth factor receptor*)<sup>47,48</sup> ha servido de guía para avanzar en el conocimiento de la biología tumoral, permitiendo diferenciar diferentes subtipos moleculares con tratamientos específicos con un impacto positivo y significativo en el pronóstico de los pacientes con CP.

Las mutaciones de EGFR son de gran interés no sólo por su capacidad predictiva de respuesta a los ITK, sino por ser la primera alteración molecular descrita con frecuencia en los no fumadores en comparación con los fumadores. De hecho, la presencia de estas mutaciones es inversamente proporcional al consumo acumulado de tabaco. Esto hace que se busque una posible implicación pronóstica positiva en este subgrupo de pacientes con mutación EGFR aún no confirmada<sup>49</sup>, independientemente de su valor predictivo de respuesta a ITK.

Más adelante, se analizará en este trabajo con profundidad la implicación de esta mutación en la actitud terapéutica en CPNCP en la actualidad (3.4 y 3.5).

Otro subgrupo con diana terapéutica para la que se dispone de tratamiento dirigido son los pacientes con la translocación de ALK (*anaplastic lymphoma kinase*) con EML4 (*echinoderm microtubule-associated protein-like4*)<sup>50,51</sup>.

ALK está formado por tres regiones: extracelular, transmembrana e intracelular, donde reside la actividad tirosina quinasa. La unión del ligando induce la homodimerización de ALK y la consiguiente actividad quinasa. La presencia de reordenamientos cromosómicos en ALK se ha identificado en diferentes neoplasias: linfoma anaplásico de célula grande, tumor inflamatorio mielofibroblástico y neuroblastoma, entre otros. En el CPNCP se describió esta translocación por primera vez en 2007<sup>52</sup>. Los reordenamientos inducen un oncogen de fusión que da lugar a una proteína quimérica con una actividad tirosina quinasa constitutiva e independiente del ligando. El gen de fusión alternativo a ALK es el que induce la actividad quinasa. Se han descrito varios reordenamientos, en el CPNCP el gen que se asocia con mayor frecuencia es EML4; y, en concreto, el que se produce entre el intrón 13 de EML4 y el intrón 20 de ALK, ambos localizados en el brazo corto del cromosoma 2.

Se calcula que el 2-5% de los pacientes con CPNCP tienen reordenamientos de ALK<sup>50</sup>, principalmente translocaciones, siendo de nuevo más frecuente en pacientes con escasa o nula historia de tabaquismo. Estos pacientes tienden a ser jóvenes, y no hay



diferencias de sexo. Se trata en su mayoría de adenocarcinomas (ADC), con frecuencia asociados a determinadas características morfológicas, como por ejemplo células “en anillo de sello” o patrón cribiforme. Los reordenamientos de ALK no suelen coexistir con las mutaciones de EGFR.

Para detectar estos reordenamientos se utilizan varias técnicas. Los ensayos disponibles incluyen fluorescencia con hibridación *in situ* (FISH), IHQ, reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR), y secuenciación del ADN. Hay varios estudios<sup>53,54</sup> que han comparado la concordancia de resultados entre la IHQ y el FISH. Por su accesibilidad y bajo costo, la IHQ ha sido propuesta como una prueba de detección inicial alternativa y, a pesar de que varias plataformas de IHQ tienen sensibilidad y especificidad diferentes, cada vez es mayor la recomendación de utilizar IHQ y sólo FISH en caso de duda en la práctica clínica. Es conocido también que las pruebas combinadas pueden mejorar la detección de casos ALK-positivos<sup>55</sup>.

En la última guía clínica de ESMO de 2018<sup>9</sup> ya se incluyen hasta 4 fármacos inhibidores específicos frente a estas alteraciones ALK que tienen eficacia clínica demostrada, superior a la QT estándar, para utilizar en 1ª o 2ª línea de tratamiento. En la última actualización se incorporan otros fármacos de nueva generación<sup>56</sup>.

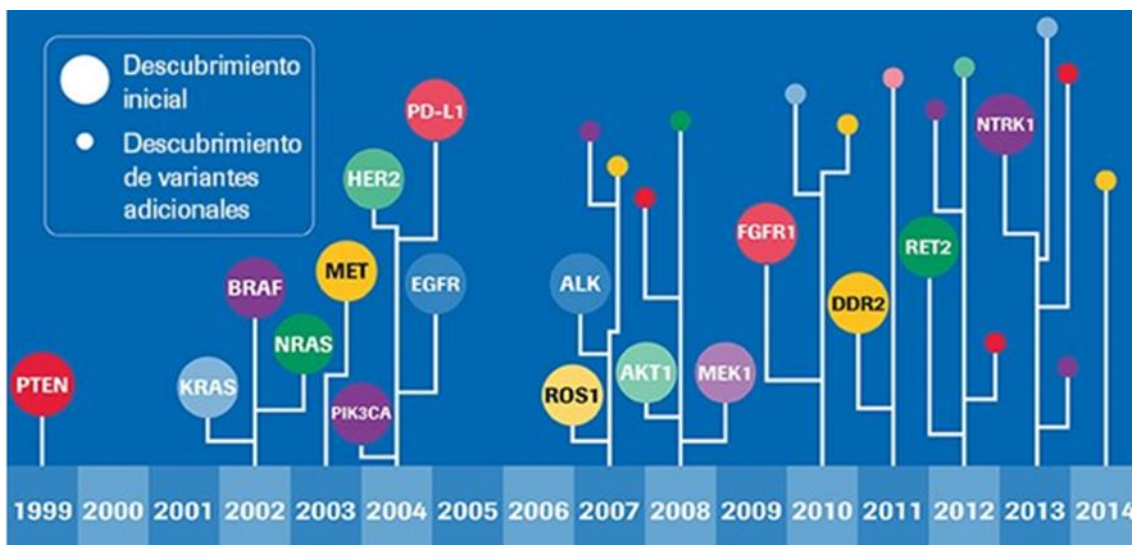
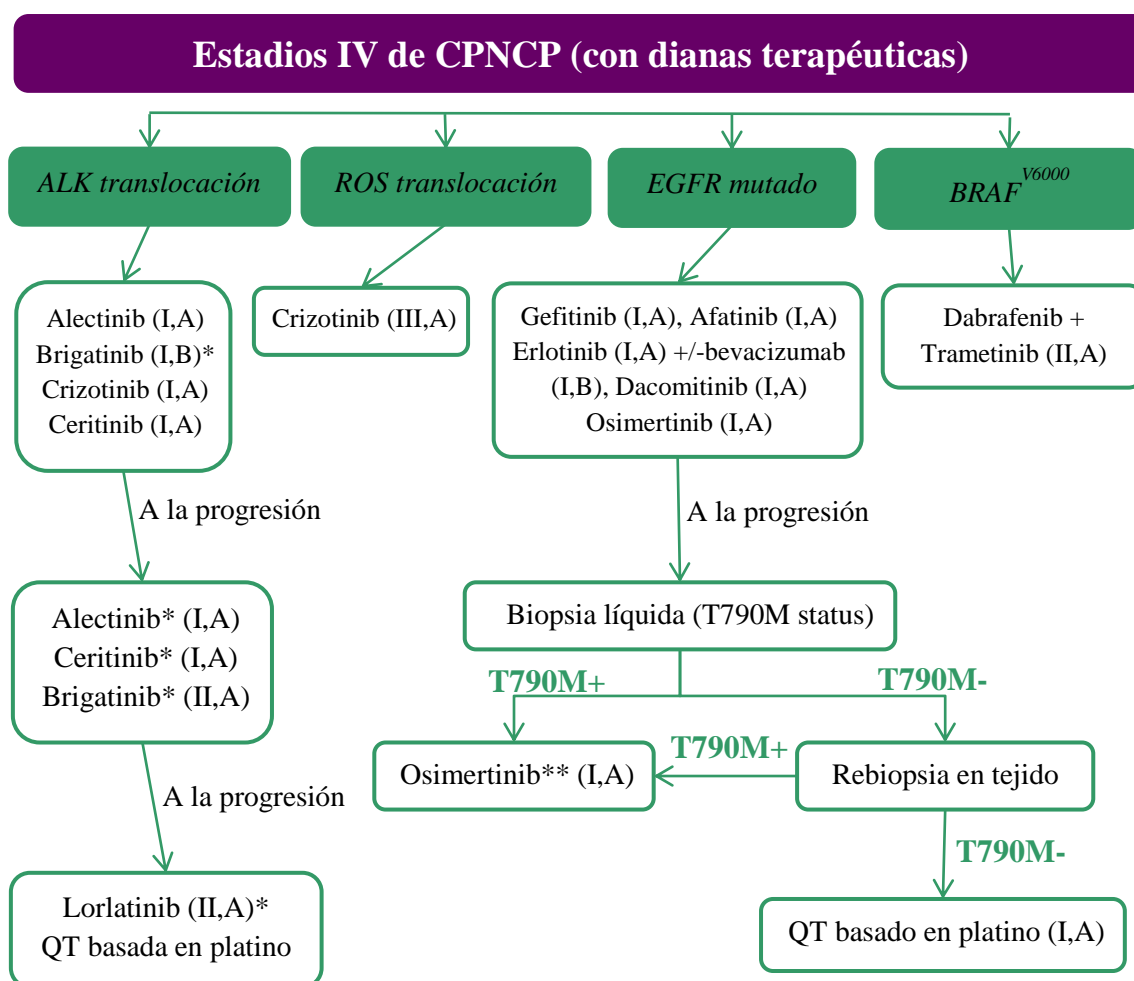


Figura 2: Principales biomarcadores en CPNCP y su fecha de descubrimiento  
Fuente: Roche.com

Aparte del subgrupo EGFR mutado y ALK con reordenamiento, existen otras alteraciones moleculares que definen más subgrupos de CPNCP<sup>7,57</sup> al tener disponibles fármacos específicos en desarrollo. En la figura 2 podemos visualizar el año del descubrimiento de cada uno de esos biomarcadores y sus variantes. Entre ellos destacan: ROS1, MET, BRAF, NTRK1 y PIK3CA. Se adjunta el algoritmo de la guía clínica de tratamiento de CPNCP con dianas terapéuticas propuesto por la SEOM (tabla 1).

Tabla 1: Guía clínica de tratamiento de CPNCP con dianas terapéuticas



\* En pacientes que previamente han recibido crizotinib

\*\* En pacientes que no han recibido 1ª línea osimertinib

En pacientes con oligo-progresión considerar estrategia local (cirugía o SBRT) y continuar con terapia dirigida (III,A)

Fuente: *SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018)*<sup>10</sup>

En la práctica clínica, el conocimiento de estas alteraciones moleculares ha permitido identificar a aquellos pacientes que se podrían beneficiar de tratamientos dirigidos y conocer mejor su pronóstico. Así se está llegando a clasificar distintos tipos de CPNCP, al menos dos bloques: con o sin *driver*, con o sin terapias dirigidas; como podemos observar en la tabla previa. Es el comienzo de una medicina cada vez más personalizada.

### 1.6 PRONÓSTICO DEL CP ESTADIO INICIAL INTERVENIDO

Aproximadamente el 30% de los pacientes con CPNCP presentan una enfermedad resecable en el momento del diagnóstico, para la cual el tratamiento estándar actual sigue siendo la cirugía con intención curativa<sup>10,13</sup>. A pesar de esta intención curativa en el estadio inicial, el fracaso del tratamiento y la mortalidad de los pacientes como consecuencia de la recidiva a distancia sigue siendo elevada.

El estado general del paciente y el estadio según TNM<sup>13</sup> siguen siendo los dos pilares básicos sobre los que se apoya el pronóstico e indicación de adyuvancia de un paciente con CPNCP intervenido. Actualmente, el tratamiento estándar para estos pacientes es un régimen adyuvante a base de dos fármacos (con cisplatino), que da lugar a una mejora de la supervivencia absoluta del 4-5% a los 5 años<sup>24</sup>. Como decíamos, en los últimos años se han logrado importantes éxitos terapéuticos con las terapias dirigidas y la IT en el CPNCP avanzado, lo que ha conducido a un aumento de la SG en este contexto. En la actualidad, se están realizando esfuerzos para reproducir estos logros en el CPNCP en fase inicial.

Los avances en conocimiento molecular y clínico de esta enfermedad aún no aportan datos medibles que hagan predecir la evolución de la enfermedad y elegir un tratamiento adyuvante en el momento del diagnóstico en un estadio inicial operable.

A propósito de lo explicado en el apartado anterior, en nuestro medio se utilizan los ITK en pacientes con CPNCP avanzado y EGFR mutado obteniendo resultados (en cuanto a porcentaje de mutaciones EGFR y eficacia del fármaco) similares a lo publicado en la literatura científica. Sin embargo, se desconoce la presencia o no de esta mutación, otras alteraciones moleculares o biomarcadores en los pacientes intervenidos en nuestro medio y si, además de predictores de respuesta, podrían ser factores pronósticos.

Es conocido que la presencia de estas mutaciones pueden ocurrir en momentos precoces de la patogénesis del CP<sup>58</sup>. Y aún es pronto para saber el alcance de la IT en el ámbito de la adyuvancia o neoadyuvancia y su posible influencia en la mejora del pronóstico del CP en estadios iniciales.

Concluyendo este capítulo, destacar que se hace necesario conocer mejor los factores pronósticos y predictivos en CPNCP estadios iniciales para impactar en la evolución de esta patología.

## CAPÍTULO 2. FACTORES PRONÓSTICOS EN CP

*En este capítulo se analiza el impacto pronóstico de los factores que influyen en la evolución de los pacientes con CP. Algunos son dependientes del propio paciente, otros de la técnica quirúrgica y otros de la histopatología propia del tumor.*

### 2.1 CLASIFICACIÓN TNM Y COMITÉ DE TUMORES TORÁCICOS

El diagnóstico del CP supone un reto mayor que el de otros tumores. Es obvio que el acceso al pulmón para tomar una biopsia es mucho más complejo, invasivo y peligroso que el de otros órganos de mayor accesibilidad, como la mama, el colon o la próstata, donde se localizan los cánceres más frecuentes. Además, hay que tener en cuenta que, en el proceso diagnóstico del CP, se tienen que poner en marcha una serie de pruebas de imagen e invasivas que tienen un doble objetivo: estadificar la enfermedad y, simultáneamente, llegar al diagnóstico anatomopatológico definitivo. Esto último es muy importante y lo desarrollaremos más adelante.

Para poder agrupar a pacientes con pronósticos similares y permitir que se beneficien de las mejores opciones terapéuticas es fundamental realizar una descripción concisa y exacta del nivel de extensión del CPNCP. El sistema utilizado internacionalmente es el TNM, propuesto inicialmente por Denoix en 1946 y actualizado periódicamente en reuniones de consenso entre la *American Joint Committee of Cancer (AJCC)*, *The Union for International Cancer Control's (UICC)*, *American Thoracic Society (ATS)*, *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)* y *The Japanese Cancer Association*, entre otros.

Con esta división por estadios se pretende:

1. Ayudar en la planificación del tratamiento.
2. Orientar sobre el pronóstico de cada paciente.
3. Evaluar los resultados del tratamiento.
4. Facilitar el intercambio de información entre los distintos profesionales implicados en el tratamiento multidisciplinar.
5. Ayudar a la investigación continuada.

El sistema de clasificación TNM se basa en la extensión anatómica de la enfermedad, determinada clínica e histopatológicamente y posee dos características fundamentales: sus principios básicos son aplicables a toda localización sin tener en cuenta el tratamiento y, además, puede ser suplementada más tarde por la información disponible de la histopatología y/o cirugía.

El sistema TNM describe la extensión anatómica de la enfermedad evaluando tres aspectos:

Factor T: define la extensión del tumor principal.

Factor N: define la ausencia o presencia y extensión de metástasis en ganglios linfáticos regionales.

Factor M: define la ausencia o presencia de metástasis a distancia del tumor principal.

Añadiendo números a estos tres factores, se indica la extensión de la enfermedad: T0, T1, T2, T3, T4, N0, N1, N2, M0, M1.

La clasificación TNM, como categorizador de la extensión anatómica de la enfermedad, supone el indicador pronóstico más potente para la inmensa mayoría de tumores malignos. La tasa de supervivencia reportada a 5 años de pacientes con CP en estadios I y II después de resección completa quirúrgica es aproximadamente 60%-90% y 30%-70% respectivamente. La búsqueda de otros factores pronósticos del CP nunca puede obviar este dato de TNM<sup>59</sup>.

La IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) ha desarrollado una nueva base de datos con 94,708 casos, provenientes de 35 fuentes y 16 países de todo el mundo. Fruto del análisis de los datos recogidos, nace la 8ª clasificación TNM para el CP<sup>5,60</sup>. Pretende que el margen de homogeneización de los pacientes con el mismo TNM sea el máximo posible, de forma que se puedan estudiar otros factores pronósticos distintos, independientes al estadio que puedan influir en la supervivencia o evolución de los pacientes.

Desde 1997 se ha actualizado tres veces esta clasificación TNM para el CP, la 8ª edición se publicó en 2016 y comenzó a utilizarse en la práctica clínica en enero de 2017. Los pacientes de este trabajo, al haber sido diagnosticados antes de esa fecha, están estadificados con la 7ª edición de TNM para CP<sup>61</sup>.

En las últimas décadas ha influido mucho en un mejor diagnóstico clínico y patológico del TNM de CP los avances técnicos en radiología<sup>62</sup>, medicina nuclear (principalmente con la PET<sup>63</sup>, tomografía de emisión de positrones), ecobroncoscopia (EBUS, por sus siglas en inglés) y ecoendoscopia esofágica (EUS, por sus siglas en inglés) y técnicas de biopsia con aguja fina y gruesa guiadas por tomografía computarizada (TC) o ecografía<sup>64</sup>. En todas las guías de práctica clínica de CP existe un algoritmo diagnóstico que contempla utilizar todos estos recursos para evitar, en la medida de lo posible en cada caso, dejar un factor del estadio como desconocido o “x”.

La toma de decisiones de la estadificación debe ser personalizada para cada paciente en un comité multidisciplinario, en el que oncólogos médicos y radioterápicos, junto con todos los especialistas involucrados en el diagnóstico, incluidos los patólogos, serán los que tomen la decisión final sobre las mejores opciones, ya que sólo con un proceso diagnóstico completo y adecuado se conseguirá el objetivo final: la mejor opción terapéutica para el paciente. La implantación de este comité en los centros hospitalarios españoles no es del todo homogénea y son muchas ya las recomendaciones

para instaurarlos<sup>65</sup>; también los ítems de calidad que deberían cumplirse en cada uno de ellos, no solo para afinar en el diagnóstico sino, principalmente, para decidir el mejor abordaje terapéutico y brindar una atención óptima a los pacientes con CP. Los equipos multidisciplinares son estrategias necesarias para el manejo de pacientes con CP y se han asociado con mejores resultados, como un aumento en la calidad de vida y la supervivencia<sup>66</sup>.

En el HUI este comité funciona desde octubre de 2007 y, a pesar de las limitaciones de algunos recursos mantenida en el tiempo, no deja de cumplir la mayoría de los requisitos de excelencia citados. También promueve la realización de una jornada multidisciplinaria anual (ya se han celebrado siete reuniones) y la publicación de un protocolo de tratamiento del CP, cuya última actualización es de 2019<sup>67</sup>.

En el año 2022 también se ha puesto en marcha el comité multidisciplinario de oncología molecular; éste pretende analizar la información molecular obtenida a través de la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) y proporcionar recomendaciones de tratamiento racionales, basadas en la genómica y adaptadas a los pacientes.

## 2.2 TABAQUISMO

Lamentablemente, el consumo de tabaco sigue siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo<sup>68</sup>. Se prevé que dejará más de mil millones de muertos en el siglo XXI, después de matar a casi 100 millones en el transcurso del siglo XX. El tabaquismo está implicado en el 90% de la mortalidad por CP, en el 95% de la mortalidad por Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y en el 50% de la mortalidad cardiovascular<sup>69</sup>.

Aunque no se ha identificado completamente la relación molecular causa-efecto que induce la aparición de cáncer por el tabaco, existen suficientes evidencias epidemiológicas que hacen incuestionable esta asociación. Es históricamente conocida la relación entre hábito tabáquico y CP<sup>70</sup>. El tabaco constituye el factor de riesgo más importante para sufrir un CP y cerca del 85% de los casos de CP se relaciona con su consumo. Entre los fumadores, el riesgo de desarrollar un CP es 22 veces superior al de cualquier no fumador. Sin embargo, sólo el 10-15% de los fumadores desarrollará un CP. El riesgo disminuye al dejar de fumar, y se estima que un fumador tarda 10-15 años en igualar la esperanza de vida de un no fumador<sup>71</sup>.

El humo del tabaco contiene más de 3000 sustancias, incluyendo carcinógenos, cocarcinógenos (aresol, fenol) y sustancias irritantes (óxido nítrico). Los carcinógenos más importantes son el 4,4 benzopireno, las nitrosaminas y las aminas aromáticas. El vínculo entre el tabaco y el cáncer resulta de una poderosa alianza de dos factores: la nicotina y los carcinógenos. La nicotina es adictiva y tóxica, pero no cancerígena. Sin embargo, esta adicción hace que millones de personas fumen, y el tabaco contiene muchos carcinógenos<sup>72</sup>.

El mecanismo de carcinogénesis del humo del tabaco implica la activación de los carcinógenos por enzimas específicas; posteriormente, los carcinógenos activados formarán enlaces covalentes con macromoléculas celulares, fundamentalmente ADN, y se producirán mutaciones (por activación de oncogenes o inactivación de genes supresores y de genes de reparación del ADN) que alterarán la expresión genética de la célula.

Se estima que sólo el 10-15% de los fumadores desarrollará CP, por tanto, existe una gran variación interindividual. Esto podría explicarse por la existencia de una predisposición genética que determinaría una mayor susceptibilidad; así, la presencia de polimorfismos genéticos en las vías de metabolización del carcinógeno podría condicionar diferentes riesgos de CP. Las variaciones más importantes incluyen polimorfismos en el locus del gen del citocromo P450 y en el grupo M1 de genes glutatión-S-transferasas<sup>73,74</sup>.

El tabaco no sólo es un factor que influye en el desarrollo de CP sino que también se relaciona con las características clinicopatológicas del mismo y su pronóstico<sup>75,76</sup>. Además, en pacientes ya diagnosticados de CP que continúan fumando, se ha demostrado una correlación negativa con la supervivencia del CP<sup>77-79</sup>.

A todo lo anteriormente expuesto se añade que algunos de los mecanismos patogénicos que llevan al desarrollo de CP se caracterizan por ser trastornos genéticos de adicción oncogénica que permitirían controlar la proliferación celular tumoral si se inhibe un oncogen. La mayoría de los subtipos de CP con mecanismos de adicción oncogénica se desarrollan en pacientes nunca fumadores. Esto está haciendo cambiar la visión del CP y considerar una enfermedad distinta el CP en un paciente nunca fumador, por las posibilidades que están surgiendo actualmente de tratamiento dirigido y por lo que supone de salud basal que el paciente no haya fumado nunca.

Con lo explicado en este apartado se entiende que haya un esfuerzo internacional por seguir disminuyendo el número de personas que empiezan a fumar y aumentar el de aquellas que abandonan el hábito tabáquico. La Asamblea Mundial de la Salud instituyó el Día Mundial sin Tabaco en 1987 para llamar la atención mundial hacia la epidemia de tabaquismo y sus efectos letales. La celebración de este día (31 de mayo) es una oportunidad para destacar mensajes concretos relacionados con el control del tabaco y fomentar la observancia del Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco<sup>80</sup>.

### 2.3 CIRUGÍA

La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección en los estadios iniciales para el CP. El objetivo del tratamiento quirúrgico del CPNCP es conseguir una resección completa (R0) de la lesión tumoral. Sólo los pacientes cuya lesión es potencialmente resecable deben ser incluidos para una cirugía curativa; puesto que no existe evidencia del beneficio de la cirugía de reducción de volumen tumoral.



Los principios básicos de la cirugía oncológica en el CPNCP para conseguir una resección completa se recogen en el “Protocolo de tratamiento del cáncer de pulmón del subcomité de tumores torácicos del HUIJ. Actualización 2019” y se basan en la definición IASLC ampliada<sup>81</sup>:

- Extirpación completa del tumor y el territorio de drenaje linfático pulmonar mediante resección anatómica (neumonectomía, bilobectomía o lobectomía) con márgenes de resección libres demostrados microscópicamente. Estos márgenes deben incluir los muñones de arterias, venas y bronquios, los tejidos blandos peribronquiales y cualquier margen periférico cercano al tumor o al resto del tejido resecado.

- Estudio intraoperatorio de bordes de resección y ampliación, si es factible y necesario.

- No lesionar el tumor para evitar dispersión de células tumorales. Es aconsejable resecar en bloque con estructuras adyacentes afectas.

- Disección ganglionar sistemática en su forma más amplia, o bien disección ganglionar sistemática lóbulo-específica (tal como se describirá más adelante). Las muestras deben incluir, al menos, seis ganglios, tres de las estaciones intrapulmonares y/o hiliares y tres de las mediastínicas, una de las cuales debe ser la subcarínica.

- No debe haber extensión extracapsular del tumor en los ganglios resecados de manera aislada o en los localizados en el margen del tumor pulmonar principal.

- El ganglio mediastínico extirpado más alto debe ser negativo.

- En caso de tumores menores de 3 cm, periféricos, pacientes mayores, con baja reserva funcional respiratoria y adenocarcinoma no invasivo (antiguo bronquioloalveolar) se contempla la resección sublobar.

Según los márgenes, la cirugía puede ser:

- Rx: La presencia de tumor residual no puede evaluarse
- R0: No hay tumor residual
- R1: Tumor residual microscópico
- R2: Tumor residual macroscópico

Las definiciones de IASLC de resección completa (ausencia de enfermedad residual macroscópica y microscópica; disección ganglionar sistemática; sin extensión extracapsular en los ganglios linfáticos distales; y negatividad del ganglio mediastínico más alto eliminado), resección incierta (márgenes de resección libres, pero con uno de los siguientes: evaluación del ganglio linfático menos rigurosa que la disección ganglionar sistemática; positividad del ganglio mediastínico más alto eliminado; presencia de carcinoma *in situ* en el margen bronquial; citología de lavado pleural positiva) y resección incompleta (presencia de enfermedad residual; extensión



extracapsular en los ganglios linfáticos distales; citología positiva de derrames pleurales o pericárdicos) se asocian con diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia<sup>82</sup>.

En esta cirugía, la lobectomía sigue siendo el tratamiento de elección para los tumores T1 ya que la tasa de recidiva local después de una resección más limitada (segmentectomía o resección en cuña) es mayor<sup>83,84</sup>. Los estudios que avalan esta práctica son de hace más de una década, por lo que, con los avances actuales en las técnicas radiológicas y quirúrgicas, parece incierto que las conclusiones todavía sean aplicables para lesiones más pequeñas (T1a)<sup>85</sup>. De hecho, recientemente se han dado a conocer los primeros resultados del ensayo aleatorizado norteamericano/internacional CALGB 140503 que muestran que para los pacientes con CPNCP periférico de 2 cm o menos tamaño que tienen enfermedad ganglionar negativa confirmada patológicamente en los ganglios linfáticos hiliares y mediastínicos principales, la resección sublobar no es inferior a la lobectomía<sup>86</sup>.

La investigación basada en grandes bases de datos sugiere un cambio de práctica limitado y según histologías, no siempre conocidas antes de la cirugía. En el carcinoma de células escamosas, la lobectomía es superior a la segmentectomía o la resección en cuña. Para el ADC, la resección en cuña es inferior a la lobectomía, mientras que la segmentectomía resulta equivalente<sup>87</sup>. Los diferentes tipos de ADC han evolucionado en diferencias en el patrón metastásico, recidiva y supervivencia, y en base a esto, uno podría esperar que una resección limitada sea adecuada en los subtipos menos invasivos como se decía en el protocolo.

Si la cirugía se debe realizar con toracotomía abierta estándar o un procedimiento de cirugía toracoscópica (VDT), es probablemente menos importante desde la perspectiva oncológica, siempre que se pueda lograr técnicamente resección R0. Para los pacientes, el mayor beneficio es la reducción de la morbilidad y la mortalidad postoperatorias, lo que resulta en una mejor calidad de vida y en la realización de VDT como el método más atractivo en este sentido<sup>16,88</sup>.

Los pacientes que presentan múltiples primarios deben evaluarse con intención curativa. Se recomienda la resección completa, pero también se han encontrado combinaciones de resección y SBRT, por lo que habría que individualizar cada caso<sup>89-91</sup>. Un punto de preocupación podría ser el grado de estadificación de los ganglios linfáticos<sup>92</sup>; tema que se abordará en el siguiente apartado.

## 2.4 LINFADENECTOMÍA

La linfadenectomía durante la resección del CP es clave para determinar las opciones de tratamiento adyuvante y por tanto mejorar la supervivencia, así como para obtener una adecuada información pronóstica. El manejo de los ganglios linfáticos

durante la cirugía está dictado principalmente por los requisitos de estadificación para garantizar la resección completa según la definición de IASLC.

Existen varias publicaciones que confirman igual eficacia en la linfadenectomía independientemente del abordaje efectuado (VDT / toracotomía)<sup>93-95</sup>.

Al realizar la estadificación ganglionar mediastínica en el CP tenemos las siguientes opciones:

1. Biopsia ganglionar selectiva: biopsia de uno o varios ganglios de aspecto sospechoso. Estaría justificado solo para demostrar la afectación N1 o N2 cuando la resección no es posible (toracotomía / videotoracosopia exploradora).
2. Muestreo: resección de estaciones predeterminadas por el cirujano. Exploración de un número preestablecido de estaciones ganglionares pulmonares y mediastínicas.
3. Disección ganglionar sistemática: resección sistemática de todo el tejido mediastínico, incluyendo las adenopatías entre los límites anatómicos. Hay que tener en cuenta que, en los tumores del lado izquierdo, para poder acceder a las estaciones paratraqueales altas y bajas se debe liberar el ligamento arterioso para poder movilizar el arco aórtico lo cual puede conllevar un aumento de la morbi-mortalidad.
4. Disección ganglionar sistemática lóbulo-específica: resección sistemática de todo el tejido mediastínico, incluyendo las adenopatías, dependiendo del lóbulo donde se localice el tumor. Este tipo de disección selectiva es aplicable a carcinomas escamosos T1.

Las áreas a explorar según el lóbulo afectado, siguiendo las descripciones de Naruke<sup>96</sup> y las normas del grupo cooperativo de carcinoma broncogénico de la SEPAR<sup>97</sup> (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica) son: disección y examen histológico de los ganglios hiliares e intrapulmonares (lobares, interlobares y segmentarios) y al menos tres de las siguientes estaciones ganglionares mediastínicas, según la localización lobar del tumor primario (figura 3):

- Lóbulo superior derecho y lóbulo medio: áreas 2R, 4R y 7.
- Lóbulo inferior derecho: áreas 4R, 7, 8 y 9.
- Lóbulo superior izquierdo: áreas 5, 6 y 7.
- Lóbulo inferior izquierdo: áreas 7, 8 y 9.

En total debería incluir 6 ganglios.

5. Disección ganglionar extendida: ganglios pulmonares y mediastínicos contralaterales, como complemento a la disección ganglionar sistemática ipsilateral al tumor. Incluye la disección cervical y generalmente se realiza mediante esternotomía media. Este tipo de disección ganglionar no se realiza en la práctica.

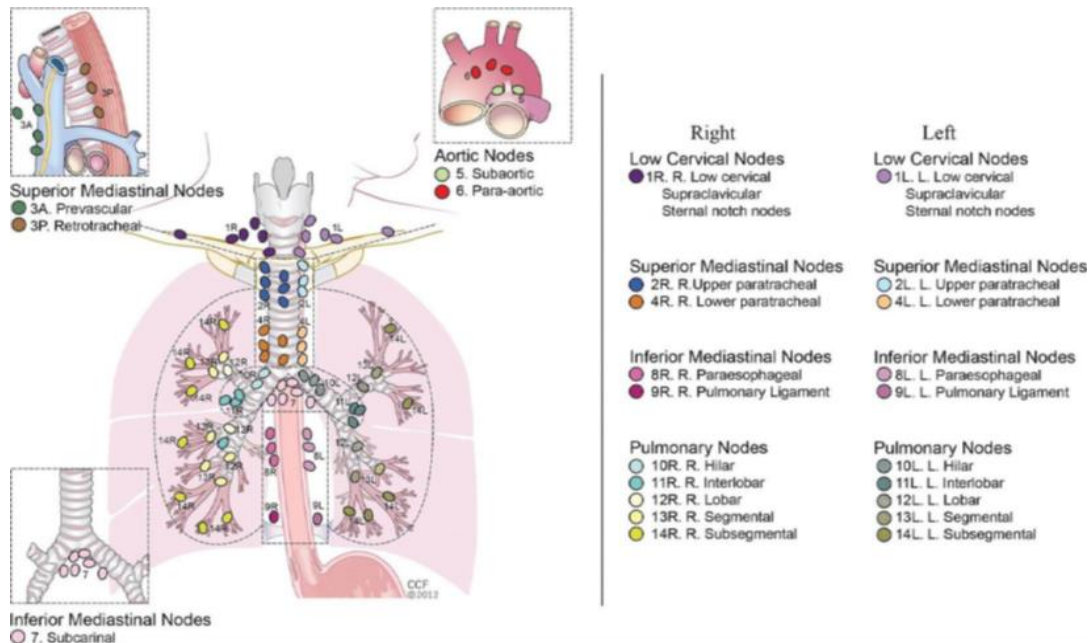


Figura 3: Mapa de las áreas ganglionares mediastínicas

Fuente: IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*)

Se recomienda la disección ganglionar sistemática en los estadios II y IIIA<sup>98</sup>.

Últimamente se ha propuesto que, en los CPNCP con ganglios positivos, la relación de ganglios linfáticos (LNR), definida como la relación entre los ganglios linfáticos positivos y el total de ganglios linfáticos extraídos o examinados, es una herramienta de estratificación pronóstica más eficaz que el pN por sí solo<sup>99</sup>. Matsuguma *et al.* informaron que LNR y el número de ganglios linfáticos metastásicos pueden ser indicadores de pronóstico más efectivos que la clasificación pN actual basada en la ubicación de los ganglios linfáticos metastásicos. Además, propusieron que un mayor número de ganglios linfáticos negativos resecaos era un factor pronóstico significativamente favorable en pacientes con ganglios positivos<sup>100</sup>. Del mismo modo, Ludwig *et al.* demostraron que la supervivencia posoperatoria de los pacientes con CPNCP se asoció con el número de ganglios linfáticos resecaos durante la cirugía, y recomendaron que el número óptimo de ganglios linfáticos resecaos debería ser de 11 a 16<sup>101</sup>.

El sistema de estadificación TNM clásico proporciona un indicador conveniente y confiable del resultado de los pacientes con CPNCP; sin embargo, se ha comprobado que los pacientes pueden tener diferentes pronósticos incluso con los mismos estadios T, N y M, especialmente aquellos en el grupo N2. La clasificación pN actual se basa en la idea de que la metástasis en los ganglios linfáticos ocurre inicialmente en la vecindad del tumor primario, y luego se disemina secuencialmente a ganglios linfáticos más distantes, como los ganglios linfáticos mediastínicos. Sin embargo, la metástasis puede ocurrir inicialmente en los ganglios mediastínicos sin metástasis N1 en aproximadamente una cuarta parte de los pacientes, y los pacientes que se pasan por alto N2 tienen un mejor pronóstico que los pacientes que no lo hacen. Este argumento y otros como las diferencias en las técnicas de extirpación y estudio anatomopatológico, avalan cada vez más los resultados que se siguen publicando sobre LNR y su valor pronóstico independiente; un LNR más alto indica un peor pronóstico<sup>102</sup>.

## 2.5 HISTOPATOLOGÍA

El diagnóstico histológico de CP, habitualmente se hace con fibrobroncoscopia o biopsia guiada por TC; a menudo se amplía con la evaluación de los ganglios linfáticos regionales mediante EBUS (*Endo Bronchial Ultra Sound*) o EUS (*Endoscopic Ultrasonography*). En la mayoría de los casos, esto será suficiente para diagnosticar el CPNCP, aunque con bastante frecuencia la cantidad de material obtenido no sea suficiente para subclasificar el tumor con más detalle<sup>6,103</sup>. Para las etapas más tempranas del CPNCP, hasta hace poco, no era necesario un diagnóstico patológico-molecular detallado previo al tratamiento, puesto que la selección de la terapia más efectiva de los estadios I-III CPNCP no precisaba de estos datos. Hoy en día, como ya se ha comentado en la introducción, conviene conocer la biología molecular y el estado de PD-L1 de cara a planificar la adyuvancia. Por suerte, para el análisis molecular, la muestra obtenida a través de EBUS de los ganglios linfáticos es a menudo suficiente<sup>104</sup> y esto puede ayudar en la planificación de la neoadyuvancia cuando proceda, puesto que no se dispone de la pieza quirúrgica antes del inicio del tratamiento.

Se han estudiado series amplias de pacientes intervenidos<sup>105-107</sup>, encontrando relación entre los distintos subtipos de ADC (siguiendo la clasificación propuesta por Travis y Bambilla<sup>103</sup>, tabla 2a) y su pronóstico independientemente del tratamiento realizado. Estos datos podrían influir en el tratamiento quirúrgico, teniendo en cuenta que los subtipos ADC AIS (ADC *in situ*), MIA (ADC mínimamente invasivo) y lepidico no suelen dar metástasis ganglionares y se podrían tratar con segmentectomía sin linfadenectomía. Sin embargo, los subtipos micropapilar y predominantemente sólido alcanzan entre un 50-60% de metástasis ganglionares en las series estudiadas, por lo que estaría obligado hacer lobectomía con linfadenectomía independientemente del tamaño del tumor. Tales decisiones podrían basarse en la biopsia intraoperatoria si no se tuviera un diagnóstico histológico previo; examen que tiene una alta tasa de

concordancia con la histopatología final, pero está lejos de ser una práctica estándar validada debido a varios problemas técnicos y logísticos<sup>108</sup>.

Con los datos de estas series, se han propuesto tres grupos pronósticos distintos según el subtipo predominante de la muestra del tumor<sup>105</sup> (tabla 2b). De mejor a peor pronóstico serían: grupo 1 con los subtipos AIS y MIA, grupo 2 con los subtipos lepidico, acinar y papilar y grupo 3 con los subtipos micropapilar y sólido. Sin embargo, esta clasificación aún no se utiliza en la práctica clínica para tomar decisiones en cuanto a cambios en la adyuvancia o en el seguimiento tras la cirugía.

Tabla 2a: IASLC/ATS/ERS Clasificación del ADC de pulmón en muestras quirúrgicas

<i>Lesiones preinvasivas</i>	
	Hiperplasia adenomatosa atípica
	ADC in situ ( $\leq 3$ cm anteriormente BAC)
	No mucinoso
	Mucinoso
	Mixto mucinoso/no mucinoso
<i>ADC mínimamente invasivo (<math>\leq 3</math>cm de tumor predominante lepidico con <math>\leq 5</math>mm de invasión)</i>	
	No mucinoso
	Mucinoso
	Mixto mucinoso/no mucinoso
<i>ADC invasivo</i>	
	Predominio lepidico (antes patrón BAC no mucinoso, con invasión $>5$ mm)
	Acinar predominante
	Papilar predominante
	Micropapilar predominante
	Sólido predominante con producción de mucina
<i>Variantes de ADC invasivo</i>	
	ADC invasivo mucinoso (antes BAC mucinoso)
	Coloide
	Fetal (bajo y alto grado)
	Entérico

Tabla 2b: Supervivencia de acuerdo a subtipos de ADC según la clasificación histológica de IASLC/ATS/ERS

<i>IASLC/ATS/ERS clasificación de subtipos</i>	<i>Cantidad (%)</i>	<i>SLE a los 5 años</i>
<i>Bajo grado</i>		
Adenocarcinoma <i>in situ</i>	1 (0.2%)	100%
Adenocarcinoma mínimamente invasivo, no invasivo	7 (1%)	100%
Adenocarcinoma mínimamente invasivo, mixto mucinoso y no mucinoso	1 (0.2%)	100%
<i>Grado intermedio</i>		
Lepídico predominante	29 (6%)	90,0%
Acinar predominante	232 (45%)	84%
Papilar predominante	143 (28%)	83%
<i>Alto grado</i>		
Micropapilar predominante	12 (2%)	67%
Sólido predominante	67 (13%)	70,0%
Coloide predominante	9 (2%)	71%
Adenocarcinoma mucinoso invasivo, mixto mucinoso/no mucinoso	13 (3%)	76%
Las estimaciones de SLE (1-CIF o función de índice acumulativo) se calculan basándose en el análisis de riesgo competitivo.		

Abreviaturas de Tablas 2a y 2b: ATS, *American Thoracic Society*; ERS, *European Respiratory Society*; IASLC, *International Association for the Study of Lung Cancer*; BAC, *carcinoma bronquioloalveolar*.

En cuanto al escamoso o epidermoide, en 2015, la Organización Mundial de la Salud revisó la clasificación para reconocer tres variantes: queratinizante, no queratinizante y basaloide (cuando el componente basaloide es más del 50% del tejido con áreas mínimas de diferenciación escamosa). No parece haber importancia pronóstica para los carcinomas escamosos queratinizantes versus no queratinizantes<sup>109</sup>. Algunos estudios sugieren un peor pronóstico para los carcinomas de células escamosas basaloideas, pero otros datos no apoyan esto.

Todas las guías clínicas recomiendan que la clasificación patológica NOS (las siglas de “*not otherwise specified*”) en el diagnóstico de un CPNCP debe usarse solo en casos donde es imposible obtener suficiente tejido para más clasificación, o cuando los pasos para clasificar aún más el tumor no son concluyentes.

En definitiva, se conoce la importancia de la clasificación histológica en el pronóstico y planteamiento terapéutico del CPNCP, pero aún no tiene repercusión esta subclasificación en la práctica clínica habitual.

## 2.6 MICROAMBIENTE TUMORAL (MAT)

El interés creciente por el MAT surgido en las últimas décadas se asocia a la importancia de la IT en CP. Una mejor comprensión de los mecanismos por los cuales el tumor es capaz de desarrollarse y progresar sin ser destruido por el sistema inmunitario ayudaría a entender qué características del MAT pueden influir en el beneficio o no con IT.

Los tumores, además de estar constituidos por células malignas, se rodean de variedad de células no-transformadas propias del hospedador (células estromales, endoteliales e inmunocompetentes). El término MAT no solo hace referencia a los distintos componentes del mismo sino también a la gran diversidad de interacciones que se establecen entre las células transformadas y las no-transformadas. Curiosamente, tanto la evolución como la estructura y las actividades que llevan a cabo las células del MAT tienen muchos paralelismos con los procesos de curación de heridas e inflamación. Aunque se precisan más estudios en este sentido, muchos de los ya existentes subrayan la relación entre inflamación crónica y el desarrollo tumoral<sup>110</sup>.

Este trabajo se centrará en revisar lo conocido hasta ahora sobre TIL, expresión de PD-L1 en el tumor y TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ).

### 2.6.1 TIL

El estudio de TIL ha avanzado en los últimos años demostrando que tiene impacto en el curso clínico de varios tumores sólidos. Los TIL se pueden ver en aproximadamente 25% de los pacientes con CP, con mayor frecuencia en carcinomas poco diferenciados y en tumores con invasión vascular microscópica<sup>111</sup>.

El infiltrado inmunitario en tumores sólidos comprende todos los tipos de células inmunitarias que pueden estar presentes en un tumor: macrófagos, granulocitos neutrófilos, células dendríticas, células natural killer (NK), mastocitos, células B y células T; pero los linfocitos T constituyen el 80% de los TIL, y entre ellos, los linfocitos citotóxicos CD8+ son el brazo efector de la inmunidad adaptativa<sup>112</sup>. Varios estudios publicados muestran un efecto pronóstico positivo del infiltrado de las células T citotóxicas CD8+ en diferentes tumores, especialmente en cáncer colorrectal, pero también en tumores de mama, cáncer de ovario, esofágico y pancreático<sup>113</sup>.

Los estudios publicados que analizan la influencia pronóstica de los TIL en el CPNCP tienen resultados contradictorios o no siempre validados. La serie publicada por Ruffini y su equipo en 2009, concluye que la presencia de TIL se correlaciona con una mejor supervivencia en los carcinomas de células escamosas, particularmente en las



primeras etapas<sup>111</sup>. En 2011 se publicaron dos series que también encontraron una mayor supervivencia en pacientes con estadio I con TIL totales aumentados, beneficio mayor si, además, no había invasión linfovascular<sup>114</sup> y el tumor es grande<sup>115</sup>. En 2020 un metaanálisis concluye que las altas densidades de TIL, CD3+ TIL, CD4+ TIL, CD8+ TIL y CD20+ TIL son biomarcadores de pronóstico favorable para pacientes con CPNCP, y Foxp3+ TIL es un biomarcador de mal pronóstico<sup>116</sup>.

En una serie publicada en 2015 de 552 microarrays de tejidos, las células T CD3+ y CD8+ se asociaron con un mejor resultado, pero solo el CD8 proporcionó un valor pronóstico independiente en CPNCP. En esta serie, el grado de infiltración linfocítica no tuvo valor pronóstico<sup>117</sup>.

En 2016 Brambilla publica el análisis del valor pronóstico de TIL en un grupo de pacientes con CPNCP intervenido<sup>118</sup>. Los autores validaron el valor predictivo de TIL en pacientes incluidos en dos ensayos aleatorizados de QT adyuvante (más de 700 pacientes en cada ensayo). La intensidad de TIL se dividió en dos categorías, TIL intenso y no intenso. El análisis mostró una SG y SLE mayor en el grupo de pacientes con un TIL intenso ( $p = 0,001$ ). Los resultados de validación en los ensayos de QT adyuvante también fueron similares. SG y SLE fueron mayores en el grupo TIL intenso (85% SG a 5 años en comparación con 58% y 79% SLE a 5 años en comparación con 50%).

En una revisión publicada también en 2016 sobre el papel de los TIL en el desarrollo, la progresión y el pronóstico del CPNCP, se incluyeron 17 estudios<sup>119</sup>. La mitad de ellos establecieron que las células T CD8+ eran un factor de pronóstico positivo independiente para los pacientes con CPNCP. En esta revisión también se recoge la ubicación de la infiltración linfocítica, analizada en varios estudios. Diferentes publicaciones muestran que las poblaciones de células inmunitarias se distribuyen estratégicamente dentro de los diversos compartimentos tisulares: el núcleo del tumor, el estroma del tumor o el margen invasivo. Todas estas características, tipo de célula, densidad y ubicación, constituyen lo que se denomina “contexto inmunitario”.

Schalper y su equipo sugieren que la ubicación espacial de los subtipos de células inmunitarias en relación con las células cancerosas puede tener relevancia biológica<sup>117</sup>. En el estudio de Brambilla no se diferenció los subtipos de células inmunitarias entre TIL, por lo tanto, los autores no pudieron evaluar si el efecto de la infiltración linfocítica intensa podría estar relacionado con un subtipo de células inmunitarias (CD4+, CD8+, CD20 o células T reguladoras). Sin embargo, en 2015, Donnem y sus colaboradores publicaron que la densidad de las células T estromales CD8 + era un fuerte factor de pronóstico positivo independiente sobre la SLE, la SG y la supervivencia específica del CPNCP<sup>120</sup>.

También está aumentando la evidencia que analiza el valor pronóstico de los TIL en los diferentes compartimentos; los TIL estromales parecen tener un impacto pronóstico superior que los epiteliales<sup>119,121</sup>. Brambilla tampoco incluye esta



discriminación estromal y epitelial de la infiltración linfocítica, porque los autores creen que podría agregar confusión y perjudicar la reproducibilidad interobservador.

El concepto de “*immunoediting*” (figura 4) se refiere a la capacidad del sistema inmunológico para reconocer a los tumores emergentes. Este proceso describe las interacciones entre las células inmunitarias y tumorales. Implica tres fases: en la primera fase, las células innatas y adaptativas destruyen los tumores iniciales. La segunda es la fase de equilibrio, en la cual aquellas células que no han sido eliminadas se mantienen latentes. La última fase es la fase de escape, en la que las células tumorales producen citoquinas y factores de crecimiento que inducen un estado inmunosupresor, de modo que las células tumorales pueden evitar el reconocimiento inmunitario y llevar al crecimiento tumoral<sup>119</sup>.

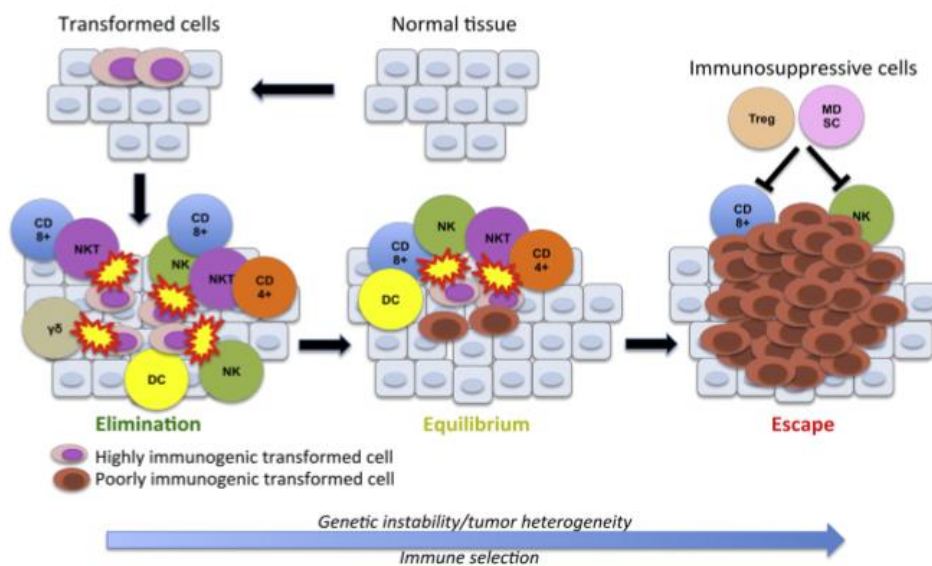


Figura 4: Fases del proceso *immunoediting*.

Fuente: *The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer*<sup>119</sup>.

Este proceso puede ser dual<sup>122</sup>; puede suprimir el crecimiento tumoral pero también promoverlo mediante la selección de células cancerígenas que pueden evadir la vigilancia. Como se sugiere en la serie publicada por Chiba<sup>123</sup> y Ruffini<sup>111</sup>, los TIL pueden tener un efecto de vigilancia inmunitaria contra el crecimiento de las micro-metástasis. Ese efecto podría explicar por qué algunos pacientes en etapa temprana desarrollan metástasis a distancia poco después de una resección pulmonar.

A pesar de que el estudio de Brambilla no identificó ninguna interacción entre TIL y el tratamiento de QT, plantean la pregunta sobre la idoneidad de utilizar TIL como factor de estratificación en ensayos que prueban la IT. Esto se apoya en los resultados obtenidos en otras neoplasias malignas, como el cáncer de mama, donde una gran

cantidad de células T CD4+ infiltradas después de la QT paliativa se ha relacionado con una mejor respuesta clínica<sup>124</sup>.

En la revisión de Bremnes<sup>119</sup> desarrollaron un *Immuno-score* que clasifica la densidad de células T CD8+ en el estroma tumoral de pacientes con CP en tres categorías (baja, intermedia o alta). Lograron demostrar un impacto pronóstico del *Immuno-score* dentro de IA a IIIA *pStages* similar a TNM *pStages*. Estos resultados deben validarse en grandes estudios prospectivos antes de que se puedan implementar, pero en el futuro podrían ser una herramienta para predecir la respuesta del paciente a las terapias inmunitarias.

Como conclusión de este apartado se podría decir que la presencia de TIL y su repercusión pronóstica, confirma que el sistema inmunológico juega un papel clave en la evolución del tumor y del paciente. Por tanto, la detección de la densidad de TIL en el diagnóstico patológico será útil para guiar el tratamiento y el pronóstico de los pacientes con CPNCP; queda por definir los criterios claros para hacerlo. Lo deseable para un futuro próximo sería el desarrollo validado de un puntaje inmuno-TNM como herramienta para identificar pacientes que se beneficiarían de IT; aunque los datos actuales sugieren que la presencia de TIL *per se* no es predictiva, sino que depende de la naturaleza precisa de la infiltración TIL y el estado funcional de TIL<sup>125</sup>.

A día de hoy, como ocurre con la subclasificación histológica, no se utiliza esta característica en la práctica clínica para tomar decisiones en cuanto a tratamiento en un CPNCP estadio inicial: tratamiento quirúrgico, adyuvancia o seguimiento tras la cirugía. Sin embargo, el interés por descubrir nuevos factores pronósticos útiles para mejorar la evolución del CP hace que en muchos informes de anatomía patológica se incluyan cada vez más características analizadas en este sentido.

### 2.6.2 Expresión de PD-L1

Tanto las células tumorales como las células inmunitarias son capaces de expresar señales inhibitorias de la respuesta celular T. Así los tumores son capaces de evadir la respuesta inmunitaria e inducir tolerancia a esta. El conjunto de estas señales inhibitorias es lo que se conoce como proteínas reguladoras del control inmunológico o ICIs. Ya se ha hablado en el apartado 1.4 del eje PD-1/PD-L1 como el más conocido y estudiado en CP al existir anticuerpos monoclonales dirigidos contra esas proteínas convirtiéndose en un pilar fundamental del tratamiento antineoplásico en CP y otros tumores actualmente.

Aunque se sabe que PD-L1 desempeña una función importante en la supresión de la respuesta inmunitaria, su valor pronóstico aún se está discutiendo y su papel en el MAT aún no se ha dilucidado por completo<sup>126</sup>. De hecho, la expresión de PD-L1 por IHQ es particularmente controvertida como biomarcador de ICIs debido a resultados

discordantes en investigaciones recientes<sup>127</sup>. A pesar de que algunos estudios encontraron una fuerte correlación entre la expresión alta de PD-L1 y un peor pronóstico<sup>128</sup> y la respuesta al tratamiento después de QT y RT simultáneas<sup>37,129</sup>, sigue habiendo estudios que sugieren que la expresión alta de PD-L1 no tiene importancia pronóstica<sup>130</sup>. Esto va en línea con la evidencia reciente<sup>131</sup> donde se concluye que la expresión de PD-L1 está influenciada por el estadio del tumor, con la limitación que esto supone como indicador predictivo y pronóstico.

La incidencia de expresión de PD-L1 en pacientes con CPNCP resecables es relativamente menor en comparación con pacientes con un estadio más avanzado. Este hecho también es consistente con el bajo porcentaje de valores elevados de PD-L1 observados en nuestra población. Al respecto, Tuminello *et al.*<sup>126</sup> también concluyeron que las características de los pacientes, como el sexo y el estadio, pueden influir tanto en la composición inmunitaria del MAT como en la supervivencia posquirúrgica y, por lo tanto, pueden distorsionar su verdadera relación. Más recientemente, datos analizados por el grupo alemán<sup>132</sup> también han confirmado que la expresión tumoral de PD-L1 no parece afectar el pronóstico del CP en etapa temprana. La disparidad en los resultados entre los estudios puede explicarse por la falta de estandarización de las diversas técnicas analíticas disponibles (es decir, el uso de diferentes anticuerpos, plataformas y umbrales de corte) y la variación entre observadores<sup>133</sup>.

Por otro lado, hay muchos esfuerzos centrados en la búsqueda de biomarcadores predictivos de respuesta a los fármacos ICIs. Algunos biomarcadores potenciales que se han propuesto son la infiltración de linfocitos T que, como ya veíamos arriba precisa de más investigación, la carga mutacional o la expresión de PD-L1.

Por el momento, esta última, es la única que ha demostrado ser útil en la selección de pacientes diagnosticados de CPNCP. La expresión de PD-L1 ha sido el primer biomarcador predictivo de respuesta incorporado en la práctica clínica para dirigir el uso de fármacos anti-PD-1/PD-L1 en algunos escenarios clínicos. No obstante, es un biomarcador imperfecto: una mayor expresión se correlaciona generalmente con una mayor probabilidad de respuesta/beneficio clínico; sin embargo, ni su expresión elevada garantiza la respuesta, ni la falta de expresión garantiza la ausencia de beneficio y, por tanto, no puede usarse para excluir del tratamiento con estos fármacos a pacientes sin expresión, salvo contadas excepciones, asociados principalmente al diseño de los ensayos clínicos<sup>134</sup>. El valor predictivo puede depender también de la histología tumoral.

En el CPNCP se ha estudiado ampliamente el valor predictivo de la expresión de PD-L1, observando asociación con la SG en los pacientes tratados con distintos inhibidores de PD-1/PD-L1 en monoterapia<sup>135</sup>.

El desarrollo clínico y la aprobación de los distintos fármacos se ha realizado en base a distintas pruebas diagnósticas para la cuantificación de la expresión de PD-L1. Las diferencias críticas entre estas pruebas derivan del uso de distintos resultados, el

estudio del marcador en diferentes tipos celulares y compartimentos tisulares, así como el umbral de positividad de tinción definido en cada estudio<sup>136</sup>.

En el momento actual, y a falta de que un mejor conocimiento de la biología de la interacción PD-1/PD-L1 que permita el desarrollo de nuevos test de valoración, la determinación de ausencia o presencia de expresión de PD-L1 en las membranas celulares se sigue realizando mediante técnicas IHQ efectuadas sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina (Brahmer 2012<sup>137</sup>, Topalian 2012<sup>138</sup>, Taube 2014<sup>139</sup>). Algunos estudios valoran la presencia o ausencia de expresión de PD-L1 únicamente en las células neoplásicas, mientras que otros valoran también la positividad para dicho marcador en los TILs y en los macrófagos asociados al tumor (TAMs)<sup>138,140-144</sup>; de hecho, en uno de los ensayos la mayor tasa de respuesta objetiva al tratamiento se encontró en la cohorte con porcentajes de positividad más altos en los TILs<sup>142</sup>. En todos los ensayos los anticuerpos han sido evaluados sobre muestras de tejido; ninguno de ellos ha validado sus resultados en muestras citológicas, en las que, entre otras dificultades, sería difícil valorar resultados en el componente de células inmunes asociadas al tumor<sup>145</sup>.

En el caso de los anticuerpos anti-PD-L1, cada uno de ellos identifica diferentes epítomos de la molécula dependiendo del clon utilizado, pudiendo estar dirigidos frente a su dominio extracelular (SP263, 22C3 y 28-8) o intracelular (E1L3N y SP142)<sup>146</sup>. El empleo de clones diferentes puede, por tanto, dar resultados diferentes<sup>145</sup>. La tinción puede además verse modificada en virtud del sistema químico de visualización utilizado. Por todo ello, en cada test el uso de un determinado clon lleva aparejada la utilización de un test de detección IHQ concreto a la hora de valorar la positividad o negatividad del tejido tumoral para dichos antígenos. Como en cualquier otro estudio IHQ, el estado de conservación y fijación del tejido, su manipulación y procesamiento previos, incluyendo la fase de desenmascaramiento antigénico, son factores muy importantes en la valoración del resultado final.

### 2.6.3 TGF- $\beta$

El TGF- $\beta$  es una potente citoquina pleiotrópica, con propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias. En condiciones fisiológicas, el TGF- $\beta$  tiene un papel bien documentado en la embriogénesis, la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la adhesión y la invasión<sup>147</sup>. Se han identificado tres isoformas: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3.

El papel del TGF- $\beta$  en el cáncer es complejo y paradójico, y varía según el tipo de célula y el momento de la carcinogénesis. En etapas tempranas, el TGF- $\beta$  actúa como un supresor de tumores, inhibiendo la progresión del ciclo celular y promoviendo la apoptosis. Más tarde, el TGF- $\beta$  favorece la invasión y la metástasis al inducir la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT)<sup>148</sup>. En la inducción del cáncer, el TGF- $\beta$

ejerce un efecto supresor de tumores a través de la regulación al alza del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (CDKI) p21 y la regulación a la baja de c-Myc<sup>149</sup>. Usando modelos murinos en los que se ha estudiado la ruta de señalización de TGF- $\beta$  se encontró que, los epitelios altamente proliferativos (como el rectal y el genital), desarrollaron carcinomas de células escamosas espontáneos en ausencia del receptor T $\beta$ RII para TGF- $\beta$ . Además, en este trabajo se describió una progresión acelerada del carcinoma, mutaciones de Ras y reducción de la apoptosis<sup>150</sup>, lo que sugiere que una vía TGF- $\beta$  deficiente contribuye a la carcinogénesis.

Existe evidencia consistente que demuestra que los cambios de señalización de TGF- $\beta$  están involucrados en el desarrollo de cáncer humano. Se ha observado un aumento del ARNm y la proteína de TGF- $\beta$ 1 en el carcinoma gástrico, el CPNCP y el cáncer colorrectal y de próstata<sup>151</sup>, y la delección o mutaciones del receptor de TGF- $\beta$  se han asociado con el cáncer colorrectal, de próstata, de mama y de vejiga, lo que se correlaciona con un carcinoma más invasivo y avanzado, mayor grado de invasión y peor pronóstico<sup>152</sup>.

En el MAT, las fuentes comunes de TGF- $\beta$  son las células cancerosas y las del estroma, incluidas las células inmunitarias y los fibroblastos<sup>153</sup>. La matriz ósea también es una fuente abundante de TGF- $\beta$  y un sitio común para la metástasis en muchos cánceres, lo que se correlaciona con los efectos invasivos y promotores de tumores de esta citoquina<sup>154</sup>.

La terapia específica dirigida a esta citoquina en pacientes con cáncer avanzado ha mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos y clínicos, usando inhibidores de TGF- $\beta$ , específicamente trampas de ligando, oligonucleótidos antisentido, inhibidores de receptor quinasa y aptámeros peptídicos. Sin embargo, se han documentado efectos secundarios graves debido a la administración sistémica de inhibidores de TGF- $\beta$ , lo que indica que se requieren más ensayos clínicos para evaluar terapias localizadas, seguras y de dosis efectiva<sup>154</sup>.

La expresión de TGF- $\beta$  en las células tumorales, no tiene aún un método estandarizado. En el apartado 5.4 se desarrolla cómo se ha realizado este análisis en nuestra muestra.

En este contexto, la expresión de TGF- $\beta$  ha surgido como un posible mecanismo desencadenante de las diferentes respuestas a los ICIs. Así, la inhibición del TGF- $\beta$  afecta a la producción de células T reguladoras y puede aumentar potencialmente el efecto de los inhibidores de PD-1/PD-L1. De hecho, hay ensayos clínicos que demuestran la seguridad y la actividad de los enfoques terapéuticos dirigidos simultáneamente a las vías PD-1/PD-L1 y TGF- $\beta$ , y ya se han publicado los primeros datos prometedores a este respecto<sup>155</sup>. Estas pruebas sugirieron la importancia de la expresión de TGF- $\beta$  en el CP y, por tanto, su posible uso como biomarcador pronóstico y predictivo de esta enfermedad. Además, el TGF- $\beta$  desempeña un papel importante en la alteración de las células cancerosas epiteliales tempranas a células cancerosas metastásicas invasivas mediante la promoción de la EMT<sup>156</sup>, y recientemente se ha

afirmado que su alta expresión podría predecir significativamente un mal pronóstico en pacientes con CPNCP, ya que también estimula la angiogénesis e induce la inmunosupresión<sup>157</sup>.

Igual que ocurre con la subclasificación histológica y los TIL, estos hallazgos sobre el papel de TGF- $\beta$  en el CPNCP aún están en fase de investigación y aún no se están utilizando en la asistencia práctica para tomar decisiones terapéuticas.



## CAPÍTULO 3. MUTACIÓN ACTIVADORA DE EGFR EN CPNCP

*Al ser la primera diana terapéutica con tratamiento eficaz en CPNCP ha servido de guía y estímulo para el estudio y desarrollo del resto de alteraciones moleculares. En este capítulo se desarrollará la importancia de esta mutación en el CPNCP y su repercusión diagnóstico-terapéutica en estos últimos años. Se entenderá así el interés por conocer el posible impacto de esta característica molecular en los estadios iniciales de esta patología.*

### 3.1 AVANCES EN BIOLOGÍA MOLECULAR EN CP

Gracias a la investigación en biología molecular, a lo largo de las últimas décadas se han identificado genes con un papel clave en la carcinogénesis pulmonar<sup>158</sup>. Conforme se han descrito diferentes alteraciones genéticas asociadas al desarrollo de CPNCP, se han formado subgrupos genéticamente definidos de acuerdo con la frecuencia de dichas alteraciones. El desarrollo de las terapias dirigidas ha demostrado, además, que esta división según sus características moleculares es una estrategia terapéutica adecuada, ya que hay inhibidores específicos dirigidos contra los productos de estas alteraciones genéticas cuya eficacia ha sido o está siendo probada en ensayos clínicos<sup>159</sup>.

Por tanto, en los pacientes con CPNCP avanzado es necesaria no solo la información anatomopatológica sino también el resultado de biomarcadores predictivos. Hoy en día se recomienda en todas las guías clínicas<sup>9,57</sup> el estudio de las mutaciones de EGFR, de la translocación de ALK, el reordenamiento de ROS1 y la mutación de BRAF en pacientes con CPNCP no escamoso estadio IV independientemente del hábito tabáquico, y en los no fumadores independientemente de la histología. Últimamente se han añadido RET (*rearranged during transfection*), MetEx 14 (*mesenchymal epithelial transition factor exon 14*) y KRAS (*kirsten rat sarcoma virus*). Además, en todas las histologías independientemente del hábito tabáquico se recomienda analizar la expresión de PD-L1 y NTKR (*neurotrophic tyrosine receptor kinase*)<sup>8</sup>.

Este capítulo se centrará en la mutación activadora de EGFR en CPNCP. El éxito sin precedentes del tratamiento de CPNCP avanzado con fármacos ITK en pacientes portadores de mutaciones en EGFR ha servido de guía y ha hecho evidente la necesidad de definir molecularmente subgrupos de pacientes con CPNCP.



### 3.2 CAPACIDAD ONCOGÉNICA LIGADA A LA ACTIVACIÓN DE EGFR

EGFR es uno de los cuatro componentes de la familia de receptores de la tirosina quinasa ErbB, que incluye a su vez a Erb-2/HER2, ErbB-3 y ErbB-4. Estructuralmente cada uno de estos receptores está compuesto de una porción extracelular o dominio de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio intracelular. Estos receptores sufren procesos de homodimerización y heterodimerización tras la unión extracelular de un ligando, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*) o el factor- $\alpha$  transformador del crecimiento (TGF- $\alpha$ , *transforming growth factor alpha*), que en último término llevan a la autofosforilación y la consiguiente activación tirosina quinasa y la estimulación de vías de señalización intracelular que dan lugar a proliferación celular, protección frente a la apoptosis, y mayor supervivencia y transcripción génica<sup>160</sup> (figura 5). Tanto las células neoplásicas como las normales dependen de las señales mediadas por EGFR, en las células normales esta ruta se encuentra estrictamente regulada, no ocurre lo mismo en las células tumorales que muestran lo que se ha denominado “adicción” a esta ruta.

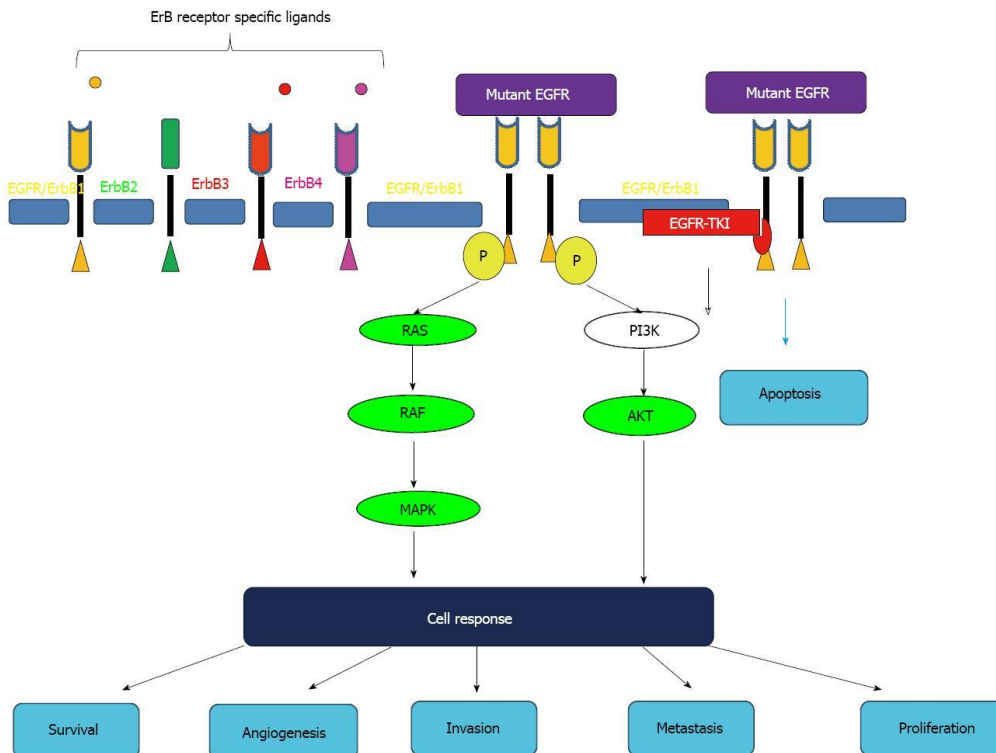


Figura 5: Familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico

Fuente: *Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer. World J Clin Oncol 2014*<sup>161</sup>

Los mecanismos que confieren capacidad oncogénica ligada a la activación de EGFR son numerosos y se han descrito con frecuencia en distintos tipos de tumores sólidos. En el CPNCP las anomalías observadas en EGFR incluyen sobreexpresión,

amplificación y mutación del receptor. Aunque la expresión de EGFR es un hecho frecuente en el CPNCP (30-75%), no puede considerarse como un factor predictivo de beneficio clínico con los ITK. De igual modo, el gran número de copias de EGFR determinado por FISH, observado hasta en el 30% al 45% de los CPNCP, no ha mostrado resultados concluyentes como factor predictivo para el tratamiento con ITK<sup>162</sup>.

Sí se ha demostrado este valor predictivo para las mutaciones somáticas de EGFR, conocidas como mutaciones activadoras (actEGFRm), que inducen una activación de la actividad tirosina quinasa del receptor dependiente de la unión al ligando, que resulta en la puesta en marcha de vías de señalización intracelular potencialmente oncogénicas. Estas mutaciones fueron identificadas por primera vez en 2004<sup>163,164</sup>.

### 3.3 MUTACIONES ACTIVADORAS DE EGFR (ACTEGFRM)

Las actEGFRm se han reportado en 10%-15% de pacientes caucásicos, pero en hasta 60% de poblaciones asiáticas seleccionadas con CPNCP (mujeres, nunca fumadoras y ADC)<sup>165</sup>. En una revisión de Mitsudomi *et al.*, de más de 2800 pacientes con mutaciones EGFR, se observó que estas mutaciones se asociaban claramente con la raza (32% asiáticos frente a 7% caucásicos), el sexo (38% mujeres frente a 10% hombres), el hábito tabáquico (47% no fumadores frente a 7% fumadores) y el subtipo histológico (30% ADC frente a 2% otros subtipos histológicos)<sup>166</sup>. Estas mutaciones se han descrito de forma anecdótica en otros subtipos histológicos, como carcinoma de células escamosas y el carcinoma microcítico.

Se trata también de la primera alteración molecular descrita con frecuencia en los no fumadores en comparación con los fumadores. Así, la presencia de esta mutación es inversamente proporcional al consumo acumulado de tabaco. Estos hallazgos sugieren que los tumores con mutación EGFR en los pacientes no fumadores ocurren por mecanismos alternativos a los desencadenados por los carcinógenos presentes en el humo de tabaco.

Las mutaciones de EGFR se han detectado en el epitelio de las vías respiratorias normales (43% de pacientes con ADC y actEGFRm)<sup>58</sup>. También se han descrito en lesiones precoces como la hiperplasia atípica adenomatosa<sup>167</sup>. Todo esto indica que las actEGFRm ocurren en momentos precoces de la patogénesis de CP.

Las más frecuentes actEGFRm en CPNCP son deleciones en el exón 19 (EGFRDel19, ≈60%) y mutación puntual L858R en el exón 21 (EGFRL858R, ≈30%). Otras mutaciones menos frecuentes (5%) son las inserciones y las mutaciones puntuales del exón 18 (p. ej., G719S). Además, se han descrito algunas mutaciones asociadas a resistencia a los ITK, entre las cuales la más frecuente es la que ocurre en el exón 20

(T790M). En la tabla 3 pueden verse esquemáticamente las mutaciones más frecuentes, su frecuencia y si están asociadas a sensibilidad a ITK.

Tabla 3: Mutaciones más frecuentes de dominio tirosina cinasa del gen EGFR

<i>Localización</i>	<i>Asociadas a sensibilidad al tratamiento</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Asociadas a resistencia al tratamiento</i>	<i>Frecuencia</i>
EXÓN 18 <sup>a</sup>	<b>G719C</b>	5%		
	<b>G719S</b>			
	<b>G719A</b>			
	V689M			
	N700D			
	E709K/Q			
	S720P			
Exón 19	<b>Del E746_A750</b>	~45%	D761Y	<1%
	Del E746_T751			
	Del E746_T750 (ins R/P)			
	Del E746_T751 (ins A/I)			
	Del E746_T751 (ins VA)			
	Del E746_S752 (ins A/V)			
	Del L747_E749 (A750P)			
	Del L747_A750 (ins P)			
	Del L747_T751			
	Del L747_T751 (ins P/S)			
	Del L747_S752			
	Del L747_752 (E746V)			
	Del L747_752 (P753S)			
	Del L747_S752 (Ins Q)			
	Del L747_P753			
Del L747_P753 (ins S)				
Del S752_I759				
Exón 20	V765A <sup>a</sup>	<1%	<b>T790M (50%)</b>	~5%
	T783A <sup>a</sup>		D770_N771 <sup>a</sup> (ins NPG)	
			D770_N771 <sup>a</sup> (ins SVQ)	
			D770_N771 <sup>a</sup> (insG)	
			V769L <sup>a</sup>	
			S768I <sup>a</sup>	

Exón 21	<b>L858R</b>	~45%		
	L861Q <sup>a</sup>			
<sup>a</sup> La evidencia clínica de la sensibilidad o de la resistencia que confieren estas mutaciones es limitada.				

Fuente: García-Foncillas et al. Rev Esp Patol. 2011; 44:17-31<sup>168</sup>

Los pacientes con CPNCP con actEGFRm se vuelven aparentemente dependientes de la actividad de EGFR para estimular rutas de señalización para mantener el fenotipo maligno ("adicción al oncogén"). Por lo tanto, el bloqueo de las vías de la familia de EGFR/HER con ITK puede suprimir la proliferación de células tumorales e iniciar la apoptosis.

### 3.4 TRATAMIENTO CON ITK ANTI-EGFR EN CP AVANZADO

En la última década, la familia EGFR/HER se ha convertido en un objetivo terapéutico potencial que ha cambiado en gran medida el paradigma de tratamiento para pacientes con CPNCP. Actualmente están aprobados 5 fármacos (gefitinib, erlotinib, afatinib, dacomitinib y osimertinib) para su uso en el tratamiento de primera línea de CPNCP metastásico con actEGFRm (EGFRD<sub>el19</sub> y EGFR<sub>L858R</sub>), según los resultados de varios ensayos clínicos que demuestran que estos ITK son superiores a la QT estándar en términos de seguridad, eficacia y calidad de vida<sup>169</sup>. Desde la introducción de la primera generación EGFR/HER-ITK (gefitinib y erlotinib), han surgido una segunda generación (afatinib, dacomitinib y neratinib) y una tercera generación (osimertinib, rociletinib)

Los de segunda generación mejoraron de manera similar la SG de pacientes con actEGFRm pero no superaron la resistencia adquirida a EGFR<sub>T790M</sub> que aparecía en el transcurso del tratamiento con ITK en aproximadamente el 50% de los pacientes con resistencia. Los ITK de tercera generación están selectiva e irreversiblemente dirigidos a la mutación EGFR<sub>T790M</sub> y actEGFRm. Parecen eficaces para pacientes resistentes a ITK con mutaciones EGFR<sub>T790M</sub> y, de hecho, ha sido su primera aprobación, como tratamiento de segunda línea en caso de resistencia adquirida T790M.

Esta mutación del exón 20, descrita en un principio como mutación de resistencia adquirida, podría estar involucrada en algunos mecanismos de resistencia primaria, al estar presente desde el momento inicial del desarrollo tumoral, con una frecuencia muy superior a la reportada inicialmente (puede llegar hasta un 35% en estudios publicados)<sup>170</sup>.

Existen descritas más mutaciones resistentes a ITK: inserciones en el exón 20 (insG, insSVQ) y diferentes mutaciones del exón 19 (D761Y y T854A), entre otras. El incremento constante en el conocimiento de las distintas variantes de mutaciones de EGFR ha puesto de manifiesto que las diversas mutaciones confieren distinta susceptibilidad al tratamiento con ITK. Análisis retrospectivos evidencian que erlotinib y gefitinib son más eficaces en SLP y SG en aquellos pacientes con delección del exón 19, en comparación con los que presentan mutación del exón 21<sup>171</sup>. Datos que se han repetido en los ensayos con los ITK de segunda generación como afatinib<sup>172</sup>.

### 3.5 DATOS SOBRE ADYUVANCIA CON ITK ANTI-EGFR

El descubrimiento de las mutaciones de EGFR y su alto valor predictivo de la respuesta a ITK ha supuesto un avance histórico en el tratamiento del CPNCP avanzado. Por este motivo, han sido múltiples hasta la fecha los estudios encaminados a buscar eficacia de estos avances en CPNCP estadio inicial<sup>173</sup>. Se tiene un alto interés científico y clínico en conocer si actEGFRm es factor de buen pronóstico en CPNCP intervenido y si el tratamiento adyuvante con ITK tras cirugía aporta beneficio en SG y SLE.

En 2012<sup>174</sup> se publicaron los datos del *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* con 1118 pacientes intervenidos de CPNCP y tratados de forma asistencial o dentro de ensayo con ITK adyuvante durante dos años si tenían actEGFRm. En este estudio se concluye que los pacientes con CPNCP estadio I-III resecaos y actEGFRm tienen un menor riesgo de muerte en comparación con los pacientes sin mutación de EGFR. Esto podría deberse al tratamiento con EGFR-ITK. Los autores, afirman que debería plantearse la realización del estudio de mutaciones de EGFR en los ADC pulmonares resecaos para proporcionar información pronóstica e identificar a los pacientes para el reclutamiento en ensayos clínicos prospectivos de ITK adyuvantes.

En 2014<sup>175</sup> se publican los datos de una serie de 354 pacientes de Obha y colaboradores que afirman que la presencia de actEGFRm fue un factor predictivo de la respuesta al tratamiento con EGFR-ITK en pacientes con ADC en estadio I resecao, pero no fue un factor pronóstico. Sin embargo, la presencia de una mutación del gen K-RAS fue un factor de mal pronóstico.

En 2017<sup>176</sup> los datos retrospectivos de más de 900 pacientes intervenidos de CPNCP (ADC también) concluyen que actEGFRm es un factor pronóstico favorable en pacientes con ADC pulmonares resecaos quirúrgicamente; pero los subtipos de mutación de EGFR (mutación del exón 21 L858R o eliminación del exón 19) no muestran impacto pronóstico. Este artículo de Takamochi y su equipo, refleja las limitaciones que tiene esta conclusión; ser un estudio retrospectivo, realizado en un único centro y con la posible influencia del tratamiento con ITK en los pacientes con recaídas posquirúrgicas.

Por tanto, considerando estas series comentadas y otras similares no queda claro aún, si la presencia de actEGFRm en un CPNCP intervenido es un factor pronóstico independiente favorable o si su influencia en la SG y SLE se debe a la eficacia de ITK utilizados en el contexto de la adyuvancia o a una posterior recaída.

Uno de los primeros estudios prospectivos sobre adyuvancia con ITK en CPNCP fue el RADIANT<sup>177</sup> que se publicó en 2015. El reclutamiento se realizó entre 2007 y 2010. Se utilizó como marcador predictivo de respuesta a ITK la sobreexpresión o amplificación de EGFR; dichos marcadores no han mostrado resultados concluyentes como factor predictivo para el tratamiento con ITK<sup>162</sup>. Sus conclusiones, por tanto, -que erlotinib adyuvante durante 2 años no aumenta la SLE en pacientes con CPNCP que expresan EGFR- confirman que la sobreexpresión o amplificación de EGFR no son marcadores predictivos de respuesta.

En un estudio paralelo (SELECT, fase II)<sup>178</sup> se trataron 100 pacientes con CPNCP en estadio IA-IIIa con actEGFRm con erlotinib 150 mg/día durante 2 años después de completar la QT adyuvante estándar y/o RT. Se concluye que la SLE mejora en los pacientes tratados 2 años con erlotinib en comparación con los controles de genotipo coincidentes históricos. Las recurrencias son poco frecuentes en estos pacientes y la mayoría ocurre en los 12 meses después de la interrupción, lo que sugiere que una mayor duración del tratamiento adyuvante puede ser beneficioso. Los casos recurrentes después de tratamiento con el ITK permanecen generalmente sensibles a EGFR TKI. Al ser un estudio fase II sin rama control experimental, tampoco determinó si debía incluirse la adyuvancia con ITK en pacientes con actEGFRm intervenido.

En enero 2018 se publicaron los datos de un estudio prospectivo<sup>179</sup> en el que se seleccionaron 483 pacientes (entre el 19 de septiembre de 2011 y el 24 de abril de 2014); de los que 222 pacientes fueron asignados al azar, 111 a gefitinib (24 meses) y 111 a vinorelbina más cisplatino adyuvante (4 ciclos). El objetivo era comparar la eficacia del gefitinib adyuvante versus vinorelbina más cisplatino en pacientes con CPNCP con actEGFRm en estadio II-IIIa (N1-N2) completamente reseca. La interpretación de los resultados es que gefitinib adyuvante dio lugar a una SLE significativamente mayor en comparación con la de QT estándar en estos pacientes (28,7 meses versus 18 meses). Con base a este resultado, la toxicidad reducida y mejor calidad de vida, gefitinib adyuvante podría ser una opción de tratamiento potencial en comparación con la QT adyuvante en estos pacientes. Sin embargo, la duración del beneficio con gefitinib después de 24 meses podría ser limitada y los datos de SG aún no eran concluyentes.

El ensayo clínico prospectivo fase III ADAURA<sup>180-182</sup> pretende dar respuestas sobre la adyuvancia con un ITK de tercera generación: osimertinib. En este estudio los pacientes intervenidos (IB a IIIa) con actEGFRm fueron aleatorizados 1:1 para recibir osimertinib o placebo durante 3 años. La QT adyuvante antes de la aleatorización no era obligatoria, según la elección del médico y del paciente. En 2022 se han presentado los

siguientes datos, teniendo en cuenta el análisis preespecificado y exploratorio del uso de QT adyuvante<sup>183</sup>: 410 de 682 pacientes (60 %) recibieron QT adyuvante (osimertinib, n = 203; placebo, n = 207) durante una mediana de 4,0 ciclos. El uso de QT adyuvante fue más frecuente en pacientes: menores de 70 años (338 de 509; 66%) versus mayores o iguales a 70 años (72 de 173; 42%); con estadios II a IIIA (352 de 466; 76 %) versus estadio IB (57 de 216; 26 %); y se inscribieron en Asia (268 de 414; 65 %) versus fuera de Asia (142 de 268; 53 %). Se observó un beneficio de SLE a favor de osimertinib versus placebo en pacientes con (cociente de riesgos instantáneos de SLE = 0,16, intervalo de confianza del 95 %: 0,10-0,26) y sin QT adyuvante (cociente de riesgos instantáneos = 0,23, intervalo de confianza del 95 %: 0,13-0,40), independientemente de la etapa de la enfermedad. Por tanto, estos hallazgos respaldan que osimertinib adyuvante se considere un tratamiento eficaz para los pacientes con CPNCP en estadios IB a IIIA EGFRm tras la cirugía, con o sin QT adyuvante previa.

Los datos para SG aún son incipientes, pero la consistencia de mejoría en SLE ha hecho que osimertinib se posicione en la adyuvancia del CPNCP EGFRm. Además, se refuerza lo dicho con los datos de calidad de vida relacionada con la salud (HRQoL) del estudio ADAURA, también publicados recientemente<sup>184</sup>.

Con lo repasado hasta aquí, se puede decir que no existe información certera sobre actEGFRm como factor pronóstico y sí como factor predictivo de respuesta; incluso en adyuvancia, mejorando con creces la SLE de los pacientes intervenidos que presentan esta alteración molecular.



## CAPÍTULO 4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

*Como ya se ha ido explicando, este trabajo de Tesis Doctoral se plantea para estudiar el impacto en la práctica clínica habitual de diversos factores pronósticos en CPNCP intervenidos en el HUIJ durante un periodo de 4 años completos.*

*Conocer la realidad clínica, histológica, molecular y terapéutica de estos pacientes desde un punto de vista científico permitirá aplicar los nuevos avances que se esperan en los próximos años y ayudará a entender qué alcance real tendrán éstos en nuestro medio.*

*A continuación, se enuncia la hipótesis del trabajo y los objetivos del mismo.*

### 4.1 HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Aparte del TNM, las características histológicas, el MAT y las alteraciones moleculares influyen en la SLE y en la SG de los pacientes con CPNCP, también en estadios iniciales, no sólo en avanzados y, por tanto, es importante incluir estos datos en el manejo asistencial del CPNCP estadio inicial.

### 4.2 OBJETIVOS

Nuestro trabajo consiste en estudiar aquellos pacientes operados de CPNCP en nuestro centro en el intervalo 2010-2013 (4 años completos) con los siguientes objetivos de interés observacional, clínico e investigacional:

- Describir las características histológicas, clínicas y de estadio de los pacientes operados en este periodo de tiempo.
- Verificar la capacidad pronóstica del TNM en nuestro medio.
- Analizar la existencia de nuevos factores pronósticos del MAT y su implicación pronóstica:
  - ✓ infiltrado linfoide tumoral (TIL: *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*),
  - ✓ expresión de PD-L1
  - ✓ TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* )
- Analizar las mutaciones de EGFR en todos los pacientes no fumadores, exfumadores de más de 15 años y en todos los no escamosos (como se haría en CPNCP avanzado), determinar la frecuencia de estas mutaciones y su implicación pronóstica.
- Analizar los tipos de recidiva, su relación con la SG y la SLE.





## CAPÍTULO 5. PACIENTES Y MÉTODOS

*A continuación, se describe nuestra población de estudio, los métodos utilizados y el estudio estadístico realizado.*

*La población de estudio analizada está constituida por 94 pacientes valorados en la Unidad de Oncología Médica del HUI con CPNCP que han sido intervenidos entre 2010-2013, es decir, que eran resecables y, por tanto, estadios iniciales de CPNCP; aparte de operables.*

### 5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN-EXCLUSIÓN Y RECOGIDA DATOS

El criterio de inclusión ha sido: CPNCP estadios iniciales intervenidos entre 2010-2013 de la provincia de Jaén que posteriormente continuaran seguimiento en nuestro centro hospitalario para poder acceder a toda la información clínica prevista en la base de datos. El único criterio de exclusión, por tanto, era no tener acceso a ninguna información de su historia clínica. Podemos asegurar que la muestra es prácticamente completa, es decir, todos los casos de la provincia intervenidos en esos 4 años.

Toda la información ha sido recogida en el sistema informático de historia clínica del SAS (Sistema Andaluz de Salud): Diraya. Las variables principales recogidas se enumeran en la tabla 4.

Tabla 4: Variables recogidas de toda la población de estudio

<i>Edad al diagnóstico</i>		
<i>Sexo</i>		
<i>Antecedente familiar</i>	CP	
	Otros antecedentes familiares	Cáncer mama
		Cáncer de colon
		Otros
<i>Características clínicas</i>	Fumador al diagnóstico	Sí -paquetes/año-
		No
		Exfumador
	HTA	
	Diabetes	

<i>Características clínicas</i>	Cardiopatía isquémica	
	Obesidad	Si
		No
		Desconocido
	Otros tumores	Previo o sincrónico
	Primer síntoma	Tos
		Síndrome constitucional
		Infección respiratoria
		Dolor
		Otros
<i>Tipo de cirugía</i>	Resección atípica	
	Lobectomía (LSD, LM, LID, LSI, LII)	
	Neumonectomía derecha	
	Neumonectomía izquierda	
<i>Hispatología de la pieza</i>	ADC	
	Epidermoide	
	Células Grandes	
	Otros	
	Grado histológico	Indiferenciado
		Moderado
		Bien diferenciado
	Necrosis tumoral	Intensa
		Moderada
		Ausente
	Invasión linfovascular	Presente
		Ausente
	Tamaño	Mayor de 4cm
Menor de 4cm		
<i>TIL</i>	Intenso	
	Moderado	
	Leve	
	Ausente	

<i>EGFR</i>	Negativo	
	Desconocido	
	Mutado	
<i>Estadíaje patológico definitivo según la séptima clasificación TNM</i>		
<i>Tratamiento adyuvante realizado</i>	QT	Adyuvante
		Neoadyuvante
	Radioterapia	

En una segunda fase del estudio, en 55 pacientes con muestras disponibles, se analizó la presencia de TIL, expresión de PD-L1 y TGF- $\beta$ .

Se han recogido datos evolutivos hasta el 30 de junio de 2018 por lo que la mediana de seguimiento es de 5 años. No sólo se ha señalado la fecha de defunción, sino también de recidiva y si esta es local o a distancia. Aparte de recoger segundos tumores en los casos que se han presentado.

## 5.2 COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

Al tratarse de un estudio retrospectivo sin repercusión clínica ni práctica en los pacientes, se ha tenido en cuenta el consentimiento firmado por el paciente previamente a su intervención quirúrgica donde expresamente se le pide autorización para *la conservación y utilización posterior de sus muestras biológicas para investigación relacionada directamente con la enfermedad que padece*. No se consideró, por tanto, necesaria la repetición personalizada de otro consentimiento informado.

Con estas condiciones, este proyecto tiene un informe favorable previo al inicio de recogida de datos por parte del Comité de Ética de la Investigación de la provincia de Jaén, actualizado con un *dictamen favorable a la modificación* en julio 2020 (código: 8.2.2.09.2014). En el anexo pueden consultarse ambos certificados y el documento de consentimiento informado para resección pulmonar.

## 5.3 CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN

El 83% de la población son hombres (78 pacientes), quedando entonces un 17% de mujeres. La media de edad está en 63,8 años.

Hasta un 80% tienen algún tipo de antecedente familiar oncológico, aunque sólo un 8,5% (8 pacientes) está relacionado con CP.

El 90,4% de los pacientes han sido fumadores en algún momento y 46 pacientes (48,9% de la población del estudio) fumaban al diagnóstico; tan sólo 9 pacientes (9,6%) son no fumadores reales.

En cuanto a diagnóstico previo de EPOC hasta un 46,8% estaban diagnosticados de algún grado de EPOC; siendo severo en 9 pacientes (9,6%) y no EPOC conocido en 50 pacientes (53,2%).

Si hablamos de otros procesos neoplásicos: 5 pacientes lo habían tenido previamente al diagnóstico de CPNCP, dos pacientes lo tuvieron de forma sincrónica (ambos de vejiga) y hasta 12 pacientes fueron diagnosticados de un tumor posterior al tratamiento de su CPNCP, 50% de éstos se trató de un 2º primario de pulmón. Les dedicaremos un apartado específico por su relevancia.

La mayoría de los pacientes se diagnosticaron por un hallazgo casual en radiografía de tórax realizada por otro motivo, hasta un 53,2% (50) de los pacientes. De éstos, un 34% (17 pacientes) en el seguimiento de su EPOC. En cuanto a síntomas que se recogen en la primera visita, destacan: tos (24,5%), infección respiratoria (24,5%), disnea 14,9%, dolor (9,6%) y síndrome constitucional, que tan sólo se objetiva en un paciente (1,1%).

La situación basal del paciente en la primera visita era, en general, muy buena. Hasta un 87,2% presentaban un ECOG 0 (escala de estado basal de la *Eastern Cooperative Oncology Group*) y el resto se tipificó como ECOG 1<sup>185</sup>.

El 53,2% (50 pacientes) son diagnosticados histológicamente antes de la intervención, la mayoría (82%) por fibrobroncoscopia que, teóricamente, se realiza en todos los pacientes antes de la cirugía.

En la tabla 5 se puede ver un resumen de las características más importantes de nuestra población:

Tabla 5: Características de la población de estudio

<i>CARACTERÍSTICAS</i>		n (%)
<i>Sexo</i>	Hombre	78 (83%)
	Mujer	16 (17%)
<i>Edad (Media ± DE.)</i>		63,8 (9,85)
<i>Primer síntoma</i>	Tos	23 (24,5%)
	Sd. constitucional	1 (1,1%)
	Infección respiratoria	23 (24,5%)
	Dolor	9 (9,6%)
	Disnea	14 (14,9%)
	Otros	3 (3,2%)

<i>Hallazgo casual</i>	Estudio preoperatorio	10 (10,6%)	
	Seguimiento EPOC	17 (18,1%)	
	Otros	23 (24,5%)	
<i>Hábito tabáquico</i>	No-fumador	9 (9,6%)	
	Fumador	46 (48,9%)	
	Ex-fumador	39 (41,5%)	
<i>EPOC</i>	No	50 (53,2%)	
	Sí- leve	13 (13,8%)	
	Sí-Moderada	22 (23,4%)	
	Sí-Grave	9 (9,6%)	
<i>Cirugía</i>	Resección atípica	7 (7,4%)	
	Bilobectomía	4 (4,3%)	
	Lobectomía superior derecha	31 (33%)	
	Lobectomía media	2 (2,1%)	
	Lobectomía inferior derecha	10 (10,6%)	
	Lobectomía superior izquierda	13 (13,8%)	
	Lobectomía inferior izquierda	8 (8,5%)	
	Neumonectomía derecha	5 (5,3%)	
	Neumonectomía izquierda	14 (14,9%)	
<i>Histología</i>	ADC	Acinar	24 (25,5%)
		Lipídico	5 (5,3%)
		Micropapilar	1 (1,1%)
		Mucinoso	4 (4,3%)
		Papilar	5 (5,3%)
		Sólido	7 (7,4%)
	Escamoso	37 (39,4%)	
	Otros	Adenoescamoso	1 (1,1%)
		Carcinoma célula grande	3 (3,2%)
		Carcinoide	5 (5,3%)
		Carcinoide típico	1 (1,1%)
Sin neoplasia		1 (1,1%)	
<i>Estadio patológico</i>	I	52 (55,3%)	
	II	29 (30,9%)	
	III	12 (12,8%)	

#### 5.4 ESTUDIO HISTOLÓGICO

Las muestras fueron analizadas en primera instancia por la patóloga de referencia en CP de nuestro centro revisando de forma exhaustiva y metódica las características que pretendíamos analizar; siguiendo los criterios patológicos estándar.

#### 5.4.1 Evaluación de la expresión de PD-L1

Se realizó análisis de IHQ (Santa Clara, CA, EE. UU., Dako Autostainer® Link 48) en secciones de 3  $\mu\text{m}$  utilizando el clon 22C3 de Dako. Para evaluar la expresión de PD-L1 se utiliza la puntuación de proporción tumoral (TPS) descrita en el manual de interpretación de PD-L1 IHC 22C3 pharmDx-NSCLC (consultado en junio de 2021)<sup>186</sup>. TPS es el porcentaje de células tumorales viables que muestran cualquier intensidad de tinción parcial o completa de la membrana ( $\geq 1+$ ) con respecto al número total de células tumorales viables presentes en la muestra. Se ha considerado que la expresión de PD-L1 está presente si la TPS  $\geq 1\%$ , y una TPS de  $\geq 50\%$  se definió como alta expresión de PD-L1. Esta interpretación fue realizada por dos patólogos especialistas independientes. Las fotografías de ambas situaciones se muestran en la figura 6.

#### 5.4.2 Evaluación de TIL

La presencia de TIL se analizó al microscopio óptico seleccionando el área infiltrante tumoral representativa teñida con hematoxilina y eosina, y en la que hubiera suficientes células tumorales viables sin necrosis. Se evaluó la densidad de la infiltración linfocítica intratumoral a bajo aumento ( $10\times$ ) y se clasificó en dos categorías, "intensa" y "no intensa". La intensidad alta se definió como una infiltración intensa equivalente a la densidad observada en un ganglio linfático metastásico, como la descrita por Brambilla *et al*<sup>118</sup>. Esta clasificación fue realizada por dos patólogos independientes, y los casos discordantes se consensuaron en un segundo paso. Los infiltrados linfocíticos observados en nuestras muestras eran peritumorales y no se distinguió entre los diferentes tipos de células linfocíticas. En la figura 6 se muestran fotografías de TIL intensos y no intensos.

#### 5.4.3 Evaluación de la expresión de TGF- $\beta$

Se trataron secciones (4 mm) de las muestras de CPNCP fijadas en formol e incluidas en parafina para su desparafinización, rehidratación y recuperación de antígenos mediante procedimientos estándar (reactivos EnVision FLEX, Agilent, Dako). Se utilizaron anticuerpos frente a TGF- $\beta$  (Abcam 190503/1:50 dilución) para la inmunotinción realizada en un sistema automatizado (Autostainer link 48, Dako). Tras la recuperación del antígeno, dos patólogos pulmonares examinaron de forma independiente los portaobjetos obtenidos mediante microscopía óptica. Se realizaron dos evaluaciones de la expresión de TGF- $\beta$  en las células tumorales, dada la ausencia de un método estandarizado para este procedimiento.

En primer lugar, se realizó una evaluación inmunohistoquímica semicuantitativa, como se describió previamente en Xue *et al.* 2011<sup>187</sup> y Huang *et al.* 2014<sup>188</sup>. Teniendo en cuenta la intensidad de la tinción y el número de células positivas, se estableció una

clasificación en cuatro categorías: negativa (-): ausencia total de tinción; débil (+): tinción débil -independientemente del porcentaje de células positivas- o cuando se observa una tinción moderada en  $\leq 30\%$  de las células; moderada (++) : se identifica una tinción moderada en  $>30\%$  de las células o una tinción intensa en  $\leq 50\%$ ; intensa (+++) : tinción intensa en  $>50\%$  de las células.

En segundo lugar, se valoró la tinción nuclear como factor adicional, ya que otros estudios sobre ADC pancreático, como el de Javle *et al.* 2014<sup>189</sup>, consideraron la tinción nuclear como criterio para definir la expresión de TGF- $\beta$  en células tumorales de forma análoga a la interpretación de otros biomarcadores, como el anticuerpo anti-IDH1-R132H en tumores gliales<sup>190</sup>. El análisis de tinción nuclear de TGF- $\beta$ , se llevó a cabo considerando su presencia inequívoca en más del 1% de las células cancerosas viables como positividad de TGF- $\beta$  tumoral (figura 6).

#### 5.4.4 Mutaciones de EGFR

El análisis de mutaciones de EGFR se ha realizado en el laboratorio del Hospital Virgen del Rocío siguiendo la técnica *Kit Therascreen* con la que se analizan mediante PCR en tiempo real mutaciones a nivel de los exones 18, 19, 20, 21 del gen EGFR.



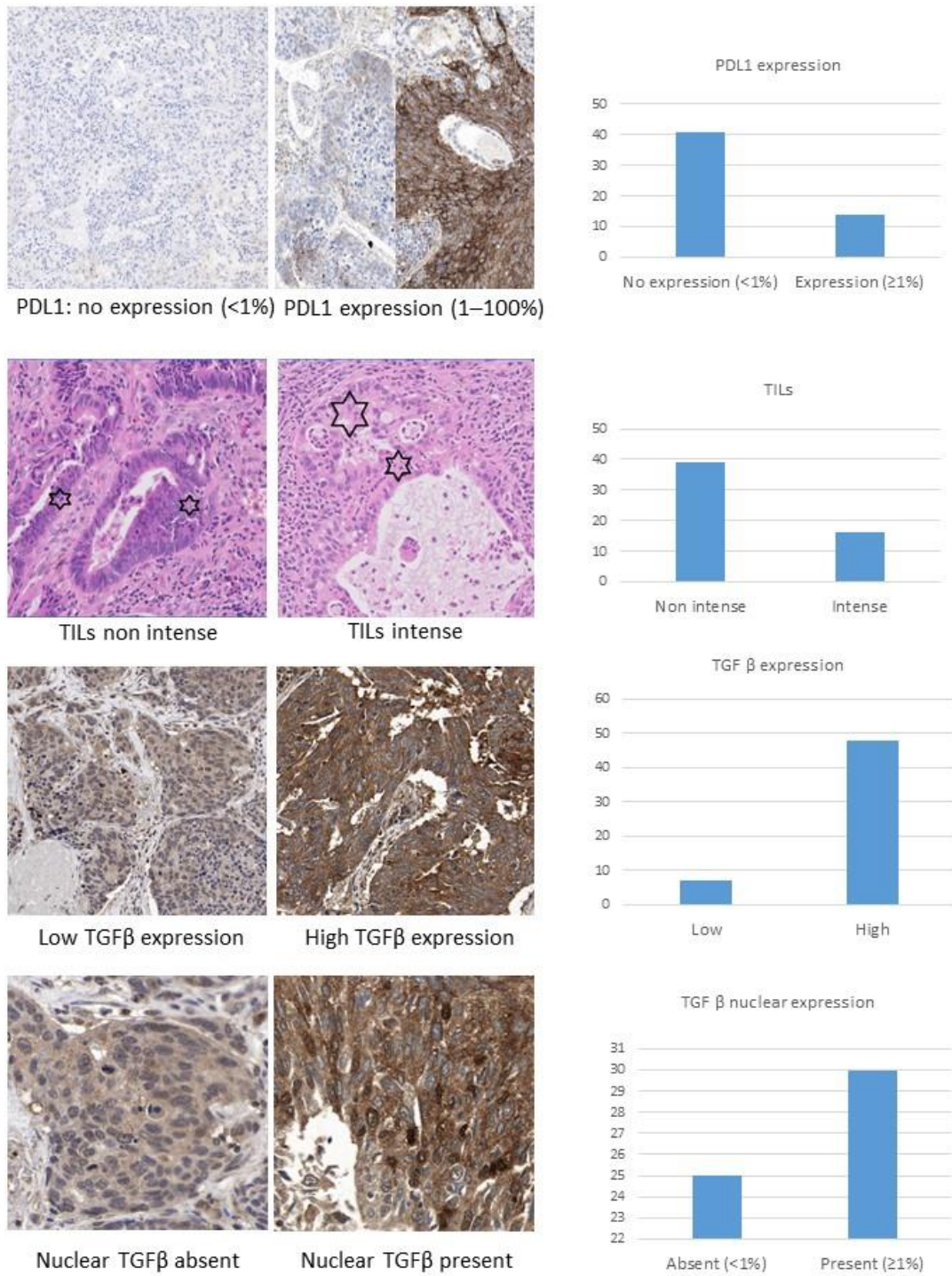


Figura 6: Algoritmo histológico de evaluación de expresión de PD-L1, TILs y TGF-β en nuestra muestra y distribución de frecuencias para dichos biomarcadores. Las estrellas de seis puntas muestran los linfocitos intraepiteliales. Todas las imágenes están representadas a 20× (zoom digital) excepto la tinción nuclear de TGF-β (40×).

## 5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos recogidos sobre las variables dependientes e independientes mencionadas en este estudio se han registrado en una base de datos anonimizada, construida para tal fin y procesadas estadísticamente mediante el programa estadístico SPSS v21. En primer lugar, se realizó un análisis estadístico descriptivo de cada una de las variables de la base de datos, para ello en el caso de las variables cualitativas se presenta una tabla de frecuencias (número de casos y porcentaje) y como representación gráfica el gráfico de sectores o el diagrama de barras apiladas. Para el caso de las variables cuantitativas se presenta para cada una de ellas: media, mediana, desviación típica, mínimo y máximo y como representación gráfica el diagrama de caja y bigotes.

Para determinar los factores que se encuentran relacionados con la mortalidad y con la recidiva se llevaron a cabo los correspondientes análisis de supervivencia de Kaplan-Meier, considerando el tiempo hasta la muerte o el tiempo hasta la recidiva. Se usó el test de log-rango para comparar la supervivencia entre las curvas de supervivencia.

También se calcularon sendas regresiones de Cox en las que se determinó qué factores son de riesgo para sufrir la defunción o una recidiva, ajustando el efecto de otras variables, y en qué medida lo son estos, obteniendo en cada caso las *hartz ratio* y sus correspondientes intervalos de confianza al 95%. Los resultados fueron representados gráficamente a través de forest plot.

Para estudiar las posibles diferencias entre las características de los pacientes con muestra analizable y de los que no se disponía de dicha muestra, se llevó a cabo un análisis bivariante. Para ello si las dos variables son cualitativas se calculó el test chi-cuadrado o el test de Fisher (según la distribución de la tabla). En el caso de las variables cuantitativas, se estudió la normalidad de esta a través del test de Shapiro-Wilk. Para estudiar las diferencias entre una variable cuantitativa y otra cualitativa con dos modalidades, se utilizó el Test t-Student para muestras independientes o el test no paramétrico U-Mann Whitney.

Para todos los análisis se consideró significativo un valor  $\alpha=0.05$ .



## CAPÍTULO 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Este capítulo expone los resultados del análisis de los datos. Se ha realizado la discusión de dichos datos con la revisión exhaustiva de cada apartado de forma conjunta.*

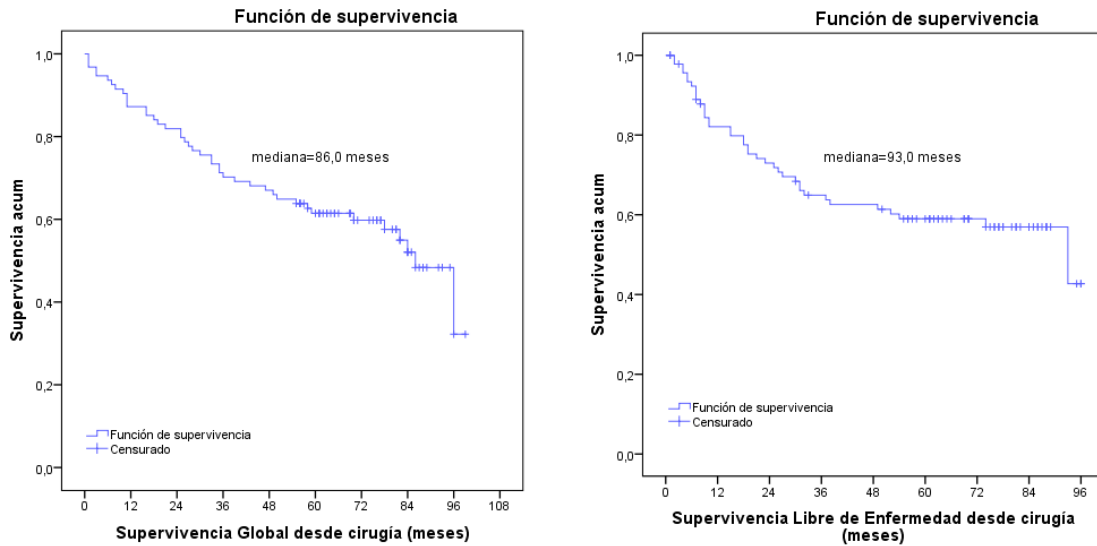
*En el apartado 6.1 se analizan los datos de SG y SLE de la población de estudio y en el apartado 6.2 se establecen subdivisiones según las distintas características analizadas. En el apartado 6.2.11 tratamos de una población de 55 pacientes con muestra disponible en el momento del análisis.*

### 6.1 SG Y SLE TOTALES

A 30 de junio de 2018, tras una mediana de seguimiento de 61,5 meses (1-99 meses), el 55,3% de la población del estudio sigue viva. El tiempo mediano de supervivencia esperado a la defunción desde la cirugía es de 86 meses. Del total de la población, el 39,4% de los pacientes sufren una recidiva, el resto, no tiene recaída en el evolutivo.

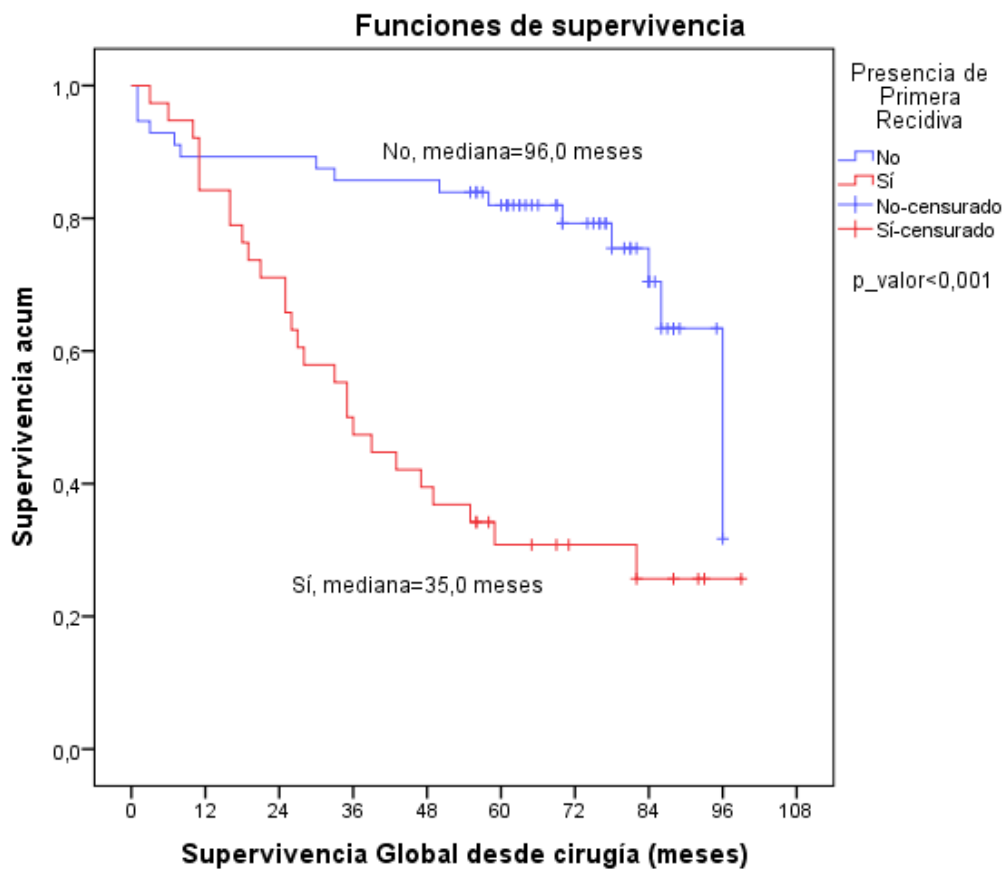
En la curva de supervivencia se puede comprobar la distribución de las muertes y de los pacientes censurados a lo largo del periodo de seguimiento. Se comprueba que a los 24 meses habían fallecido 17 pacientes, el 81,9% de los pacientes continúan vivos. Por lo que el 40,4% del total de fallecimientos se producen en los dos primeros años tras la cirugía.

En cuanto a SLE, a los 24 meses habían sufrido una recidiva 24 pacientes, el 74,7% de los pacientes continúan sin recidiva. Otra forma de exponerlo es que, en el total del seguimiento, en este periodo de 2 años, se producen el 64,8% del total de las recaídas; por lo que se podría decir que este periodo es clave en el seguimiento (gráfica 2).



Gráfica 2: SG y SLE en la población de estudio

Analizando la curva de SLE y los fallecimientos, se comprueba que existe relación estadística, mueren antes y más aquellos pacientes con recidiva (gráfica 3).



Gráfica 3: SG relacionada con las recaídas

Nuestros datos de SG para CPNCP E I-III superan una serie española publicada en marzo de 2018 sobre CPNCP E I y II del área de La Coruña donde la mitad de los pacientes diagnosticados fallecen a los 57 meses del diagnóstico<sup>191</sup>. Se hará referencia a los datos de EEUU por estadios en el apartado 6.2.5.

Estas supervivencias a 5 años no dejan de ser escasas si se tiene en cuenta que se trata de pacientes con CP estadios iniciales. Comparado con otras neoplasias como el cáncer de mama o colorrectal que, junto al CP son los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo, se queda muy atrás en SG a 5 años y, por tanto, en prevalencia. De hecho la SG a 5 años estimada para el cáncer de mama es 90,6%<sup>192</sup> y para cáncer colorrectal es de 65,1%<sup>193</sup>, ambos datos incluyendo también diagnósticos metastásicos.

Se comprueba que la cirugía en CP, aunque influye de forma evidente en la supervivencia, no es curativa en todos los casos. En torno a la mitad de los pacientes intervenidos fallecerán en el transcurso de 5 años. Por ello, se hace imprescindible buscar factores pronósticos y relevantes donde poder actuar para aumentar la supervivencia.

Un posible punto de reflexión sería considerar las recaídas y su tratamiento. En nuestra serie se ha puesto de manifiesto que presentar una recidiva temprana es un factor de riesgo para el fallecimiento. Los pacientes con una recidiva temprana tienen 5,78 veces más riesgo de fallecer que los pacientes que no presentan la recidiva antes de los 24 meses; HR=5,78 IC 95% (3.06; 10.91). De hecho, los pacientes que recaen en los primeros 2 años después de la cirugía fallecen el 87,5%. Y de todas las recaídas en nuestra serie, se acumulan en los 2 primeros años el 64,8%.

Los apartados siguientes muestran y discuten los datos de SG y SLE según las distintas características de los pacientes.

## 6.2 SG Y SLE SEGÚN LAS DISTINTAS CARACTERÍSTICAS

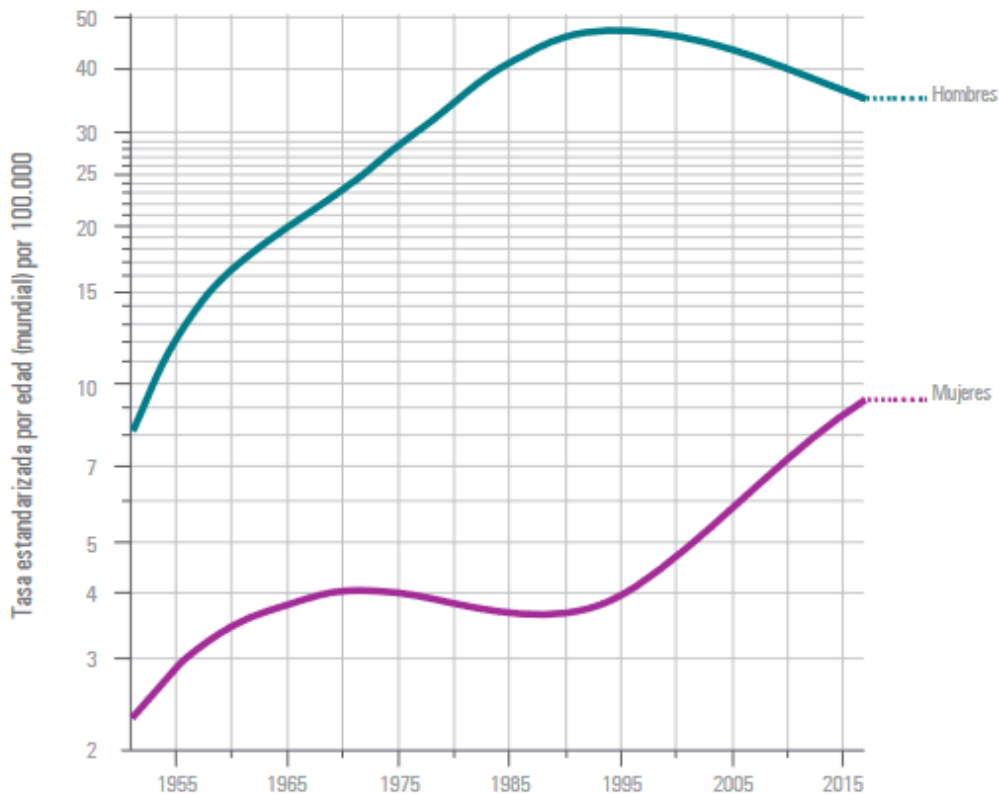
### 6.2.1 Sexo

En nuestra serie, como decíamos, el 83% de la población son hombres (78 pacientes) y un 17% de mujeres (16). Esta proporción es similar a otras series españolas publicadas<sup>191</sup> y, a la vez, se sabe que está cambiando puesto que la incidencia de diagnóstico de CP en la mujer está aumentando y, sin embargo, en el hombre está disminuyendo.

Según la estimación del número de nuevos casos publicada por SEOM, en 2022, 8.632 mujeres serían diagnosticadas en España de CP; así, *se mantiene como tercer tumor más incidente en mujeres en 2022, desde que en 2019 pasó de ser el cuarto tumor más diagnosticado en mujeres en las estimaciones para el año 2015 al tercero más*

incidente. Este hecho está en relación con el aumento del consumo de tabaco en mujeres a partir de los años 70<sup>194</sup>.

En este sentido, es muy significativa la gráfica sobre mortalidad por sexos en CP publicada por SEOM en los últimos años, se muestra la captura de la obtenida en el 2022 en la gráfica 4.



Fuente: GLOBOCAN 2020  
Gráfico: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)  
© International Agency for Research on Cancer 2022

Gráfica 4: Mortalidad por CP en España según sexo

Fuente: Las cifras del cáncer en España 2022, SEOM.

Como señala el trabajo del Dr. Martín-Sánchez<sup>195</sup> *“Las tendencias divergentes en la prevalencia de tabaco podrían explicar el aumento de la mortalidad por cáncer de pulmón entre las mujeres españolas desde los inicios de los años noventa”*. Con este estudio se pretendía describir la tendencia de la mortalidad por CP por sexo y edad desde 1980 hasta 2013 en España y se objetiva que, entre mujeres, la tasa de mortalidad ajustada por edad aumentó desde 1989 y este aumento es más pronunciado desde 1997 con respecto a los hombres.

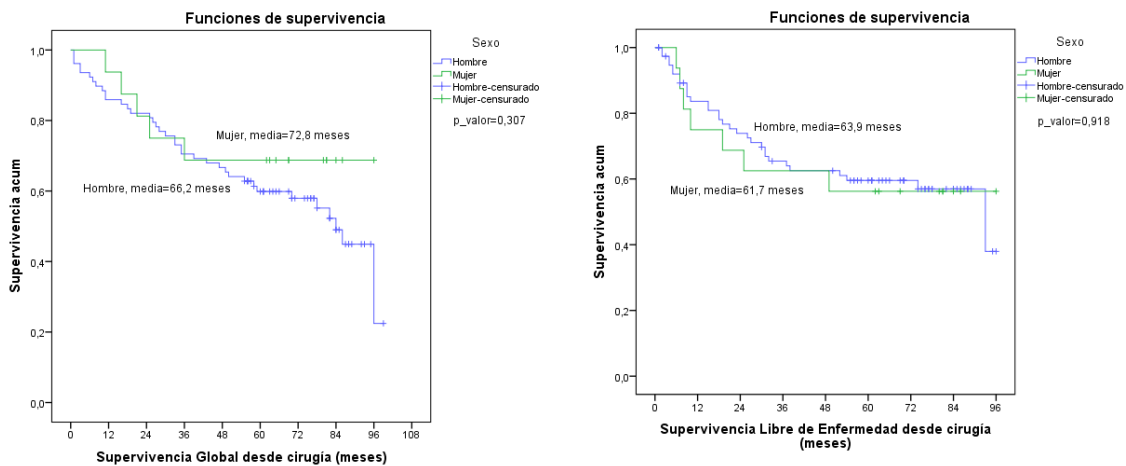
Estos datos deberían provocar reacciones más contundentes en prevención y programas antitabaco. Tema ya tratado en el punto 2.2 del presente trabajo.



Según estudios de principios de este siglo, el CP en la mujer podría tener un comportamiento biológico diferente al varón. De hecho, la tasa de supervivencia a los 5 años era del 15,6% en las mujeres frente al 12,4% en varones. Cuando se analiza por estadios, también la supervivencia es superior. Del mismo modo, la supervivencia de las mujeres es superior cuando se comparan series de pacientes sometidos a resección completa del tumor o a RT o a QT<sup>196</sup>.

En nuestra población no hay diferencias en cuanto a SLE o SG según el sexo, y esta variable tampoco se identifica como factor de riesgo (gráfica 5).

Tampoco se han detectado diferencias estadísticamente significativas en la edad de los pacientes según el sexo,  $p\_valor = 0,061$ , ni en el estadiaje que presentan hombres y mujeres,  $p\_valor = 1,000$ .



Gráfica 5: SG y SLE según el sexo en nuestra población

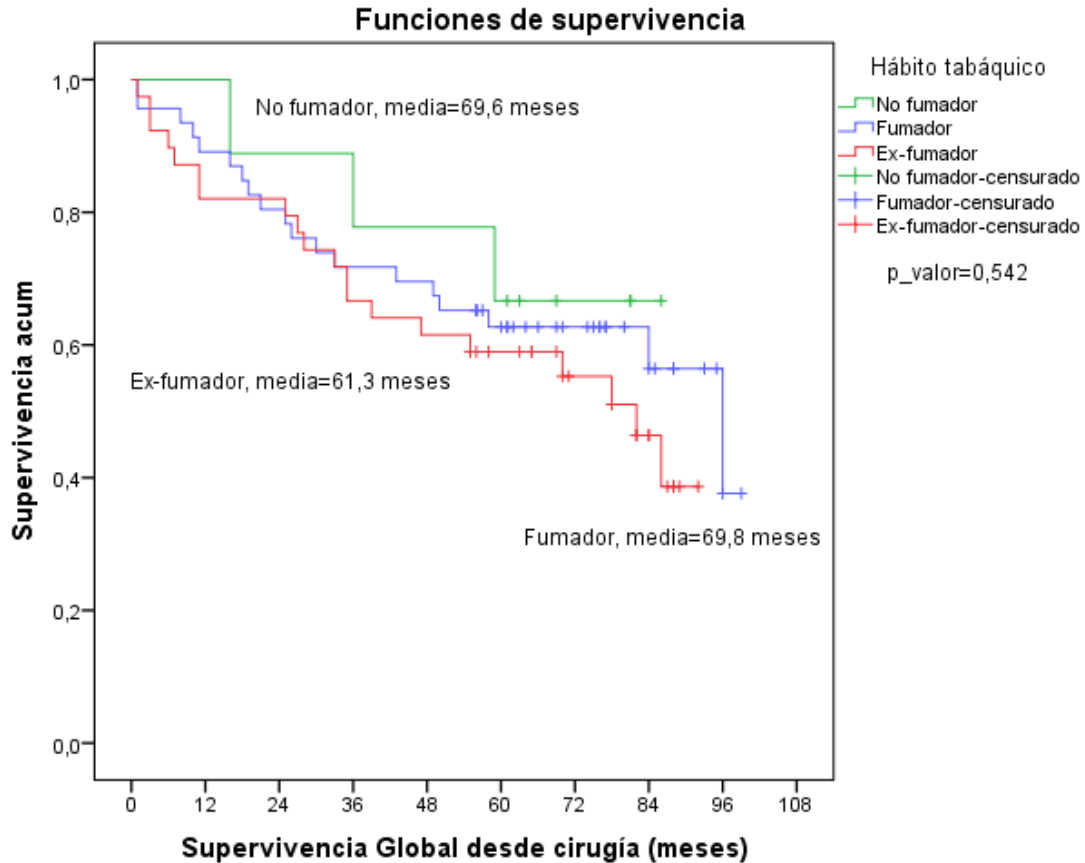
### 6.2.2 Hábito tabáquico

En el apartado 2.2. se ha analizado el tabaquismo como factor pronóstico en el CP. En el contexto quirúrgico, el tabaco, disminuye la oxigenación tisular, empeora el aclaramiento mucociliar, tiene un efecto inmunosupresor y también enlentece la curación de la herida quirúrgica. Además, fumar también puede predisponer a otras comorbilidades sobre todo cardiovasculares, incrementando el riesgo perioperatorio.

En nuestra población, todos los pacientes han sido intervenidos de CP, 85 pacientes (90,4%) habían sido fumadores en algún momento y 46 pacientes (48,9% de la población del estudio) fumaban al diagnóstico; tan sólo 9 pacientes (9,6%) son no fumadores reales. La mediana de paquetes/año es de 55 y la media de 58,5.

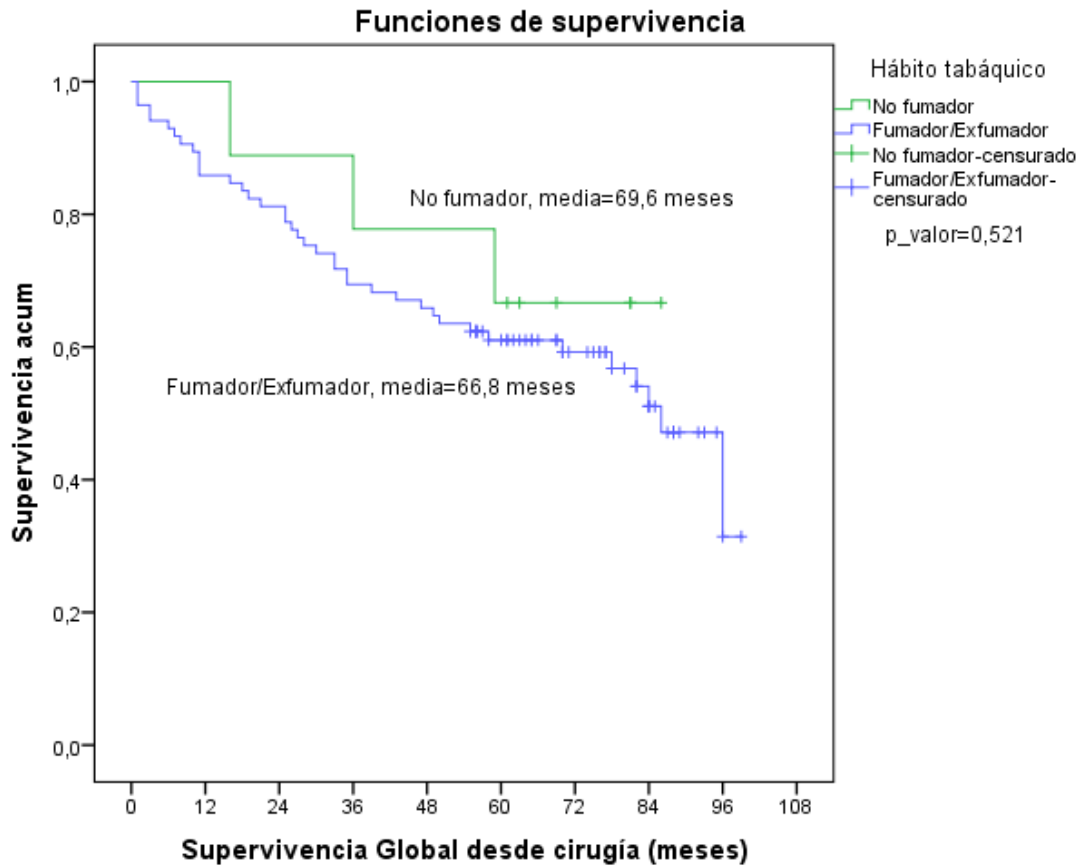


El análisis de supervivencias según el hábito tabáquico en nuestra población refleja que el tiempo medio esperado de supervivencia desde la cirugía es de 69,6 meses para los pacientes NO fumadores, 69,8 meses para los fumadores, y de 61,3 meses para los pacientes exfumadores (gráfica 6).

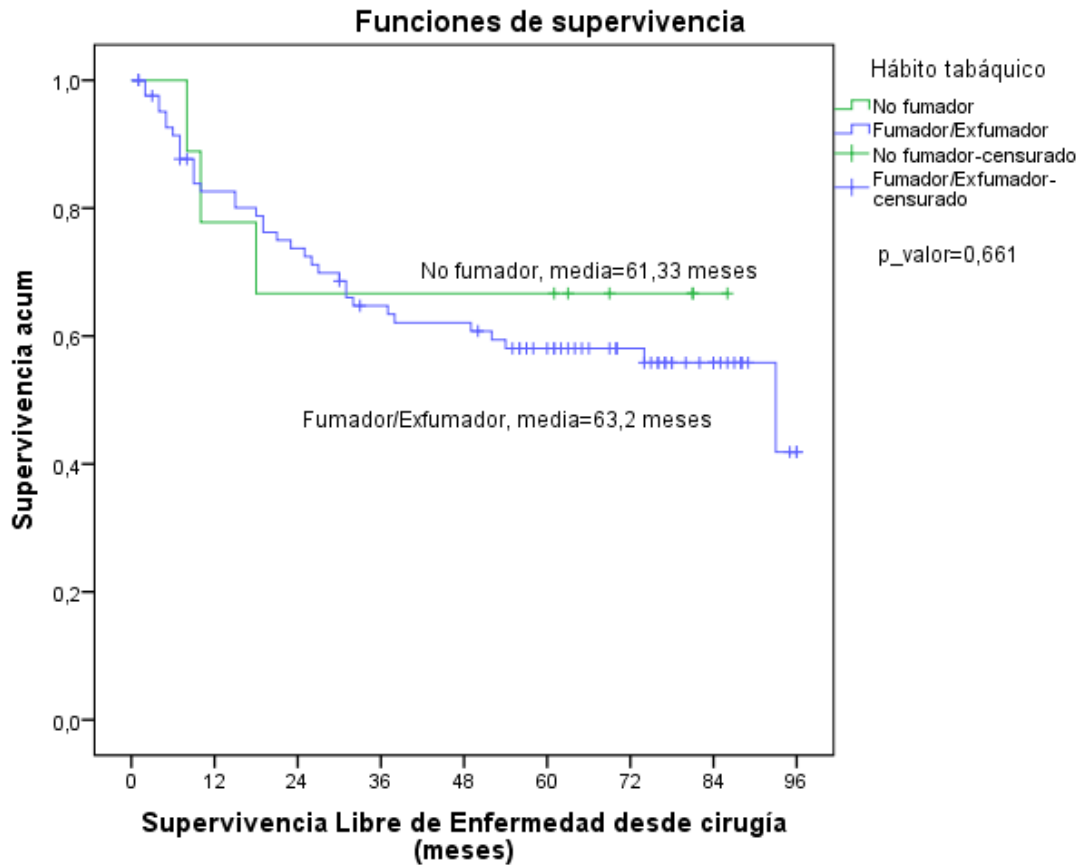


Gráfica 6: SG según hábito tabáquico (3 grupos) en nuestra población

Si analizamos la SG agrupando en 2 grupos: no-fumadores y fumadores (incluyendo a los exfumadores) tampoco se encuentran diferencias significativas (gráfica 7). Datos similares si analizamos SLE (gráfica 8).

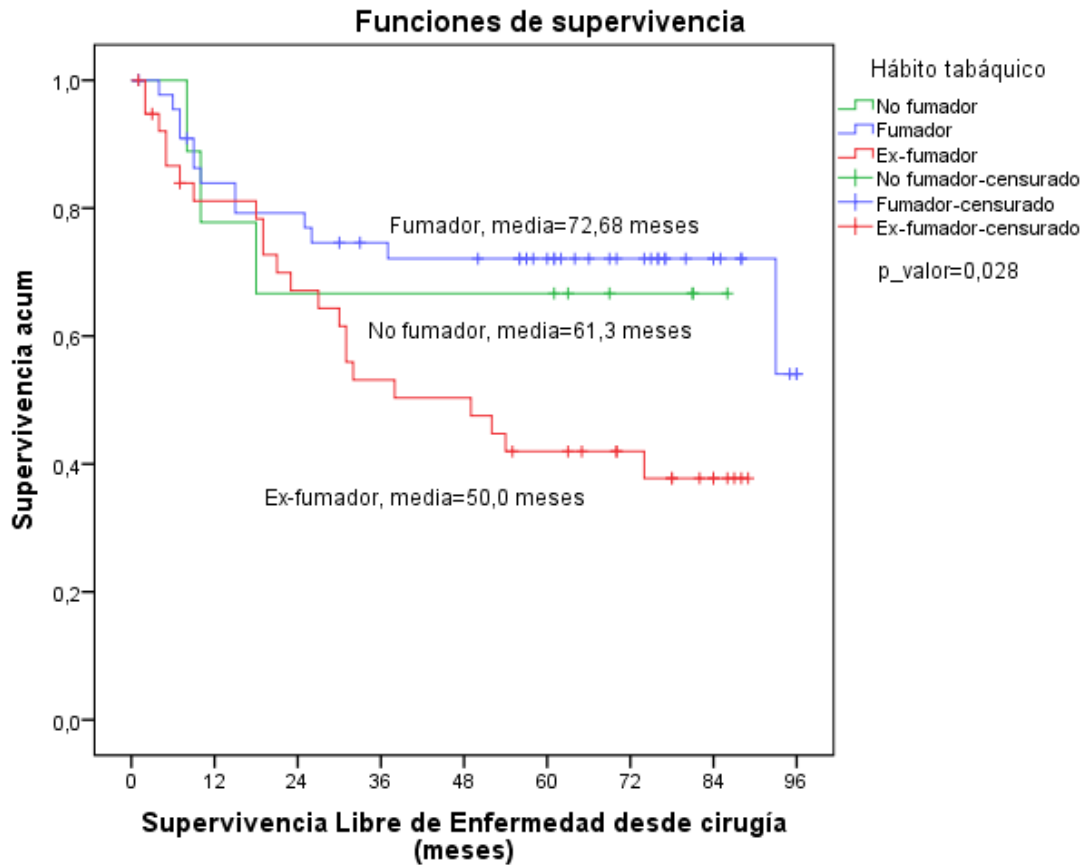


Gráfica 7: SG según hábito tabáquico (2 grupos) en nuestra población



Gráfica 8: SLE según hábito tabáquico (2 grupos) en nuestra población

Sin embargo, si analizamos SLE dividido en tres grupos encontramos diferencias en las curvas de supervivencia de forma global ( $p_{\text{valor}} = 0,028$ ), en concreto, las diferencias se producen entre exfumador y fumador, con una  $p_{\text{valor}} = 0,009$  a favor de los fumadores curiosamente (gráfica 9).



Gráfica 9: SLE según hábito tabáquico (3 grupos) en nuestra población

Estos resultados podrían justificarse por la población tan pequeña de no-fumadores y por la heterogeneidad de los tiempos de exfumador y la cantidad de tabaco que fumaba cada paciente. El dato objetivo es que, más del 90% de la población del estudio ha fumado en algún momento; esto refleja lo que ya se sabe, que el tabaco es el factor de riesgo más importante para padecer CP.

Otro dato conocido, es que el tabaco se relaciona con las características clinicopatológicas del CP y su pronóstico<sup>75,76</sup>. Si se observan los datos obtenidos por Okamoto<sup>75</sup>, se comprueba que la influencia del tabaquismo en la SG se entrecruza con la histología, mostrando los no fumadores un pronóstico significativamente mejor que los fumadores entre los pacientes con ADC, mientras que los fumadores ligeros tuvieron un pronóstico significativamente peor que los fumadores pesados entre los pacientes con histología escamosa. En nuestra población, no hay un efecto conjunto entre el hábito tabáquico y la histología (escamosos vs no escamosos) del paciente que influya en el fallecimiento, estadísticamente hablando. Ni tampoco tienen un efecto conjunto para el desarrollo de la recidiva.

En cuanto al estudio de Zhang<sup>76</sup>, ya antiguo, intuye que diferentes cantidades de tabaco puede afectar la quimiosensibilidad en el CP, con resultados distintos en adyuvancia. Por tanto, podemos decir que el tabaquismo se podría considerar un factor que altera la evolución del proceso cancerígeno y los tratamientos que se van pautando.

Otro dato interesante, con respecto a la supervivencia a largo plazo, es que la supervivencia a los 5 y 10 años empeora para los pacientes con CP estadio I entre los fumadores activos en comparación con los ex fumadores y no fumadores. Sin embargo, no se han encontrado diferencias con respecto a las pruebas de función pulmonar después de la cirugía por el hecho de dejar de fumar antes de la intervención<sup>197</sup>.

A pesar de lo anteriormente descrito, se debe alentar a los pacientes que van a ser sometidos a una cirugía de resección de CP a la cesación tabáquica previa a la intervención porque se reducen las complicaciones perioperatorias. Además, se asocia a una mejor calidad de vida y mayor rentabilidad quirúrgica. También se ha visto que puede haber una reducción en el desarrollo de tumores metacrónicos al abandonar el hábito tabáquico. La mayoría de los expertos recomiendan iniciar la deshabitación al menos 6-8 semanas previas a la cirugía. Los pacientes fumadores activos deben ser sometidos a terapia antitabaco previo a la cirugía de CP con un grado de recomendación 1C<sup>198</sup>.

La persistencia en el consumo de tabaco en pacientes con CP puede reducir la supervivencia, incrementar el riesgo de la aparición de un segundo primario y disminuir la efectividad del tratamiento médico, así como una pérdida en la calidad de vida. El tabaquismo activo durante el tratamiento oncológico (QT y/o RT) aumenta el riesgo de efectos secundarios con respecto a los no fumadores. El tabaco puede disminuir la respuesta a la QT y afectar a la farmacocinética y al perfil de toxicidad de algunos fármacos. En consecuencia, cada vez se está fortaleciendo más el reconocimiento de integrar el tratamiento del tabaquismo dentro del contexto oncológico.

Los pacientes con CP que van a someterse a cirugía teóricamente están muy motivados para dejar de fumar por lo que deben recibir consejo antitabaco por parte del personal sanitario y se les debe informar acerca del impacto negativo de ser fumador sobre su tratamiento. Así mismo es importante derivarlos a centros especializados en el tratamiento del tabaquismo, dado que las tasas más elevadas de abandono se consiguen combinando la farmacoterapia con el asesoramiento.

Los programas intensivos y prolongados en el tiempo que engloben consejo, terapia conductual, terapia farmacológica y un amplio seguimiento presentan una elevada eficacia, son coste-efectivos y un componente decisivo de calidad en el tratamiento y en los cuidados del paciente con CP<sup>199</sup>.

### 6.2.3 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

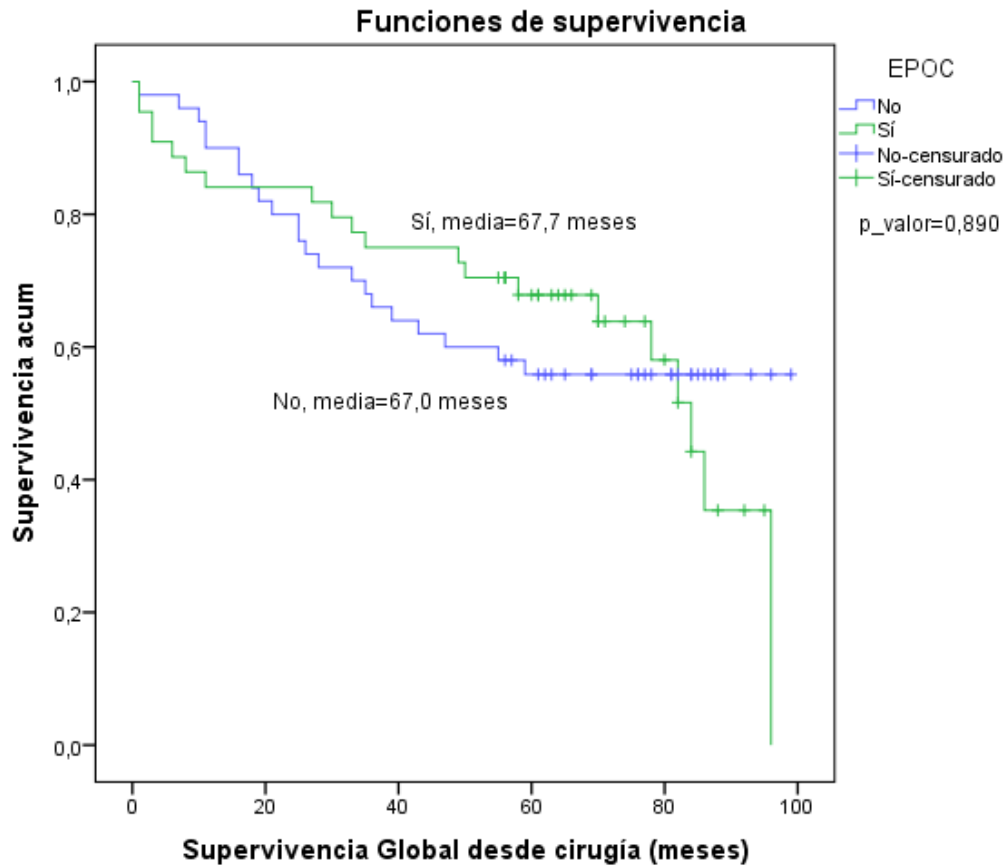
En cuanto al diagnóstico previo de EPOC, hasta en el 46,8% de nuestra serie fueron diagnosticados de algún grado de EPOC; siendo severo en 9 pacientes (9,6%). 50 pacientes (53,2%) eran no EPOC conocido.

Se ha descrito que en pacientes de nuevo diagnóstico de CP la prevalencia de EPOC varía entre un 40 y un 50%<sup>200</sup>; porcentaje muy similar al de nuestra muestra. A la vez, los pacientes con CP tienen seis veces más de riesgo de tener EPOC que en fumadores “sanos”<sup>201</sup>. La inflamación crónica de la EPOC constituye un papel clave en la patogénesis del CP: algunas citoquinas inhiben la apoptosis, interfieren en los mecanismos de reparación celular y promueven la angiogénesis. Otro de los mecanismos potencialmente implicados en el desarrollo de CP en pacientes con EPOC sería el aumento tanto bronquial, sistémico y muscular, de estrés oxidativo.

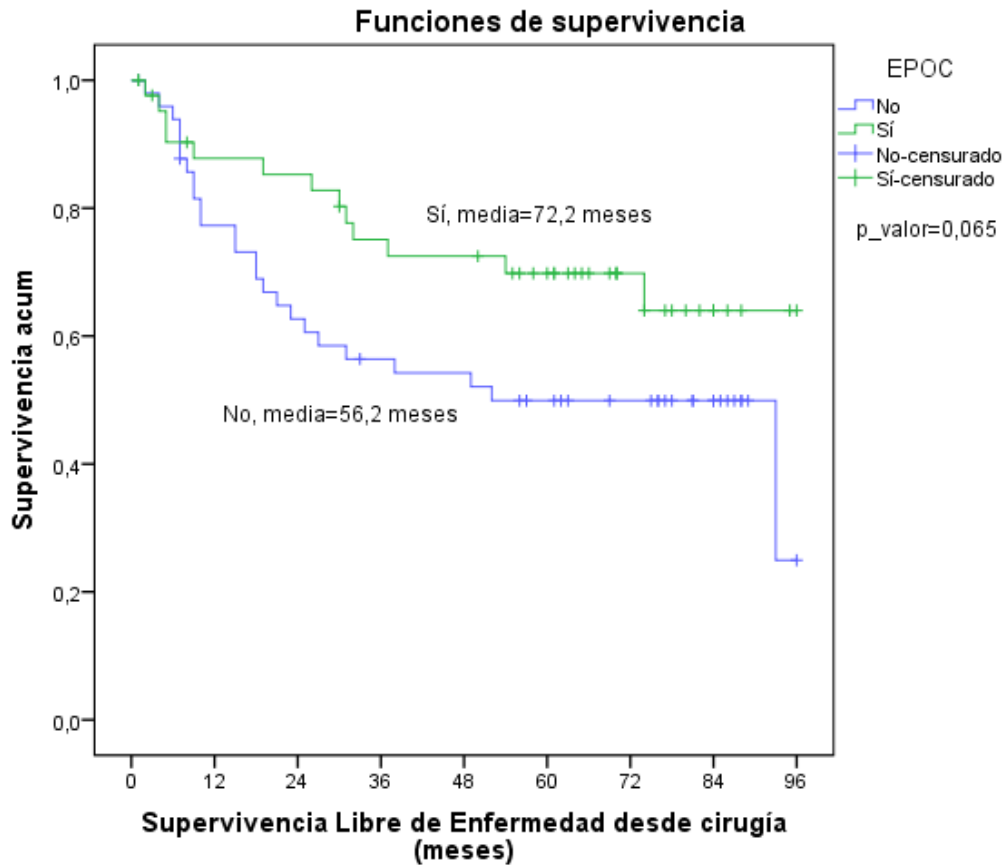
Frecuentemente se hace el diagnóstico inicial de EPOC durante la historia natural de pacientes con CP que requieren intervención quirúrgica, señal del infradiagnóstico de la enfermedad obstructiva respiratoria. A menudo hay pacientes con EPOC que no son considerados candidatos a esta cirugía porque la EPOC plantea serios problemas a la hora de indicar los límites no tolerables en una resección. El riesgo de complicaciones aumenta en un 10% por cada 5% de descenso en la función pulmonar predicha postoperatoria y mayor riesgo aún si presentan indicación de oxigenoterapia crónica domiciliaria. La EPOC es frecuentemente un factor de riesgo también para complicaciones pulmonares postoperatorias. Un 50% de los pacientes con EPOC presentan exacerbaciones tras cirugía de resección de pulmón; de hecho en las guías de resección tiene un papel protagonista la función pulmonar<sup>202</sup>. En las guías del manejo perioperatorio, se pone el foco en la rehabilitación respiratoria, fisioterapia y manejo de secreciones. Las guías internacionales de CP recomiendan el abandono del tabaquismo y la rehabilitación respiratoria sin establecer de forma explícita un tratamiento de EPOC intensivo a corto plazo diferente a lo establecido en las guías específicas de la enfermedad<sup>203</sup>.

En un estudio reciente se objetiva que la EPOC tiene un impacto negativo en la SG en los pacientes con CPNCP en estadio IV y en cáncer de pulmón microcítico que se sometieron a QT<sup>204</sup>.

En nuestra serie no existen diferencias estadísticamente significativas en SG o SLE entre los grupos de pacientes con o sin EPOC (gráficas 10 y 11). Sólo presentaban EPOC severa 9 pacientes (<10%), por lo que parece asumible la no influencia de este factor en la supervivencia. Es muy difícil recoger el dato de cuántos de estos pacientes con EPOC han sufrido reagudizaciones tras la cirugía.



Gráfica 10: SG entre los grupos de pacientes con o sin EPOC



Gráfica 11: SLE entre los grupos de pacientes con o sin EPOC

### 6.2.4 Tipo de intervención

Los tipos de intervención realizadas en nuestra serie se pueden ver en la siguiente tabla:

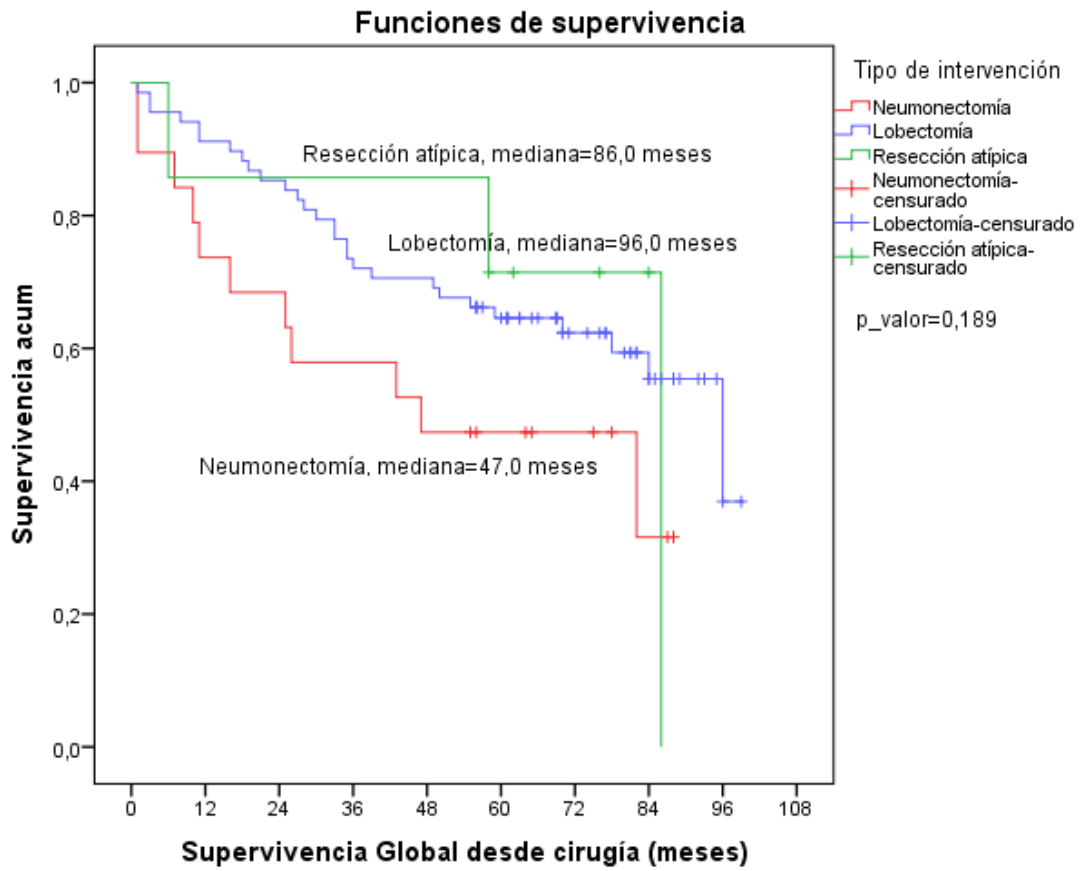
Tabla 6: Tipo de intervenciones quirúrgicas

<i>Tipo de intervención</i>	
Neumonectomía, n (%)	19 (20,2)
Lobectomía, n (%)	68 (72,3)
Resección atípica, n (%)	7 (7,4)

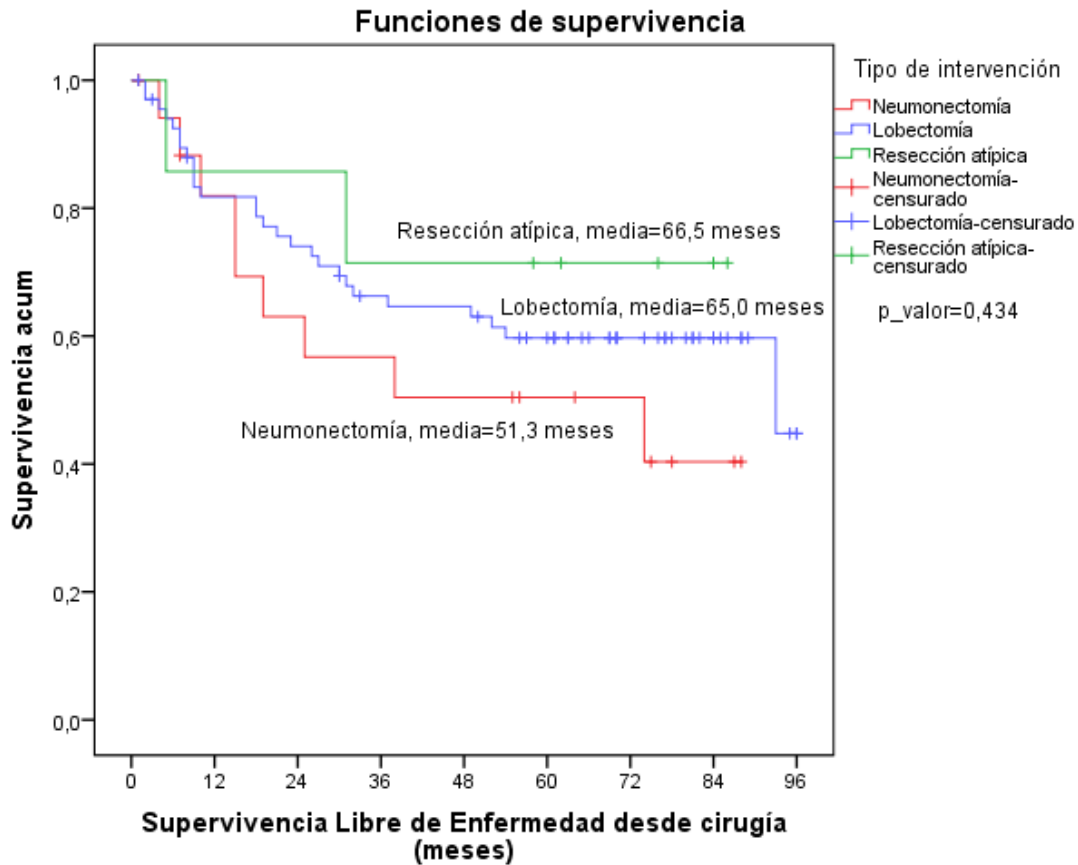
De las 19 neumonectomías, 14 fueron izquierdas y 5 derechas. De las lobectomías: 21 fueron izquierdas; 8 inferiores y 13 superiores. Mientras que derechas fueron 51: 32 superiores, 6 medias y 13 inferiores. En este hemitórax 4 fueron bilectomías.



Si se analiza la supervivencia según tipo de intervención, no se encuentran diferencias significativas ni en SG ni en SLE en ninguna de las agrupaciones del tipo de intervención (gráfica 12 y 13).



Gráfica 12: SG según tipo de intervención



Gráfica 13: SLE según tipo de intervención

En el estudio multivariante tipo de intervención – estadio del CP, se demuestra que, de estas dos variables, realmente, solo el estadio patológico es un factor de riesgo para el fallecimiento.

En nuestra serie no hay ningún fallecimiento en el postoperatorio inmediato ni se han relacionado los fallecimientos con la cirugía como causa directa; por lo que el porcentaje de mortalidad es 0. Muy mejorado del descrito por la SEPAR en el año 2005<sup>205</sup> que rondaba entre el 5% para lobectomías y resecciones sublobares y el 14% para neumonectomías.

La mortalidad y morbilidad después de resección pulmonar anatómica han disminuido en las últimas décadas de acuerdo con los informes anuales de la Sociedad Europea de Cirujanos Torácicos (ESTS). Así, los índices de mortalidad no configurados han disminuido de 3,9% a 1,7% en los últimos cinco años y la morbilidad cardiorrespiratoria después de lobectomía ha caído del 20% en 2009 al 15,2% en 2018; esto tiene mucho que ver con el descenso del número de neumonectomías y el incremento de la tasa de procedimientos mínimamente invasivos<sup>206</sup>.

### 6.2.5 Estadio tumoral

Como se ha visto en el capítulo 2.1, la clasificación TNM supone el indicador pronóstico más potente para la inmensa mayoría de tumores malignos. Las tasas de supervivencia reportadas a 5 años de pacientes con CP en estadios I y II después de resección completa quirúrgica son aproximadamente 60%-90% y 30%-70% respectivamente<sup>59</sup>. Según el registro americano, a los 5 años la supervivencia relativa en los tumores localizados es del 61,2% y de los localmente avanzados (III) 33,5%<sup>207</sup>.

En nuestra serie es el factor pronóstico más potente para SLE y SG. A los 5 años siguen vivos el 75% de la población estadio I y, sin embargo, el 66,7% de los E-III han fallecido en ese punto de corte.

Podemos ver en la tabla 7 los porcentajes de cada estadio y los fallecimientos que han ocurrido en cada grupo:

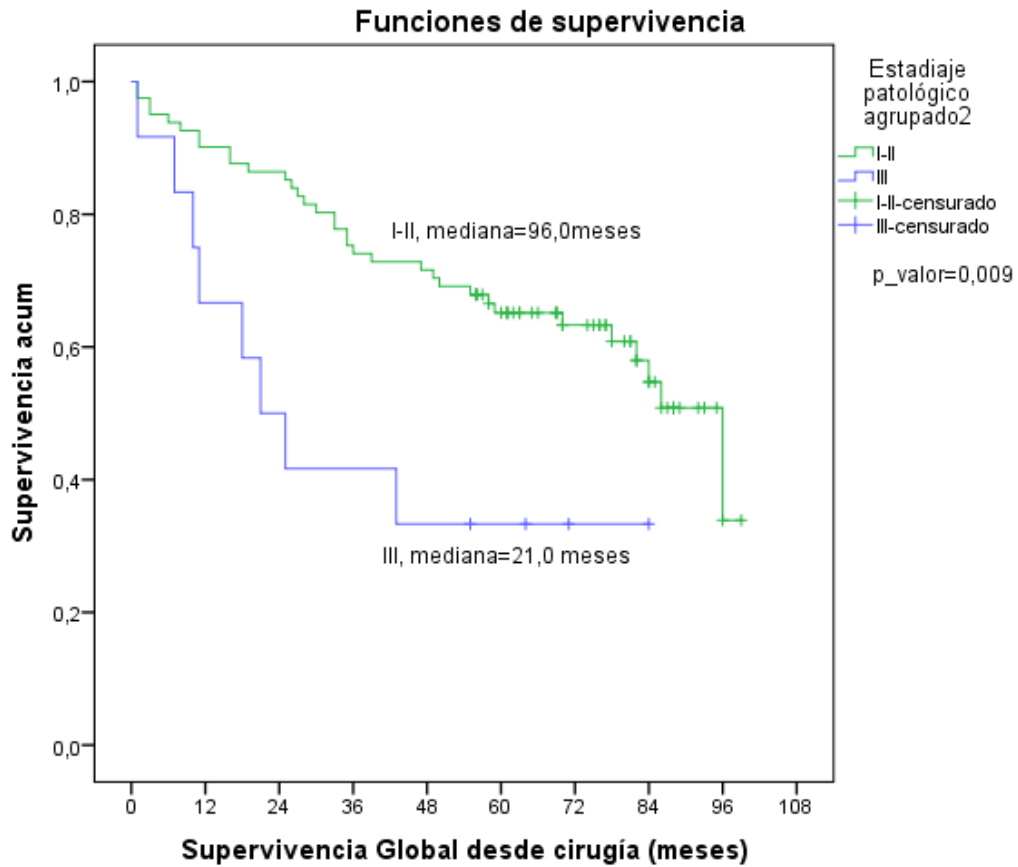
Tabla 7: Estadío tumoral y fallecimientos

<i>Estadio patológico</i>	<i>Nº pacientes</i>	<i>Nº fallecimientos (%)</i>	<i>Censurados</i>	
			<i>Nº</i>	<i>Porcentaje</i>
I	52	19 (36,5%)	33	63,5%
II	29	15 (51,7%)	14	48,3%
III	12	8 (66,7%)	4	33,3%
Global	93	42 (45,2%)	51	54,8%

El 36,5% de los pacientes con estadio I han fallecido, un 51,7% de estadio II y el 66,7% de estadio III. El resto de pacientes se consideran censurados pues no sufren el evento de estudio a fecha del último seguimiento.

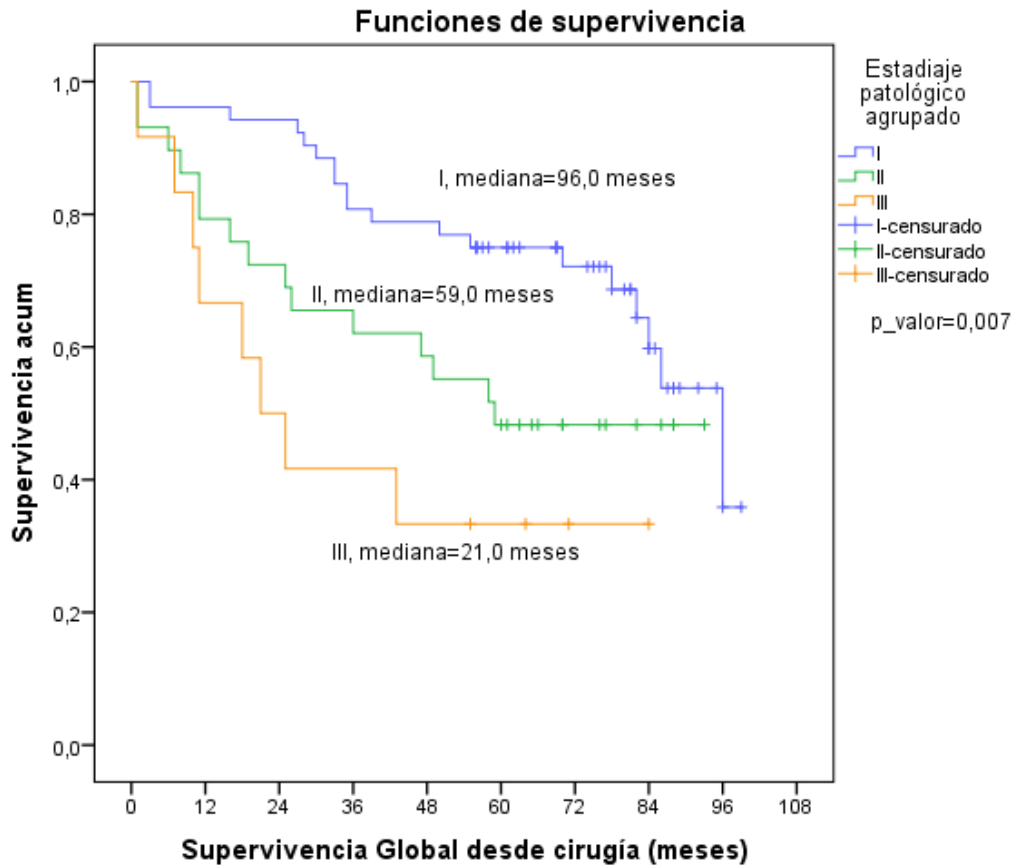
En el total de pacientes analizados faltaría uno, porque se utiliza el estadio patológico y uno de los pacientes de nuestra serie fue intervenido tras tratamiento con QT y RT haciendo una respuesta patológica completa, por lo que su estadio sería y TONOMO; no entrando en este análisis.

Conociendo la heterogeneidad del estadio III puede interesar ver gráficamente la distinta evolución en SG agrupando estadios I-II versus estadios III, gráfica 14.



Gráfica 14: SG según estadio I-II vs III

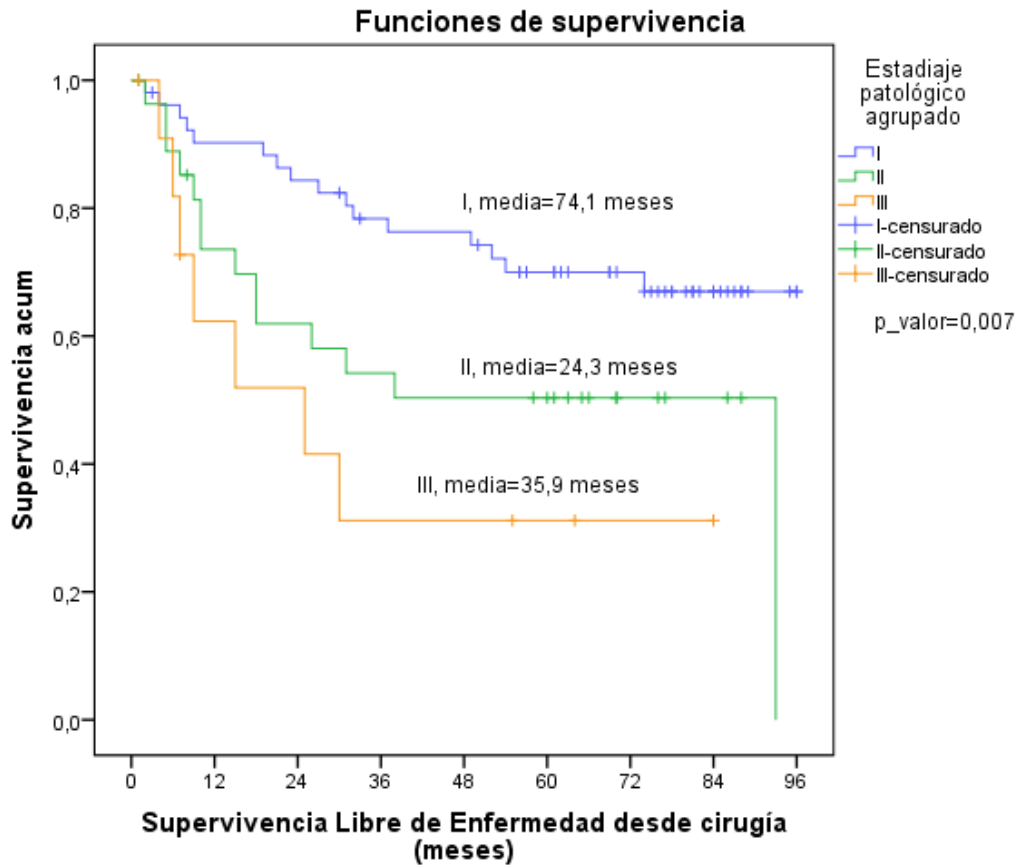
Si se analiza la SG considerando los tres estadios, quedaría como se observa en la gráfica 15.



Gráfica 15: SG según estadios I, II, III

Para determinar entre qué grupos se observan las diferencias se calculan los correspondientes test de Log-Rank. Este test indica que las diferencias se encuentran entre los pacientes con estadio I y estadio III,  $p\_valor = 0,001$ . Entre el resto de grupos no existen diferencias significativas.

En cuanto a SLE ocurre algo similar, al analizar los datos entre los tres estadios, las diferencias se encuentran entre estadio I y III  $p\_valor = 0,003$ , también hay diferencias entre el estadio I y II,  $p\_valor = 0,032$  (gráfica 16).



Gráfica 16: SLE según estadios I, II, III

Ante estos hallazgos y revisando la literatura, se comprende el esfuerzo por encontrar la forma de llegar a un diagnóstico precoz de CP en estadios más iniciales para mejorar la evolución y pronóstico de esta enfermedad. Son muchos los estudios sobre cribado de CP en población de riesgo con discusiones en torno a cómo definir esa población de riesgo, los coste-beneficios de instaurar esos programas de *screening*, las características de la TC u otras pruebas complementarias que habría que realizar, etc.

El cribado de CP se ha convertido en una realidad en Estados Unidos tras la finalización del *National Lung Screening Trial (NLST)*<sup>1</sup>. La brecha cultural existente entre Estados Unidos y Europa junto con la diferencia entre ambos sistemas de salud, crearon cierto escepticismo en la comunidad europea con respecto al beneficio potencial de los programas de detección del CP en nuestro continente. Los resultados del estudio *Dutch-Belgium Randomized Lung Cancer Screening (NELSON)*<sup>2</sup> pueden mitigar esas preocupaciones y proporcionar un impulso muy necesario para los esfuerzos relacionados con la implementación del cribado de CP en Europa. Ambos ensayos investigaron la función de la tomografía computarizada de baja dosis de radiación (TBDR) como la herramienta de detección de elección<sup>208</sup>.

En ambos ensayos se destaca la reducción de la mortalidad por CP. No hay diferencias en la SG en comparación con el grupo control. En siguiente imagen se muestran más detalles de ambos ensayos (tabla 8).

Tabla 8: Tabla comparativa entre los estudios NLST y NELSON.

	NLST	NELSON
Edad (años)	55-74	50-74
Hábito tabáquico	≥30 paquetes-año ≥15 años del abandono	≥15 paquetes-año ≥10 años del abandono
TC	Basada en el diámetro	Basada en el volumen
Tamaño de muestra	53.454	15.822
Número de rondas	3	4
Intervalos	1 año	0,1, 2 y 2,5 años
Adherencia	95% TBDR group	87,6%
Número de cánceres	1.060 (645/100.000 personas-año)	5,58/1.000 personas-año
Estadios iniciales	40% estadio IA	50% estadio IA
Test positivos	24%	2,1%
VPP	3,8%	43,5%
Reducción de la mortalidad por CP	20%	>20%
Población	Norteamericana	Europea

CP: cáncer de pulmón; TC: tomografía computarizada; VPP: valor predictivo positivo.

A pesar de no contar en España con un programa de cribado en CP de carácter nacional, diferentes grupos de distintas comunidades autónomas han obtenido resultados favorables para la implementación de un programa de cribado. Un ejemplo de ello es la participación de tres centros españoles en la cohorte internacional ELCAP, con más de 12.000 individuos incorporados a sus programas de detección precoz<sup>209</sup>.

En 2017 se publicó en Archivos de Bronconeumología un documento de consenso sobre las bases de un programa de cribado en España, respaldado por distintas sociedades científicas, como la SEPAR, la SEOM, la Sociedad Española de Radiología Médica (SERAM) y la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT)<sup>210</sup>.

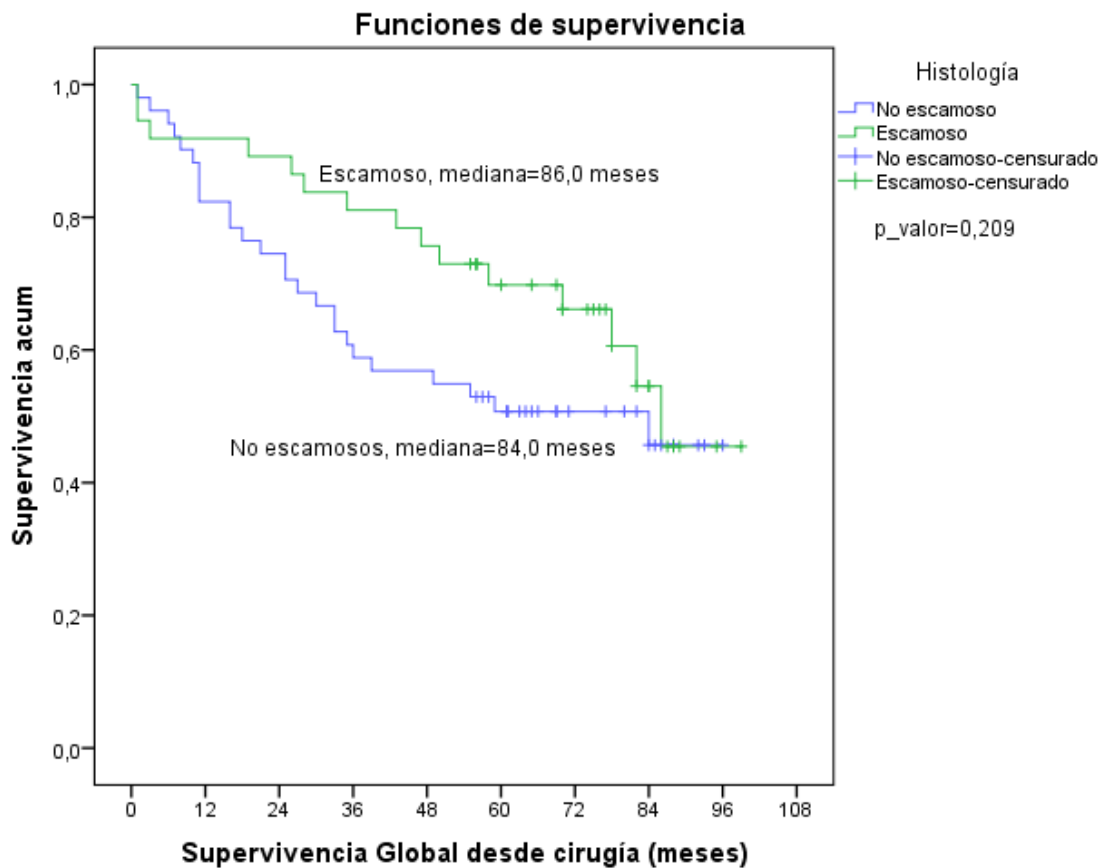
Actualmente está en marcha la creación del grupo CASSANDRA (*Cancer Screening, Smoking Cessation And Respiratory Assessment*), un proyecto cuyo objetivo consiste en aprovechar toda la experiencia adquirida en nuestro país y elaborar las bases de un programa de cribado de CP de carácter nacional, respaldado por todas las sociedades científicas implicadas en su diagnóstico y tratamiento.

El cribado poblacional del CP, a pesar de haber demostrado una reducción de la mortalidad, no está exento de críticas y de problemas para su implementación que, teóricamente, se pretenden solventar o encauzar con la ejecución y análisis de este proyecto.

### 6.2.6 Escamosos vs No escamosos

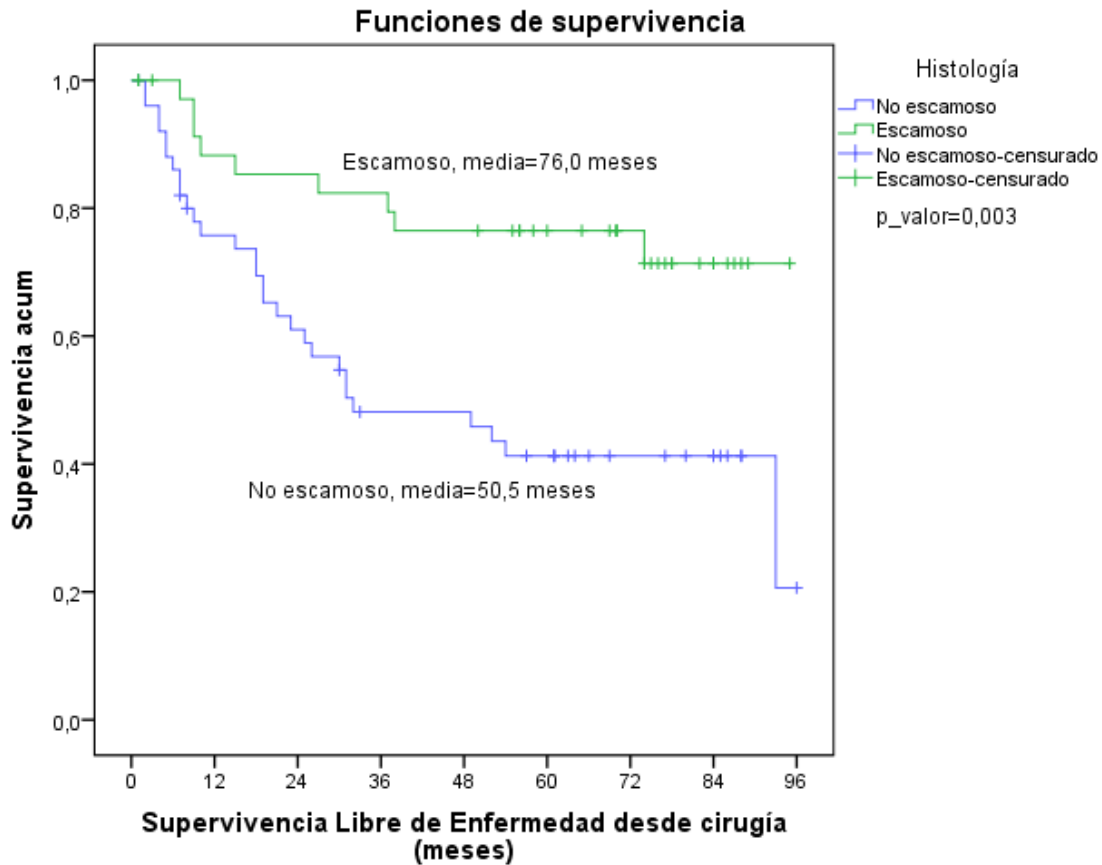
En nuestra serie, sin considerar a los 6 pacientes con diagnóstico de tumor carcinoide por su evolución claramente distinta, de los pacientes clasificados como “No escamosos” (51 ptes) sufren una recidiva el 56,9% (29 ptes), mientras que para los de histología escamosa (37 ptes) el porcentaje de recidiva es del 24,3% (9 ptes).

Si se analiza la SG entre histologías, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (gráfica 17). Y, sin embargo, considerando la SLE sí se observan diferencias a favor de la histología escamosa (gráfica 18).



Gráfica 17: SG según histología Escamoso / No escamoso





Gráfica 18: SLE según histología Escamosos / No escamoso

Histológicamente es conocido que el carcinoma epidermoide o escamoso presenta diferenciación escamosa, por lo que puede formar puentes intercelulares y queratina. La mayoría de estos tumores surgen de los bronquios principales, lobares o segmentarios, aunque esto es relativo, y más de un 53% de los carcinomas epidermoides se identifican en la periferia. Además, pueden presentar un crecimiento endobronquial o invasivo y suelen cavitarse. Teóricamente, tienden a ser localmente agresivos, mientras que su diseminación a distancia podría ser menos frecuente que en el ADC.

El ADC se caracteriza por tener una diferenciación glandular, poder producir mucina, localizarse habitualmente en la periferia del pulmón, donde provoca un engrosamiento focal de la pleura con retracción de la misma y presentarse de forma aislada o múltiple.

Según los manuales de Oncología Médica, los distintos estudios que evalúan el valor pronóstico del subtipo histológico no obtienen datos concluyentes. En resumen, parece que el carcinoma de células grandes y el ADC tienen un peor pronóstico que el carcinoma epidermoide. En estadios avanzados este pronóstico teórico de los ADC parece suplirse por el aumento de opciones terapéuticas en los distintos subtipos moleculares. Esto podría justificar los anteriores resultados.

Se tienen datos más concluyentes sobre otros rasgos patológicos que se han relacionado con el pronóstico: presencia de necrosis, alto índice mitótico, elevado pleomorfismo celular, escasa diferenciación histológica o la infiltración de la pleura se relacionan con un peor pronóstico, mientras que el patrón ocupante de espacio alveolar parece tener una evolución más favorable. Se analizan algunos de estos datos histológicos a continuación.

A raíz de la nueva clasificación de ADC (capítulo 2.5.), se han recogido datos de series amplias de pacientes intervenidos, intentando relacionar las características histológicas y supervivencia. Por estos datos, se analizaron las posibles diferencias de evolución entre los distintos tipos de ADC en nuestra serie. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas, posiblemente por el número de la muestra que hace que haya pocos casos para cada modalidad de ADC.

Últimamente también se está estudiando la influencia de la localización del tumor en su evolución<sup>211</sup>. El ADC central se asocia con una peor supervivencia que el ADC periférico y la menor tasa de cirugía en pacientes con ADC central es una razón importante para esto. La ubicación del tumor pulmonar juega un papel crítico en la predicción del pronóstico y en la elección de estrategias terapéuticas. Situación que vivimos semanalmente en el subcomité de tumores torácicos del hospital.

De los pacientes analizados en esta serie, ninguno se clasifica NOS (*“not otherwise specified”*), lo que pone de manifiesto la profesionalidad de nuestros patólogos de referencia.

### 6.2.7 Grado de diferenciación y necrosis

Con respecto al grado de diferenciación, los patólogos, habitualmente, utilizan esta clasificación:

- Gx: no se puede determinar
- G1: bien diferenciado
- G2: moderadamente diferenciado
- G3: poco diferenciado
- G4: indiferenciado

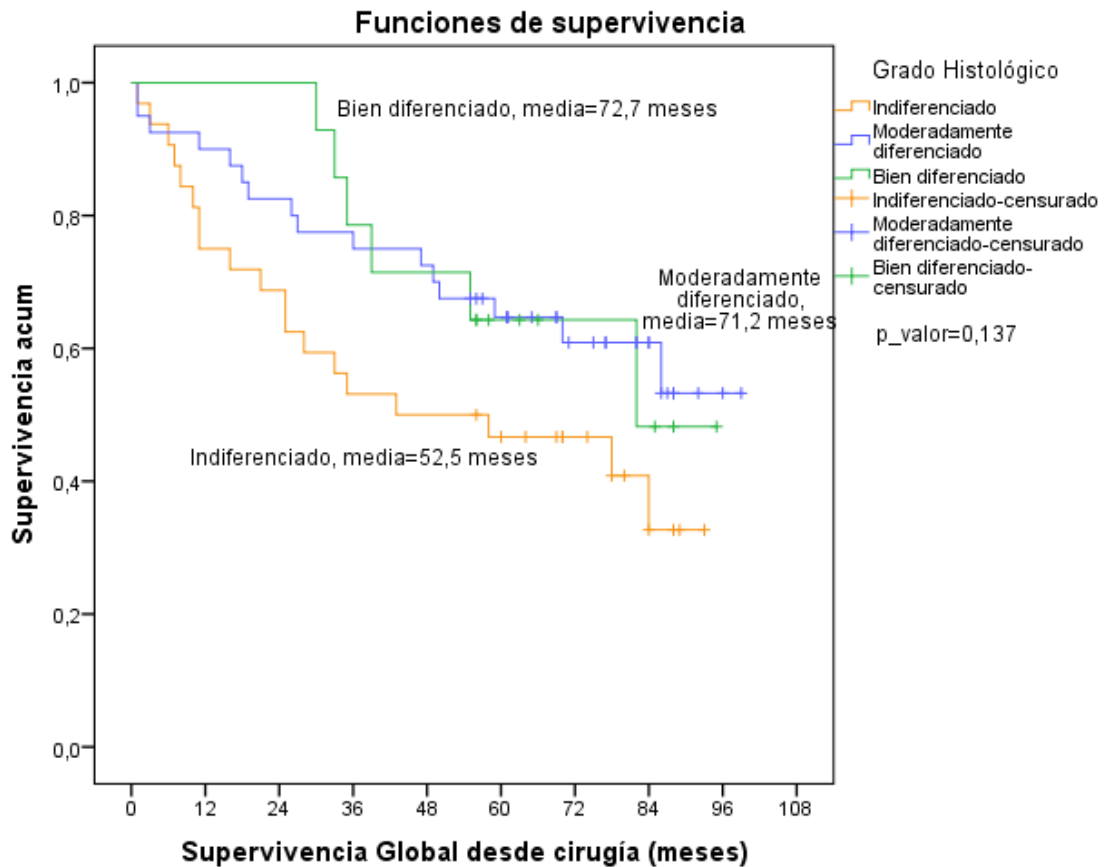
En nuestra serie se han unificado G3 y G4 para facilitar que los grupos analizados fueran más numerosos para la comparación, al tratarse de una serie pequeña. En general, se conoce que los tumores poco diferenciados tienen una mayor agresividad biológica que aquellos que son bien diferenciados.

En la tabla 9 se distribuyen por grado histológico los pacientes de esta serie (eliminado los 6 carcinoides, uno indefinido y el caso “sin tumor”).

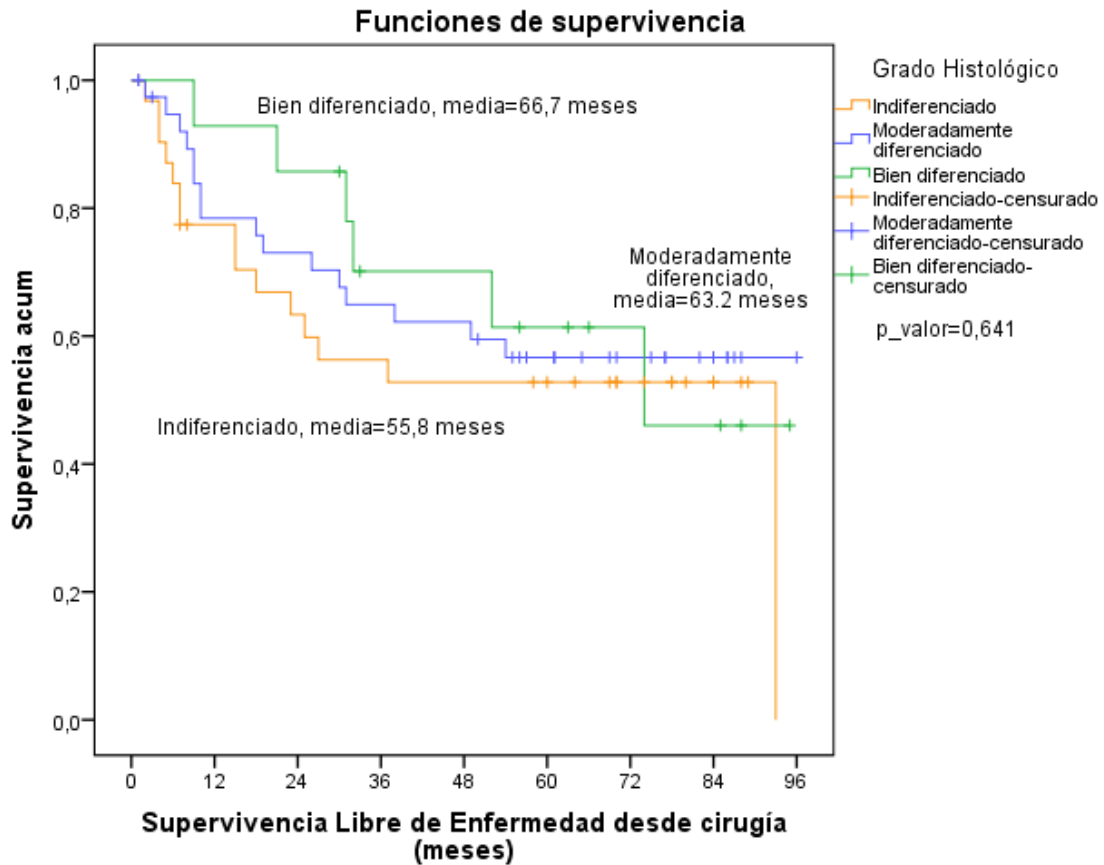
Tabla 9: Distribución por grado histológico

Grado Histológico	Nº total	Nº de eventos	Censurado	
			Nº	Porcentaje
Indiferenciado	32	19	13	40,6%
Moderadamente diferenciado	40	16	24	60,0%
Bien diferenciado	14	6	8	57,1%
Global	86	41	45	52,3%

No existen diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de SG o SLE entre los tres grupos (gráficas 19 y 20).



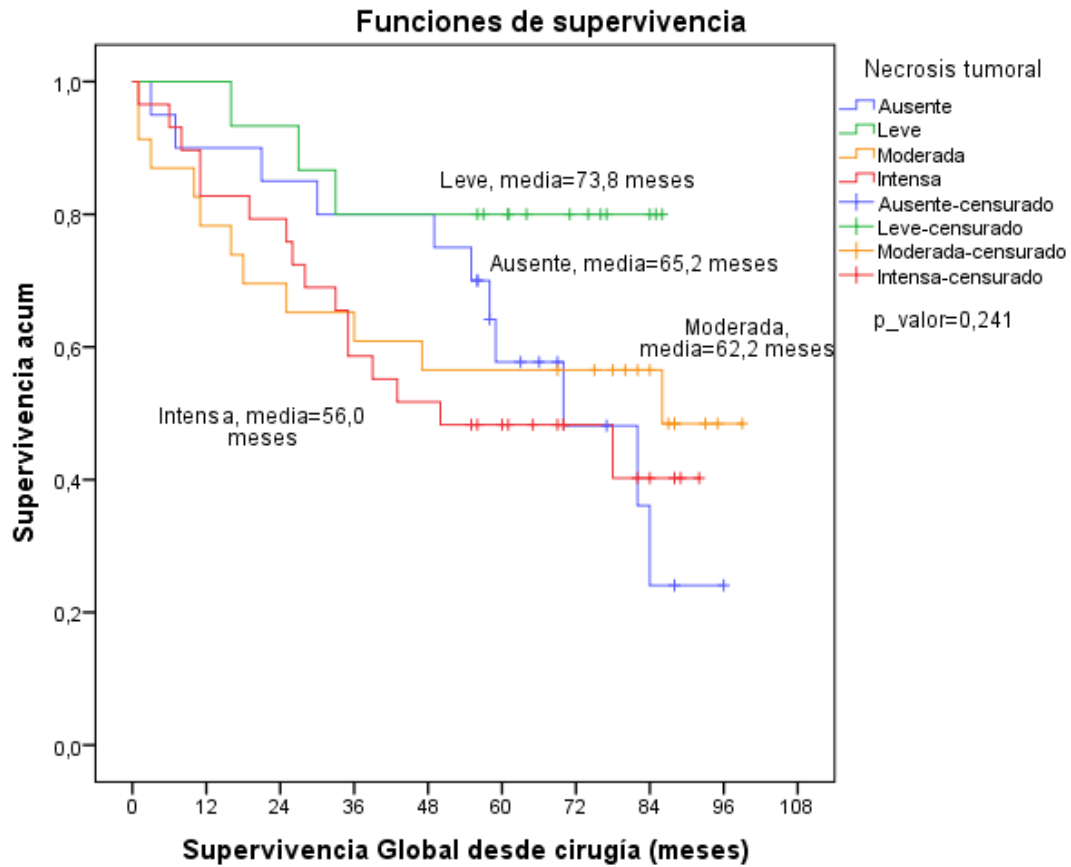
Gráfica 19: SG según grado histológico



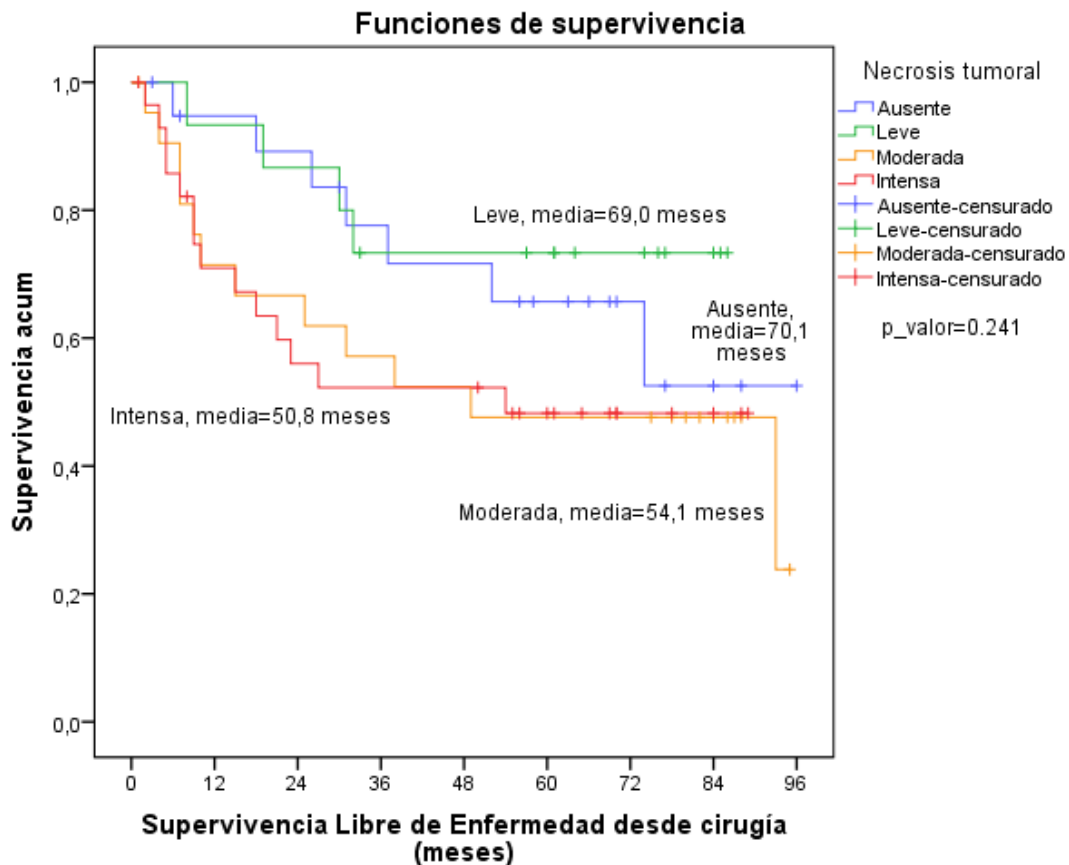
Gráfica 20: SLE según grado de diferenciación

La presencia de necrosis tumoral se conoce como un factor de mal pronóstico<sup>212</sup>, como ya se ha comentado previamente. Se suele clasificar el grado de necrosis en intensa, moderada o ausente. No deja de ser una característica cualitativa y, por tanto, dependiente del observador.

En nuestra serie, la necrosis tumoral parece no influir en SG ni en SLE como se puede ver en las gráficas 21 y 22.



Gráfica 21: SG según necrosis tumoral



Gráfica 22: SLE según necrosis tumoral

### 6.2.8 Invasión linfovascular

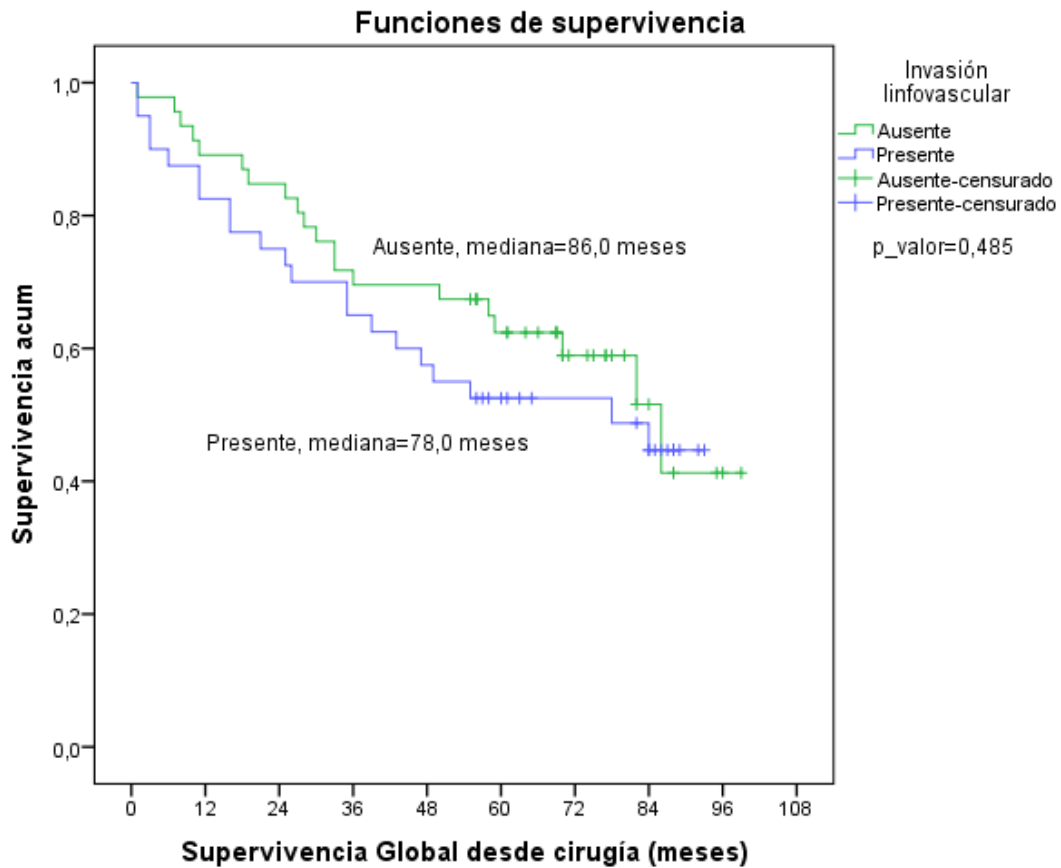
La invasión linfovascular se considera un factor de peor pronóstico en el CPNCP intervenido. Así lo demuestra un metaanálisis de 2011<sup>213</sup> con más de 16.000 pacientes analizados, aunque recomienda estudios prospectivos.

Se recoge esta característica histológica en nuestra serie en dos opciones: ausente o presente; con los siguientes datos (eliminando los 6 carcinoides, uno indefinido y el caso “sin tumor”) reflejados en la tabla 10:

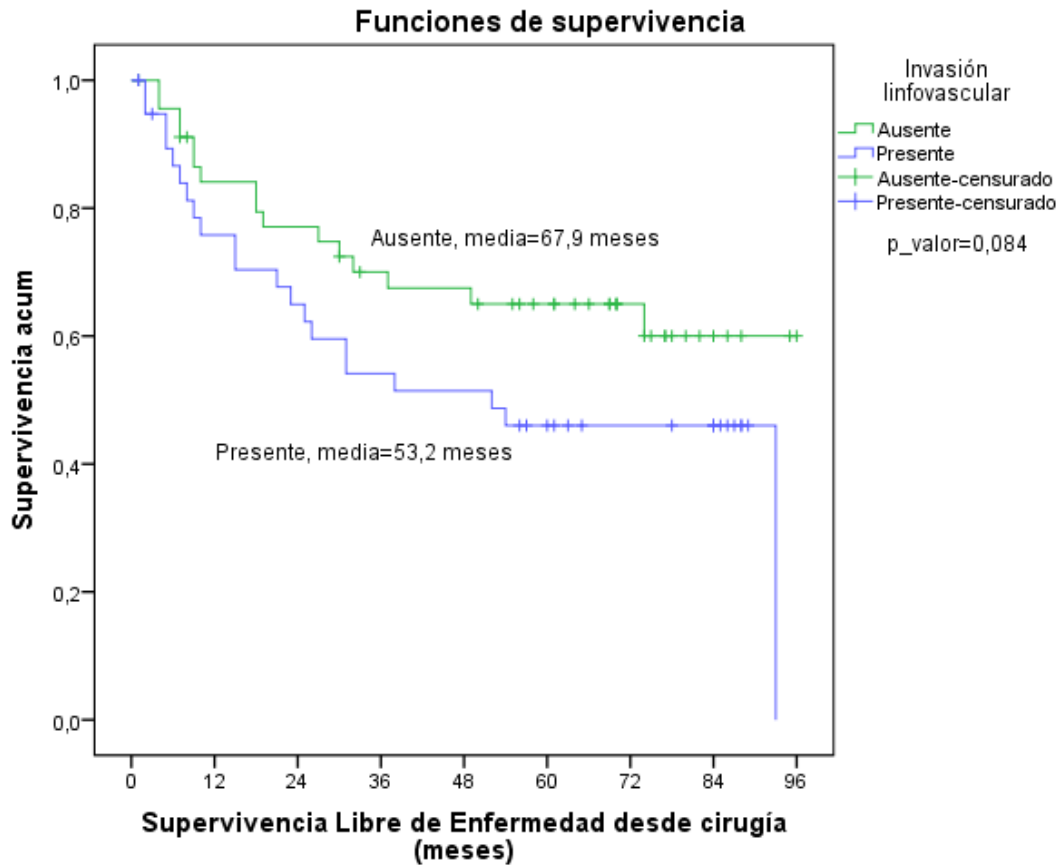
Tabla 10: Presencia de invasión linfovascular en nuestra población

<i>Invasión linfovascular</i>	
Ausente, n (%)	46 (52,9)
Presente, n (%)	40 (46,0)
Perdidos, n (%)	1 (1,1)

En la gráfica 23 y 24 mostramos que no se encuentran diferencias significativas ni en SG ni en SLE comparando ambos grupos.



Gráfica 23: SG según invasión linfovascular



Gráfica 24: SLE según invasión linfovascular

### 6.2.9 Tamaño tumoral

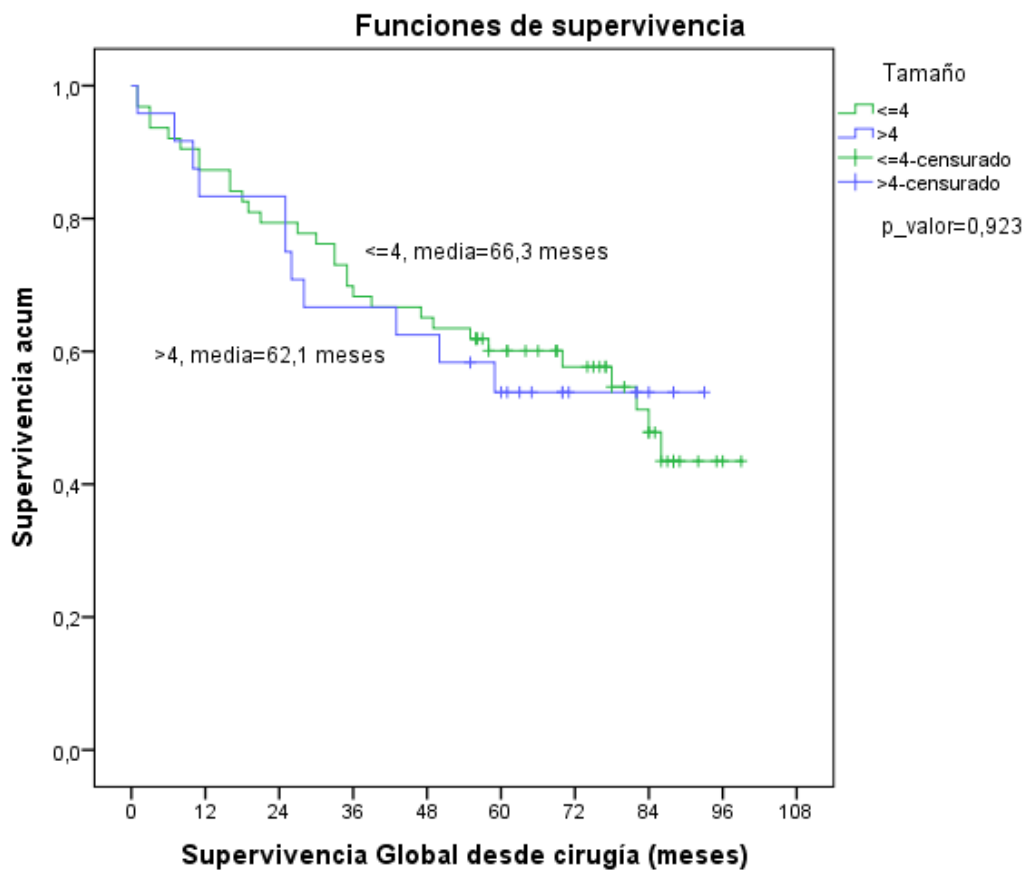
En el TNM se sigue utilizando el tamaño tumoral (medido como mayor diámetro del tumor) para clasificar la T, sin embargo, actualmente se está viendo que el volumen tumoral (medido de forma semiautomática a partir de TC utilizando un programa de software de imágenes) es más útil como factor pronóstico independiente que la T de forma individual<sup>214</sup>.

Para la decisión de administrar adyuvancia en un CPNCP E-IB intervenido, se considera el tamaño del tumor y otras características de mal pronóstico descritas anteriormente (grado diferenciación e invasión linfovascular) que nos hagan inclinarnos por administrar dicha adyuvancia. El ECOG debe tenerse también en cuenta y esto ya no sólo como aspecto clínico evidente, sino estadísticamente demostrado: en un estudio reciente, para los pacientes con ECOG 0 se observó una mejor SG a 5 años en el grupo que recibió adyuvancia con QT (79,3% vs 91,6%,  $p = 0.001$ ) y, por el contrario, para los pacientes con ECOG 1, la SG a 5 años mejoró significativamente en el grupo de observación (58,6% vs 17,2%,  $p = 0.021$ )<sup>215</sup>.

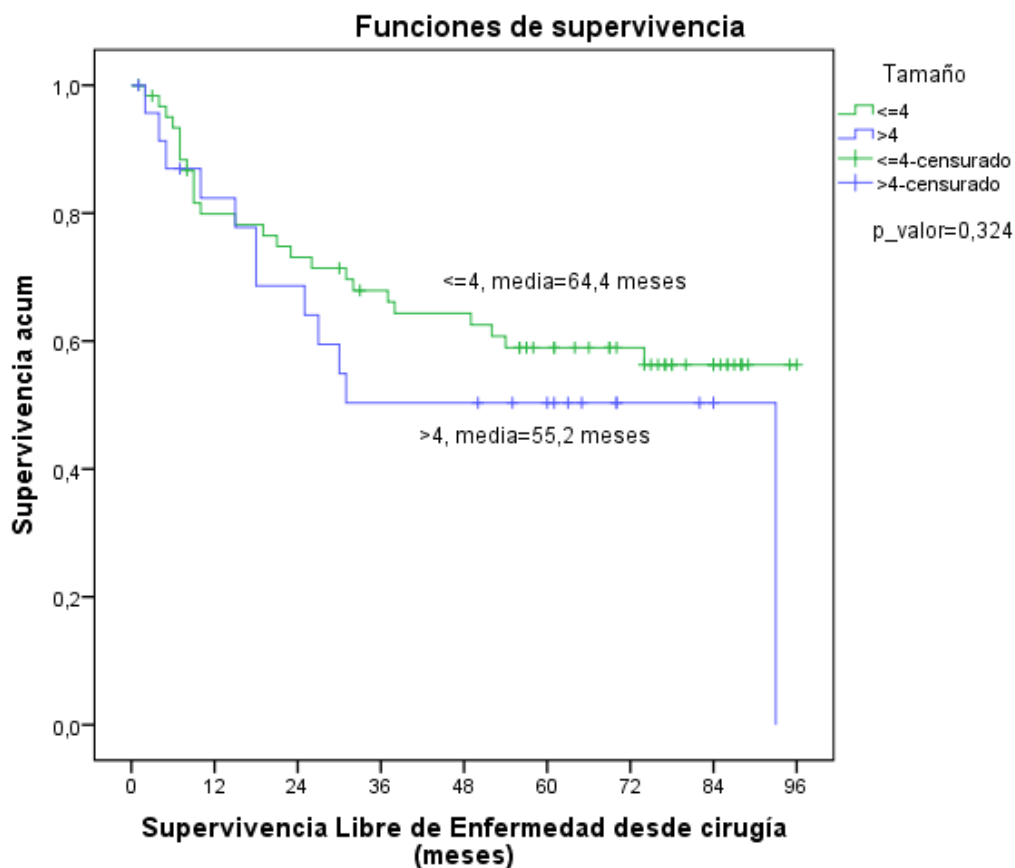


Strauss *et al.* mostraron en el estudio CALGB 9633, que la QT adyuvante tenía un efecto positivo en pacientes con tumores en estadio IB que midieran más de 4 cm<sup>216</sup>. Además, las directrices de la NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) indican desde hace años, que la QT adyuvante se puede usar para pacientes con CPNCP en estadio IB que tienen factores de alto riesgo, como tumor poco diferenciado, invasión vascular, resección en cuña, tamaño del tumor > 4 cm, invasión pleural y muestreo de ganglios linfáticos incompletos. Sin embargo, la evidencia para apoyar esta guía es insuficiente<sup>217</sup>.

Por estos motivos, en nuestra serie utilizamos ese punto de corte de 4 cm para analizar posibles diferencias en SG y SLE en cuanto a tamaño tumoral no encontrando diferencias significativas como podemos ver en las gráficas 25 y 26.



Gráfica 25: SG según tamaño > ó < 4 cm



Gráfica 26: SLE según tamaño  $> \text{ ó } < 4$  cm

### 6.2.10 EGFR

Como ya se ha descrito en el capítulo 3, para contextualizar los datos de nuestra serie, recordar que, uno de los objetivos de esta tesis ha sido analizar las mutaciones de EGFR en todos los pacientes no fumadores, exfumadores de más de 15 años y en todos los no escamosos (como se haría en CPNCP avanzado) y determinar la frecuencia de estas mutaciones.

El 58,5% de la población (55 pacientes de los 94) cumplen esos criterios clínicos para analizar si tenían algún tipo de mutación EGFR. A esta población de 55 pacientes la llamaremos en este apartado *población seleccionada*.

Como decíamos, el estudio de mutaciones de EGFR se ha realizado en el laboratorio del Hospital Virgen del Rocío siguiendo la técnica Kit Therascreen con la que se analiza mediante PCR en tiempo real mutaciones a nivel de los exones 18, 19, 20, 21 del gen EGFR. Es la técnica que se utiliza habitualmente en la práctica clínica asistencial. Este análisis ha sido financiado por FIBAO (Fundación para la Investigación Biosanitaria de Andalucía Oriental).

### **Análisis descriptivo**

Los datos de nuestra muestra los podemos ver en la tabla 11. Tan sólo en 5 pacientes encontramos mutación EGFR, lo que supondría un 5,3-5,6% de nuestra población (con o sin carcinoides respectivamente) y un 9% de la *población seleccionada*. Este porcentaje es menor al encontrado en estudios de grandes series de pacientes con CPNCP avanzado o metatásico<sup>165</sup> donde la actEGFRm se ha reportado en el 10-15% de la población caucásica. En este dato inferior puede influir que en 10 pacientes de los seleccionados clínicamente no se ha podido analizar la mutación actEGFRm por distintos motivos (poca calidad de la muestra, fallo del análisis, etc). En la tabla 12 mostramos las mutaciones encontradas en nuestros 5 pacientes.

Tabla 11: Resultado del análisis de actEGFRm en la población seleccionada

<i>actEGFRm</i>	
wt, n (%)	40 (72,7)
Mutado, n (%)	5 (9,1)
No valorable, n (%)	10 (18,2)

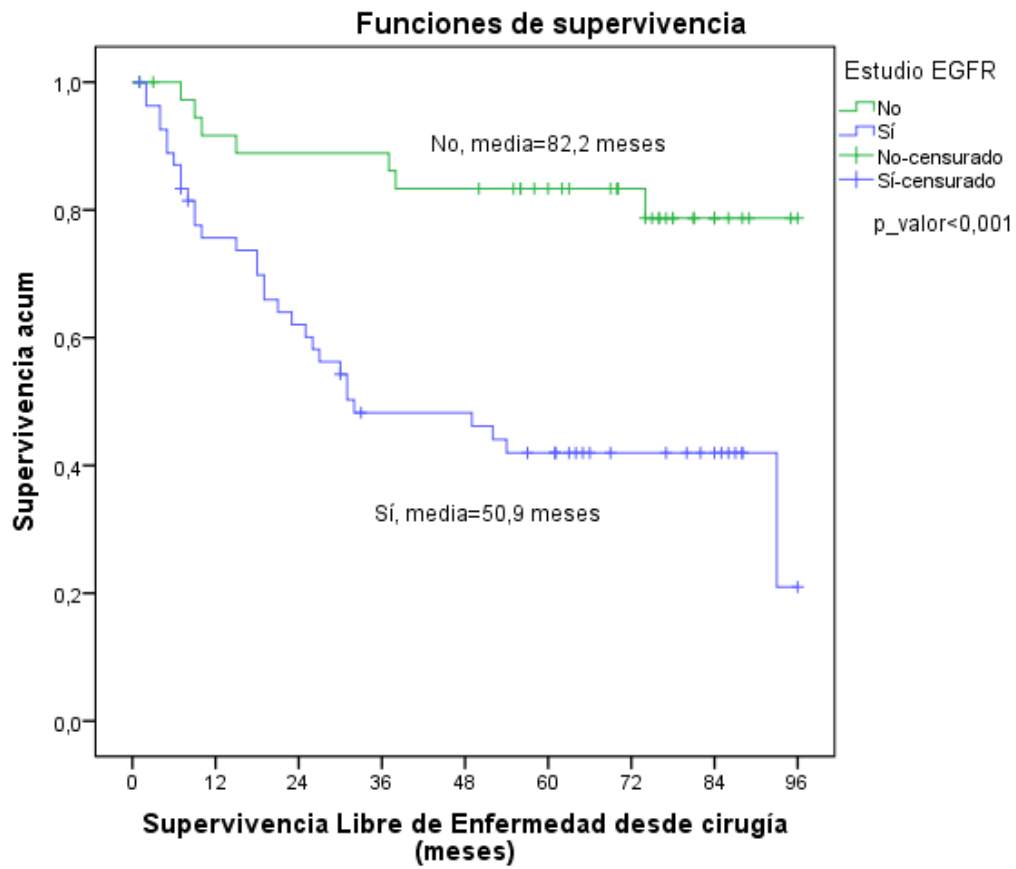
Tabla 12: Distribución de mutaciones EGFR encontradas

<i>Mutaciones</i>	
EXÓN 19 (delección), n (%)	1 (20,0)
EXÓN 20 (S7681) / EXÓN 18 (G719X), n (%)	2 (40,0)
EXÓN 21 (L858R), n (%)	2 (40,0)

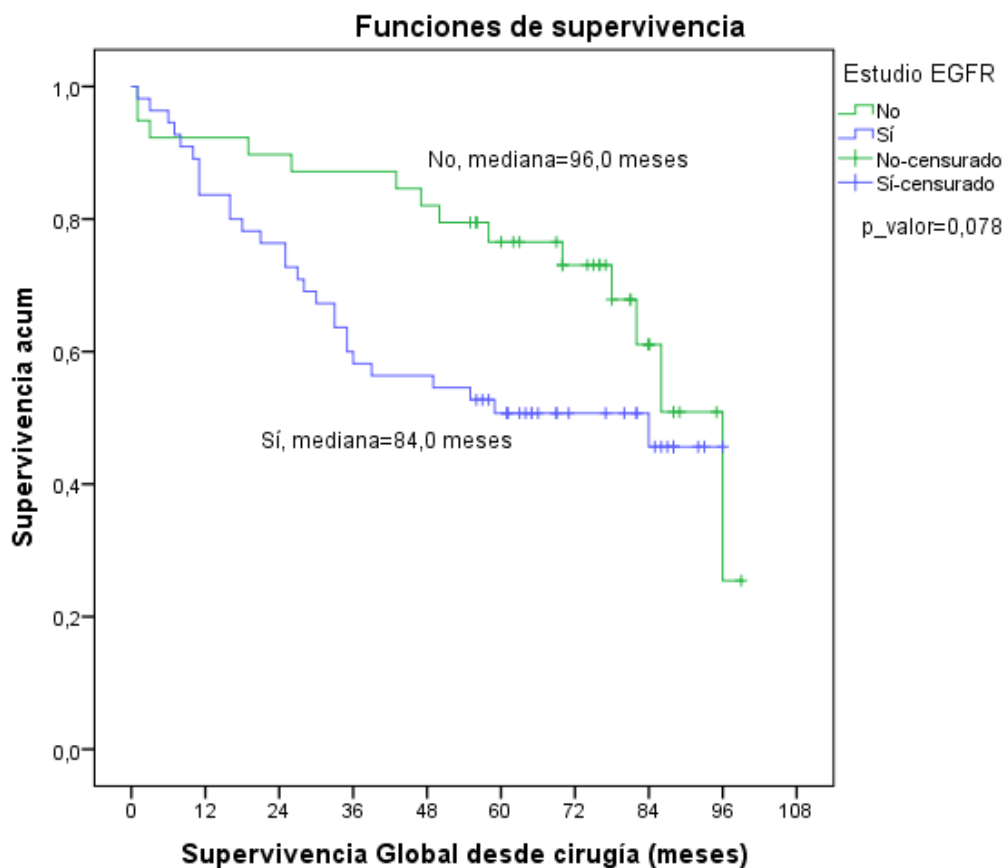
De esto cinco pacientes dos son mujeres y tres hombres, ninguno es fumador. Sólo un paciente tenía criterios leves de EPOC, el resto, no. Todos son ADC, tres de ellos del subtipo acinar. Los 5 se intervinieron siendo un estadio I (Ia 2 pacientes y Ib 3 pacientes). Tan sólo un paciente precisó de adyuvancia con QT. Dos de ellos han recidivado a distancia, pero ninguno ha fallecido a fecha del corte de seguimiento.

### **Análisis de supervivencia**

Es muy interesante analizar el dato de SLE (gráfica 27) y SG (gráfica 28) comparando la *población seleccionada* (pacientes no fumadores, exfumadores de más de 15 años y todos los no escamosos) con el resto. Se comprueba que existen diferencias en SLE a favor de los “no seleccionados” y, sin embargo, no hay diferencias en SG. Se podría decir que, aunque recaen más los seleccionados clínicamente, finalmente no hay diferencias en SG.



Gráfica 27: SLE población seleccionada vs no seleccionada



Gráfica 28: SG población seleccionada vs no seleccionada

Se obtienen datos similares si excluimos del análisis a los 6 pacientes carcinoides;  $p\_valor = 0,002$  para SLE y  $p\_valor = 0,192$  para SG.

En las cuatro tablas siguientes se describen las recidivas y fallecimientos en la población total (con o sin carcinoides) según estudio de EGFR.

Tabla 13: N° de recidivas en población total según estudio de EGFR

<i>Estudio EGFR</i>	<i>N° total</i>	<i>N° de recidivas</i>	<i>Censurado</i>	
			<i>N°</i>	<i>Porcentaje</i>
No	39	7	32	82,1%
Sí	55	31	24	43,6%
Global	94	38	56	59,6%

Tabla 14: N° de recidivas en población total sin carcinoides según estudio de EGFR

<i>Estudio EGFR</i>	<i>N° total</i>	<i>N° de recidivas</i>	<i>Censurado</i>	
			<i>N°</i>	<i>Porcentaje</i>
No	33	7	26	78,8%
Sí	55	31	24	43,6%
Global	88	38	50	56,8%

Tabla 15: N° de fallecimientos en población total según estudio de EGFR

<i>Estudio EGFR</i>	<i>N° total</i>	<i>N° de fallecim.</i>	<i>Censurado</i>	
			<i>N°</i>	<i>Porcentaje</i>
No	39	14	25	64,1%
Sí	55	28	27	49,1%
Global	94	42	52	55,3%

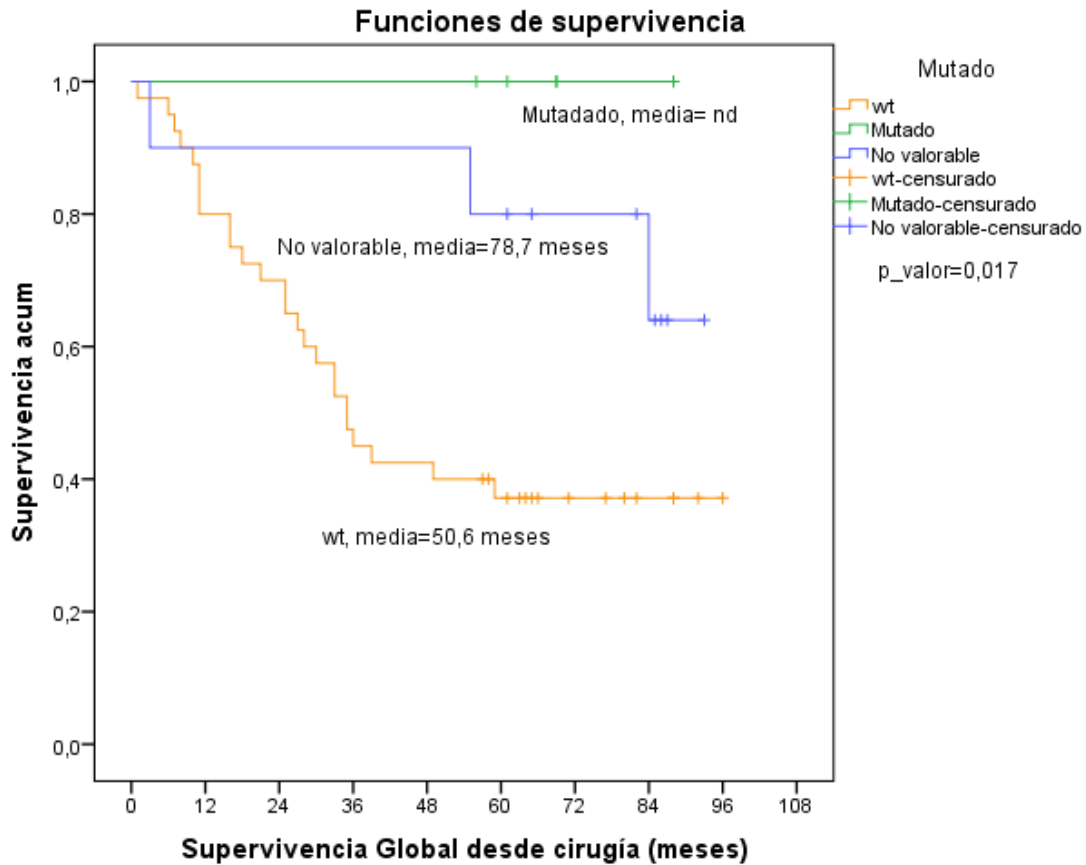
Tabla 16: N° de fallecimientos en población total sin carcinoides según estudio de EGFR

<i>Estudio EGFR</i>	<i>N° total</i>	<i>N° de fallecim.</i>	<i>Censurado</i>	
			<i>N°</i>	<i>Porcentaje</i>
No	33	13	20	60,6%
Sí	55	28	27	49,1%
Global	88	41	47	53,4%

Ninguno de los 5 pacientes mutados ha fallecido (tabla 17). Al analizar la SG dentro del grupo de 55 pacientes seleccionados, se observa que hay diferencias estadísticamente significativas (gráfica 29); las diferencias se encuentran entre las curvas de la categoría no mutado y mutado,  $p_{\text{valor}} = 0,028$ .

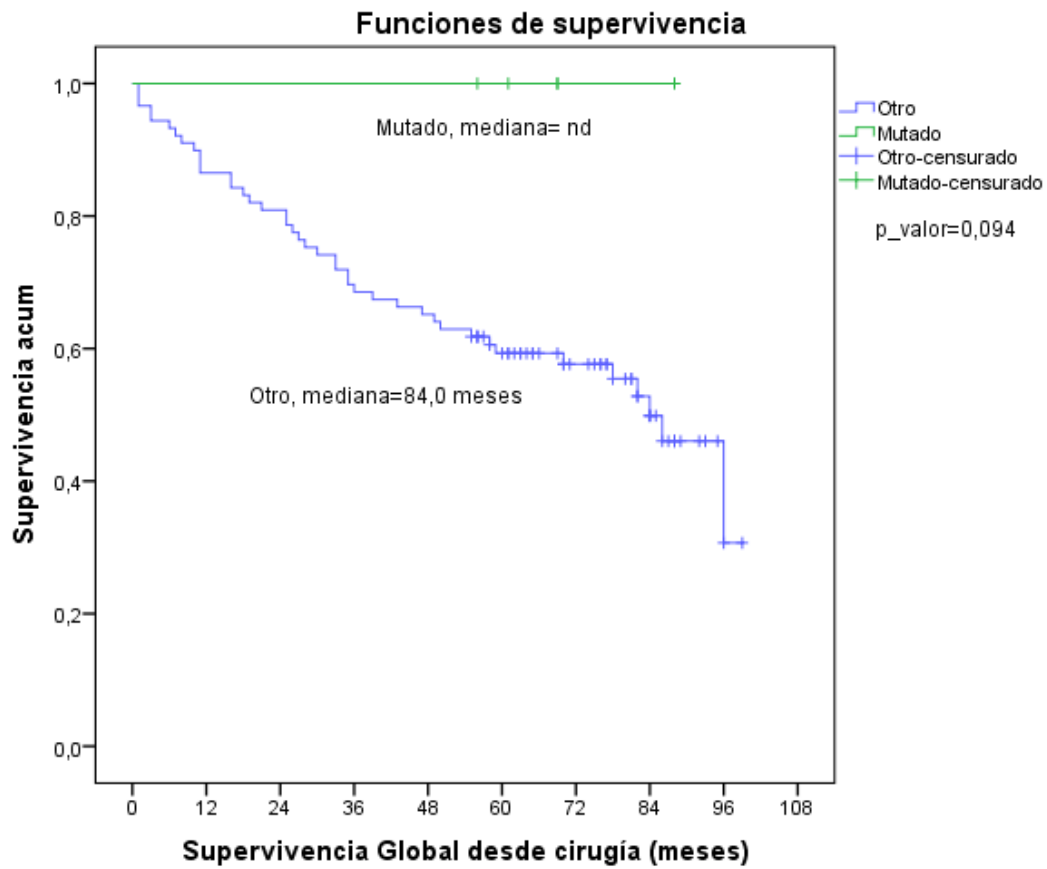
Tabla 17: Resultado del análisis de actEGFRm en la población seleccionada

<i>Mutado</i>	<i>N° total</i>	<i>N° de Fallecim.</i>	<i>Censurado</i>	
			<i>N°</i>	<i>Porcentaje</i>
wt	40	25	15	37,5%
Mutado	5	0	5	100,0%
No valorable	10	3	7	70,0%
Global	55	28	27	49,1%



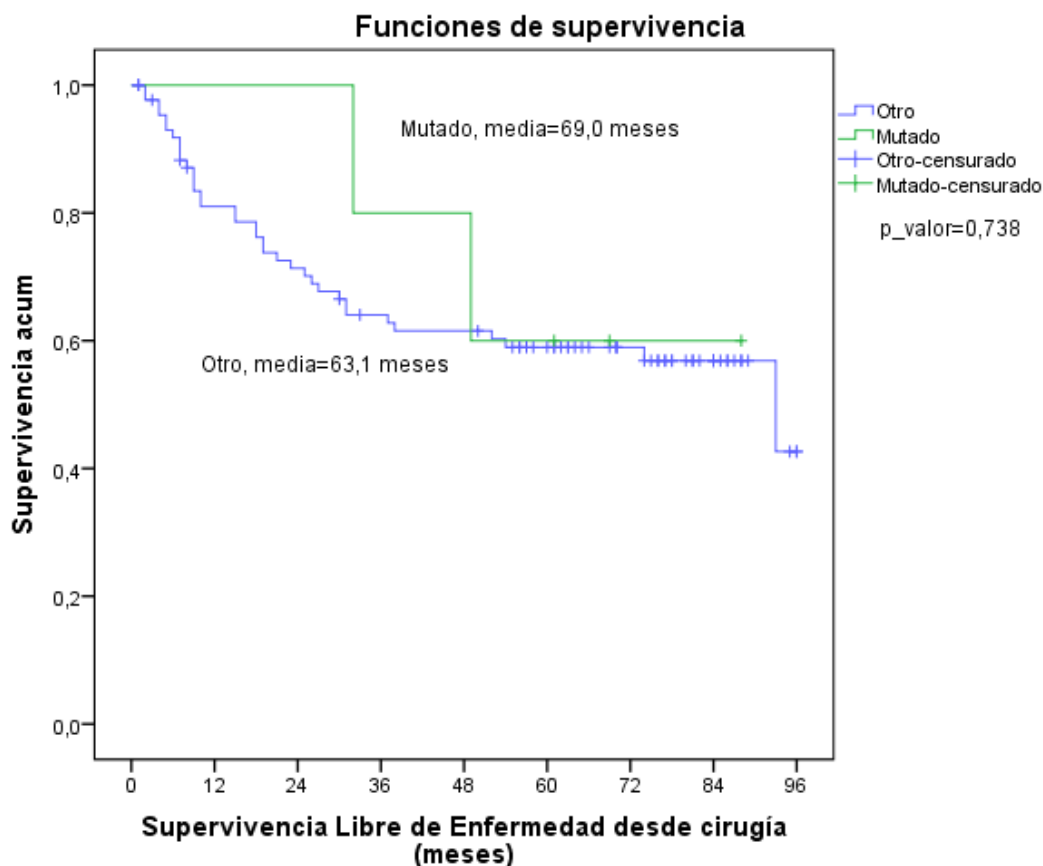
Gráfica 29: SG según resultado actEGFRm en la población seleccionada

Realizando el mismo análisis incluyendo todos los pacientes de la muestra no se observan diferencias estadísticamente significativas (gráficas 30 y 31). Esto puede deberse a que al ser una  $n$  tan pequeña de mutados, no tiene peso suficiente para encontrar diferencias significativas.



Gráfica 30: SG en población mutada vs resto de la población total





Gráfica 31: SLE en población mutada vs resto de la población total

Aunque según grandes estudios<sup>58,167</sup>, las actEGFRm ocurren en momentos precoces de la patogénesis de CP, en nuestro trabajo se encuentra un porcentaje inferior al esperado. Ya se ha comentado que por distintos motivos técnicos no se ha podido evaluar la presencia de estas mutaciones en 10 pacientes seleccionados clínicamente. Aun así, parece que la repercusión asistencial de la administración de adyuvancia con osimertinib va a ser muy puntual, 1-3 casos por año. Por su eficacia, ya descrita previamente, se hace necesario hacer el esfuerzo de diagnosticar a aquellos pacientes que tienen esta alteración molecular. De hecho, ya se está estudiando su uso también en neoadyuvancia (NeoADAURA, NCT04351555<sup>218</sup>).

### 6.2.11 Expresión PD-L1, TIL y TGF- $\beta$

De los 94 pacientes incluidos en este trabajo, 55 pacientes tenían muestras disponibles para el análisis de expresión de PD-L1, TIL y TGF- $\beta$ . Un análisis comparativo entre los pacientes con muestra analizable ( $n = 55$ ) y los que no la tenían ( $n = 39$ ) no encontró diferencias significativas en la distribución de las variables consideradas más importantes en la evolución de la enfermedad: sexo, edad, histología

escamosa vs. no escamosa, estadio (I, II, III), tipo de cirugía y administración de QT (tabla18).

Tabla 18: Estudio comparativo de pacientes con y sin muestra analizable.

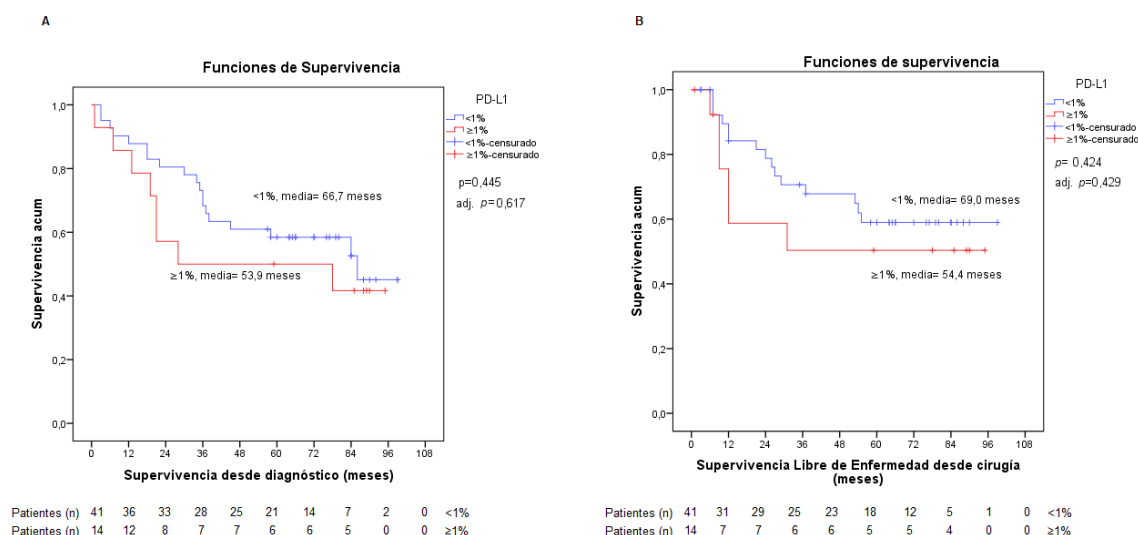
	<i>Muestra</i>		p-valor
	No (n=39)	Sí (n=55)	
<i>Sexo, n (%)</i>			0.111
Hombre	29 (74.4)	49 (89.1)	
Mujer	10 (25.6)	6 (10.9)	
<i>Edad, media (DE)</i>	63.62 (10.13)	63.93 (9.74)	0.881
<i>Histología, n (%)</i>			1.000
Carcinoma escamosos	14 (42.4)	23 (42.6)	
No escamoso	19 (57.6)	31 (57.4)	
<i>Estadio, n (%)</i>			0.350
I	19 (50.0)	33 (60.0)	
II	15 (39.5)	14 (25.5)	
III	4 (10.5)	8 (14.5)	
<i>Tipo de cirugía, n (%)</i>			0.937
Segmentectomía o resección en cuña	3 (7.7)	4 (7.3)	
Lobectomía	29 (74.4)	39 (70,9)	
Neumonectomía	7 (17.9)	12 (21.8)	
<i>Quimioterapia, n (%)</i>			0.230
No	17 (43.6)	33 (60.0)	
Adyuvante	17 (43.6)	15 (27.3)	
Neo Adyuvante	5 (12.8)	7 (12.7)	
Las variables categóricas se representan por frecuencia y porcentaje. La edad se representa mediante la media y la desviación estándar (DE). Los valores p se calcularon mediante la prueba t-Student, la prueba chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, según procediera.			

Las características de los pacientes con muestra disponible para evaluación y la comparación de la distribución según las variables en estudio se muestran en la tabla 27 (en anexo). De los 55 pacientes, más del 48% habían fallecido, el 38,18% habían recaído (21 recaídas) y el 12% (7 pacientes) habían desarrollado un segundo tumor pulmonar (3 pacientes) u otro cáncer primario. Se determinó la SG y la SLE en nuestra muestra mediante un modelo de regresión de Cox en función de las siguientes

características: sexo, edad, histología escamosa frente a no escamosa, estadio, tipo de cirugía, mutación del EGFR y administración de QT. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la SG según la estadificación. Así pues, se confirma que en esta selección de muestras disponibles, la estadificación fue el único factor pronóstico independiente en términos de supervivencia, y que una estadificación más baja significaba una tasa de supervivencia más alta.

### Expresión de PD-L1

El análisis de la expresión de PD-L1 se realizó cualitativamente de dos formas: en tres bloques <1% (41 pacientes), entre 1-49% (5 pacientes) y  $\geq 50\%$  (9 pacientes); o en dos bloques, agrupando  $\geq 1\%$  global (14 pacientes) frente a <1% (41 pacientes). Tras el análisis de ambas clasificaciones de PD-L1, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en la SG ni en la SLE. Los datos de la comparación PD-L1  $\geq 1\%$  frente a <1% se representan en la gráfica 32.



Gráfica 32: Análisis de la SG (A) y la SLE (B) según la expresión de PD-L1 <1% o  $\geq 1\%$

Adj. p: valor p del modelo de regresión de Cox ajustado por estadio.

Se considera que estos resultados debían ajustarse por la variable estadiaje, ya que se conocía su influencia en la SG. Como se observa en la gráfica, no se encontraron diferencias al ajustar por estadiaje.

También se ajustaron los resultados de la expresión de PD-L1 por sexo y edad y, en última instancia, por sexo y estadio, sin obtener resultados estadísticamente relevantes en ninguno de los dos casos.

Por lo tanto, la variable PD-L1 no apareció como un posible factor de riesgo para la SG o la SLE, incluso cuando se ajustó por sexo, edad y estadio. Del mismo modo,

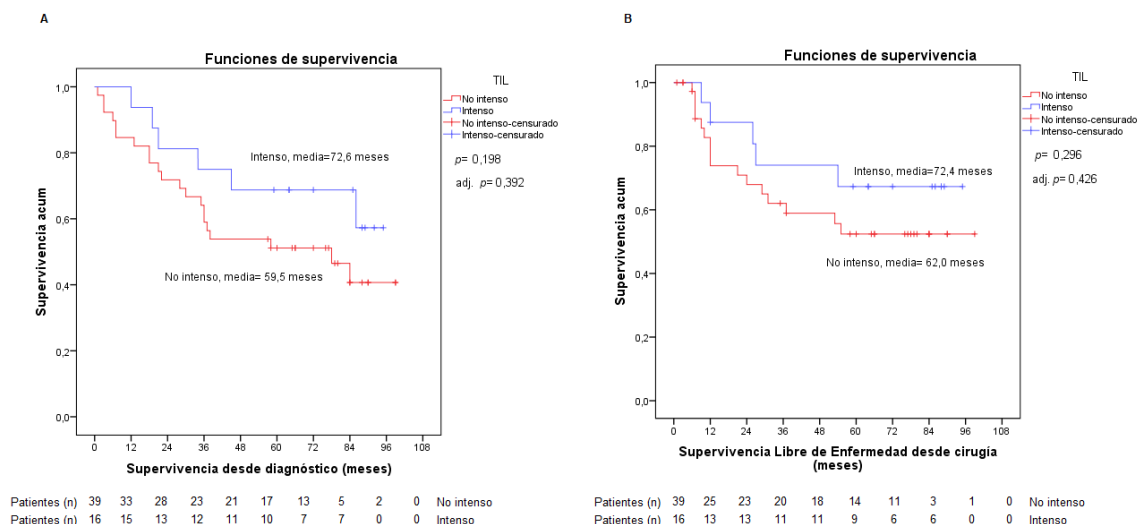
nuestro análisis no arrojó ninguna relación entre la expresión de PD-L1 y las otras dos variables estudiadas (TILs y TGF- $\beta$ ), con un p-valor de 0,306 para TILs, 0,172 para TGF- $\beta$  y 1,000 para tinción nuclear, respectivamente.

Aunque se sabe que PD-L1 desempeña una función importante en la supresión de la respuesta inmunitaria, su valor pronóstico sigue siendo objeto de debate (apartado 2.6.2) y su papel en el MAT aún no se ha dilucidado por completo<sup>126</sup>. La expresión de PD-L1 por IHQ es particularmente controvertida como biomarcador de ICIs debido a los resultados discordantes en investigaciones recientes<sup>127</sup>. A pesar de que algunos estudios han hallado una sólida correlación entre la expresión elevada de PD-L1 y un peor pronóstico<sup>128</sup> y la respuesta al tratamiento tras QT y RT concurrentes<sup>37,129</sup>, nuestro análisis sugiere que la expresión elevada de PD-L1 no tiene importancia pronóstica. Esto concuerda con estudios recientes<sup>131</sup> que revelan que la expresión de PD-L1 está influida por el estadio del tumor, lo que puede limitar su uso como indicador predictivo y pronóstico. La incidencia de la expresión de PD-L1 (por 22C3) en pacientes con CPNCP resecable es relativamente menor en comparación con los pacientes con un estadio más avanzado. Este hecho también concuerda con el bajo porcentaje de valores elevados de PD-L1 observado en nuestra población. A este respecto, Tuminello *et al.*<sup>126</sup> también concluyeron que las características de los pacientes, como el sexo y el estadio, pueden influir tanto en la composición inmunitaria del MAT como en la supervivencia posquirúrgica y, por tanto, pueden distorsionar su verdadera relación. Más recientemente, los datos analizados por el grupo GILT<sup>132</sup> también han confirmado que la expresión tumoral de PD-L1 no parece afectar al pronóstico del CP en estadio temprano. La disparidad de resultados entre los distintos estudios puede explicarse por la falta de estandarización de las diversas técnicas analíticas disponibles (es decir, el uso de diferentes anticuerpos, plataformas y umbrales de corte) y la variación entre observadores<sup>133</sup>.

Nuestros resultados, por tanto, concuerdan con lo publicado hasta la fecha. La expresión de PD-L1 interesa por su implicación como biomarcador predictivo de respuesta a ICIs, pero no orienta como biomarcador pronóstico, sobre todo en estadios iniciales donde su expresión es menor.

### ***Presencia de TIL***

Como se ha descrito previamente, la presencia de TIL se ha evaluado de forma dicotómica (intensa, no intensa). En nuestro estudio, 39 pacientes presentaban TIL intensos, mientras que 16 tenían TIL no intensos. Nuestro análisis reveló indicios muy moderados de significación, con un mejor pronóstico en términos de SG con TIL intensos (gráfica 33). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la SLE entre los dos grupos. El ajuste de estos datos con la variable de estadificación tampoco generó cambios estadísticos. Los ajustes por sexo y edad, y sexo y estadio, tampoco modificaron nuestros hallazgos.

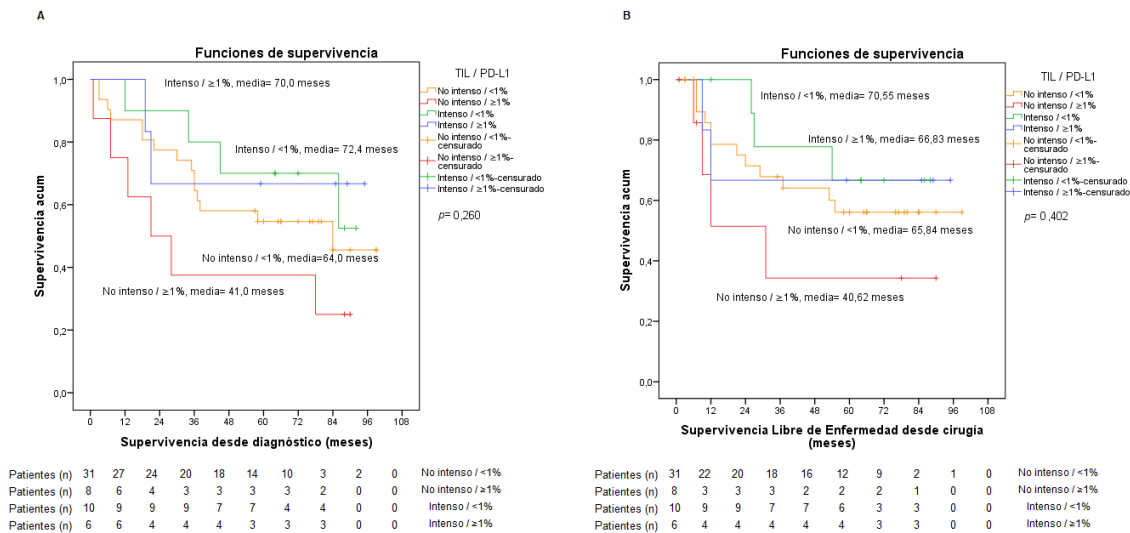


Gráfica 33: Análisis de SG (A) y SLE (B) según la expresión intensa o no intensa de TIL

Adj. p: valor p del modelo de regresión de Cox ajustado por estadio.

Por lo tanto, la variable TIL no se manifestó como un factor de riesgo para la SG y la SLE, ajustada por sexo, edad y estadio. Posteriormente, se evaluó la posible relación estadística con las otras variables (PD-L1 y TGF- $\beta$ ), y como ya se ha mencionado anteriormente, no se encontró ninguna relación entre esta variable y PD-L1. Nuestros resultados tampoco hallaron ninguna asociación significativa, con valores de p de 0,402 con respecto al TGF- $\beta$  y de 0,645 con respecto a la tinción nuclear.

Teniendo en cuenta el teórico valor pronóstico negativo de la expresión elevada de PD-L1 y el valor pronóstico positivo de los TIL intensos, analizamos ambas variables conjuntamente sin encontrar datos estadísticamente relevantes, pero sí objetivamos que nuestra muestra cumplía estas tendencias (gráfica 34).



Gráfica 34: Análisis de SG (A) y SLE (B) según expresión de PD-L1  $< 1\%$  o  $\geq 1\%$  y TIL intenso - no intenso

Los TIL han ganado actualmente una atención creciente en el tratamiento y pronóstico del CPNCP, ya que constituyen un reflejo histopatológico local de la respuesta inmunitaria del huésped contra las células tumorales. En este sentido, varios estudios<sup>114,118,119</sup>, incluido el nuestro, analizaron la densidad de linfocitos infiltrantes de tumores y su papel en la progresión del cáncer, revelando que niveles elevados de TIL se correlacionaban con una mayor SG y que los TIL se expresaban en mayor medida en estadios tempranos de la enfermedad. De hecho, nuestro análisis mostró una mayor expresión de TIL en pacientes con CP operable en estadios tempranos e indicios moderados de significación con un mejor pronóstico en términos de SG con puntuaciones intensas de TIL. Cabe destacar que la expresión de TIL no se ve alterada por la posible pérdida de antigenicidad tisular, un factor que podría influir en la expresión de PD-L1. En general, estos hallazgos pueden sugerir que los TIL parecen ser un mejor marcador pronóstico de supervivencia que PD-L1, al menos para el CP en estadio temprano.

Sin embargo, nuestros resultados están en consonancia con pruebas recientes<sup>131,132,219</sup>, que no apoyan la expresión de PD-L1, el estado de los TIL o la combinación de ambos como indicadores pronósticos significativos para el CPNCP resecable. Independientemente de la evidencia, la presencia de TIL elevados pone de manifiesto el papel clave que desempeña el sistema inmunitario en la evolución tumoral y en el pronóstico del paciente. Así, artículos recientes empiezan a sugerir que la infiltración inmunitaria podría utilizarse para determinar qué pacientes se beneficiarían más de la inmunoterapia adyuvante o neoadyuvante<sup>126,127</sup>. Por ejemplo, en el estudio PIONeR<sup>220</sup>, los pacientes con CPNCP avanzado que respondían a ICIs antiPD-L1 (nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab) tenían un mayor porcentaje de células

tumorales PDL1-positivas y una mayor infiltración de linfocitos citotóxicos infiltrantes de tumor. En este sentido, existen varios intentos de clasificar los tumores en función de la expresión de PD-L1 y de la infiltración linfocítica<sup>221,222</sup>, con las consiguientes implicaciones terapéuticas. De hecho, el desarrollo de una puntuación inmunológica puede surgir como un posible enfoque novedoso para identificar a los pacientes que se beneficiarían de nuevas terapias inmunológicas.

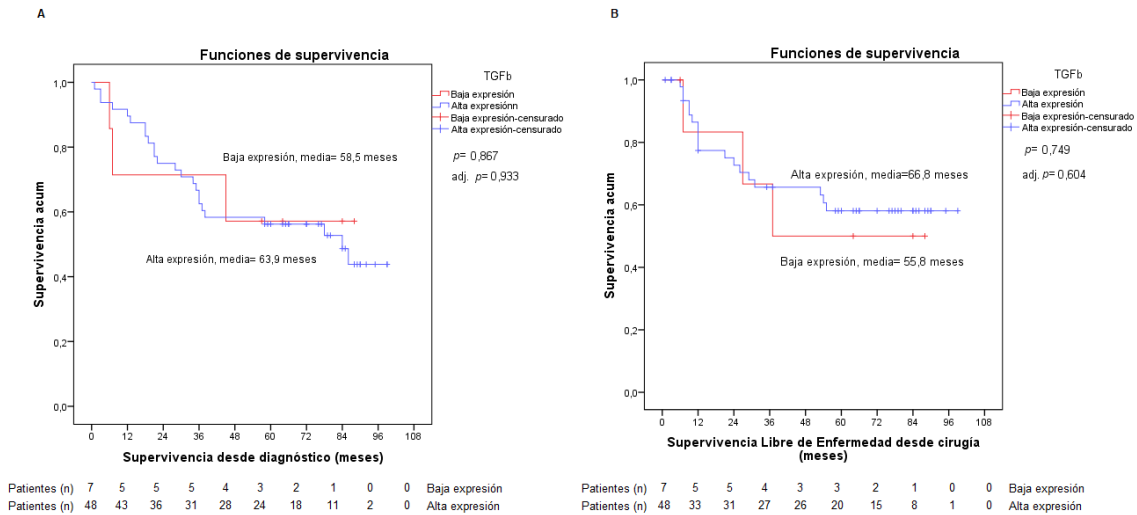
Por lo tanto, la evaluación de la infiltración de células inmunitarias y de la expresión de PD-L1 debería ser una práctica habitual en el tratamiento de los pacientes con CP, a pesar de su escasa relevancia pronóstica.

### ***Evaluación de la expresión de TGF- $\beta$***

La expresión de TGF- $\beta$  se está postulando como un posible mecanismo desencadenante de las diferentes respuestas a los ICIs. Así, la inhibición del TGF- $\beta$  afecta a la producción de células T reguladoras y puede, potencialmente, aumentar el efecto de los inhibidores de PD-1/PD-L1. De hecho, los ensayos clínicos han demostrado la seguridad y la actividad de los enfoques terapéuticos dirigidos simultáneamente a las vías PD-1/PD-L1 y TGF- $\beta$ , y ya se han publicado los primeros datos prometedores a este respecto<sup>155</sup>. Estas pruebas sugirieron la importancia potencial de la expresión de TGF- $\beta$  en el CP y, por tanto, su posible uso como biomarcador pronóstico y predictivo de esta enfermedad. Además, el TGF- $\beta$  desempeña un papel importante en la alteración de las células cancerosas epiteliales tempranas a células cancerosas metastásicas invasivas mediante la promoción de la EMT<sup>156</sup>, y recientemente se ha afirmado que su alta expresión podría predecir significativamente un mal pronóstico en pacientes con CPNCP, ya que también estimula la angiogénesis e induce inmunosupresión<sup>157</sup>.

En este sentido, se consideró interesante evaluar el valor pronóstico del TGF- $\beta$  en nuestra población muestral dividiendo sus valores de expresión en dos grupos (baja expresión y alta expresión), tal y como se realizó en los estudios de Xue *et al.* 2011<sup>187</sup> y Huang *et al.* 2014<sup>188</sup>. Además se procuró mejorar la metodología para evaluar la expresión de TGF- $\beta$  mediante la evaluación IHQ de la tinción nuclear de forma similar a otros marcadores en otras patologías<sup>189,190</sup>, ya que, hasta donde es conocido, aún no se había aplicado para evaluar la relevancia pronóstica de TGF- $\beta$  en el CPCNP.

Por tanto, se clasificaron nuestros pacientes en dos categorías: aquellos con baja expresión de TGF- $\beta$  (n = 7) y aquellos con alta expresión (n = 48); ningún paciente fue analizado como negativo. En nuestro análisis estadístico, no se encontraron diferencias significativas entre todos los pacientes TGF- $\beta$  unificados en baja o alta expresión (1 frente a 2-3). La gráfica 35 muestra estos datos y su ajuste por estadiaje, como en las variables anteriores.

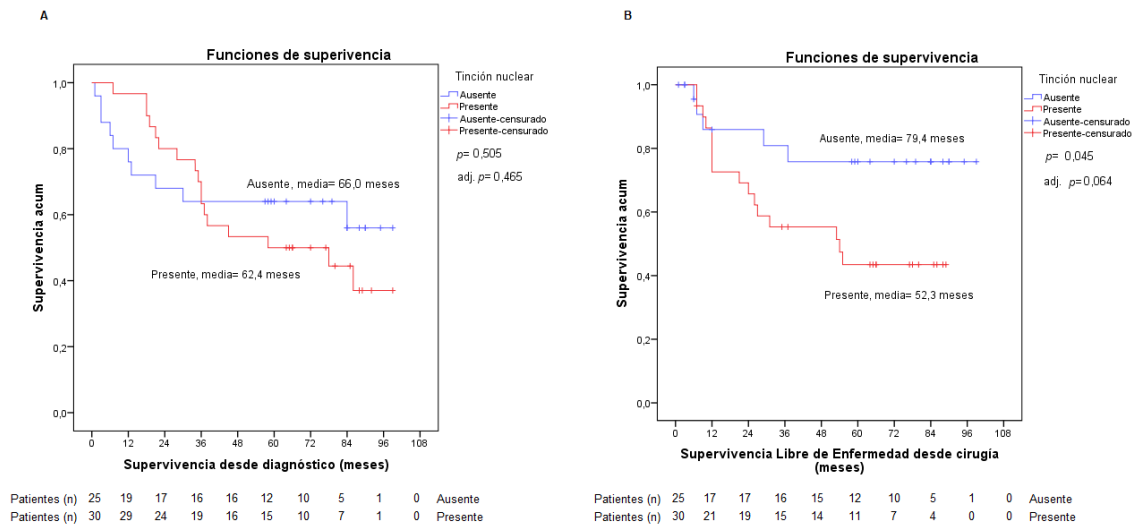


Gráfica 35: Análisis de SG (A) y SLE (B) en función de la baja o alta expresión de TGF- $\beta$

Adj. p: valor p del modelo de regresión de Cox ajustado por estado.

Sin embargo, al analizar la tinción nuclear de TGF- $\beta$ , según la variable dicotómica ausente ( $n = 25$ ) y presente ( $n = 30$ ), se encontró significación estadística en las curvas de SLE a favor de la tinción nuclear ausente, con un valor p de 0,045. Este resultado no se observó en la SG; sin embargo, la significación se mantuvo al ajustar el resultado con las variables edad y sexo [p-valor: 0,044, HRa: 2,832, IC HRa: (1,029-7,794)], y también se mantuvo muy cerca de la significación si el ajuste se realiza por estadiaje [p-valor 0,064, HRa: 2,597, IC HRa: (0,946 - 7,126)], como se muestra en la gráfica 36. Por lo tanto, la presencia de tinción nuclear puede ser un posible factor de riesgo de recaída en los pacientes operados de CPNCP en estadio temprano, ya que el riesgo es más del doble en los pacientes con tinción presente que en los pacientes sin tinción nuclear.

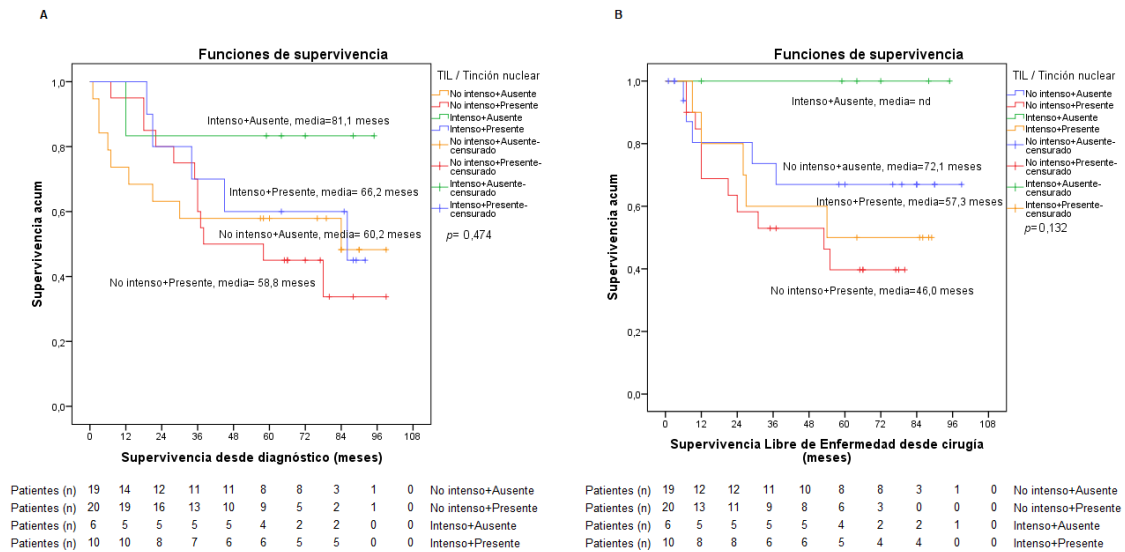




Gráfica 36: Análisis de SG (A) y SLE (B) según la ausencia o presencia de tinción nuclear de TGF- $\beta$

Adj. p: valor p del modelo de regresión de Cox ajustado por estado.

No obstante, no se observó ninguna asociación estadísticamente significativa entre el TGF- $\beta$  o la tinción nuclear y el resto de las variables consideradas. El valor p obtenido entre el análisis de TGF- $\beta$  y la tinción nuclear fue de 0,226. El análisis de SLE y SG combinando TIL y tinción nuclear tampoco mostró datos estadísticamente significativos. El gráfico, sin embargo, es coherente con lo ya comunicado hasta ahora en la literatura y descrito en este estudio. Así, los pacientes con TIL intensos y sin tinción nuclear podrían tener una mejor tasa de supervivencia, mientras que, por otro lado, los pacientes con TIL no intensos y que presentan tinción nuclear podrían tener un peor pronóstico (gráfica 37).



Gráfica 37: Análisis de SG (A) y de SLE (B) en función de la intensidad o no intensidad de los TIL y de la ausencia o presencia de tinción nuclear de TGF- $\beta$

Así pues, en nuestro estudio, al considerar la presencia de tinción nuclear inequívoca en  $>1\%$  de las células tumorales viables (presentes o ausentes) como un posible factor de riesgo adicional, las curvas de SLE revelaron una clara significación a favor de la tinción nuclear de TGF- $\beta$  ausente; es decir, los pacientes que presentan tinción nuclear pueden tener más probabilidades de recaída.

Nuestros hallazgos parecen prometedores y pueden abrir una nueva línea de investigación. Como resultado de su capacidad para promover la aparición de tumores, el TGF- $\beta$  y su vía de señalización ofrecen oportunidades potenciales para la terapia dirigida. Como se ha mencionado anteriormente, se han estudiado o se están desarrollando y evaluando en ensayos clínicos varios agentes dirigidos a diversos componentes de esta vía<sup>155,156,223,224</sup>. Sin embargo, se sabe poco sobre la expresión del TGF- $\beta$  en general y en el CPNPC en particular.

Reconocemos, que nuestro trabajo<sup>130</sup> tiene dos limitaciones principales. En primer lugar, se trata de un estudio retrospectivo con un tamaño de muestra pequeño, por lo que nuestros resultados deberían confirmarse con análisis adicionales en una cohorte más amplia. En segundo lugar, la interpretación de nuestros hallazgos puede verse limitada, ya que los estudios previos que evalúan el impacto pronóstico del TGF- $\beta$  en el CPNPC suelen referirse a los niveles plasmáticos de TGF- $\beta$ , mientras que los que están investigando su posible actividad terapéutica con inhibidores no reflejan datos sobre la expresión de TGF- $\beta$  en los pacientes tratados. No obstante, este trabajo propone un enfoque metodológico novedoso para la evaluación de la tinción nuclear de TGF- $\beta$  como posible factor de riesgo de recurrencia en el CPNPC resecable, que puede tener un

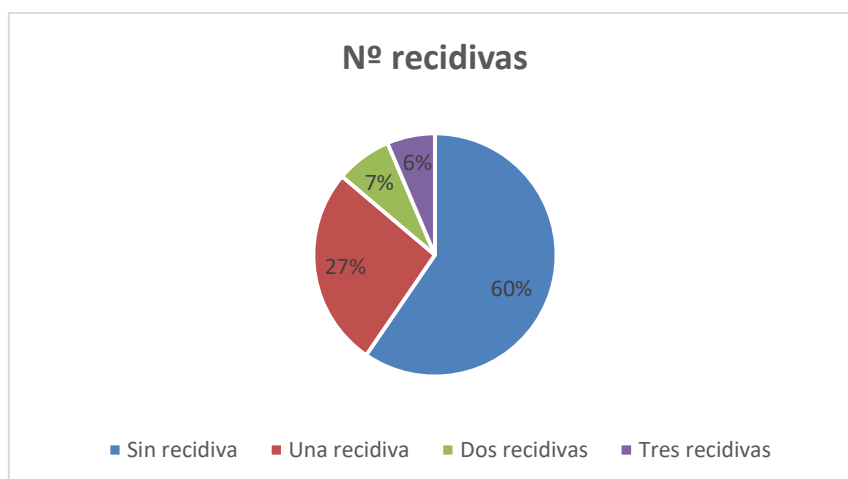
impacto pronóstico y predictivo para esta patología. Por tanto, si se validaran las técnicas de esta valoración del TGF- $\beta$  y se confirmara en otros estudios su relación con la recidiva en el CPNCP intervenible, se podría concluir que los pacientes que presentaran este biomarcador en sus células tumorales viables se beneficiarían de algún tipo de terapia inhibitoria del TGF- $\beta$  en combinación con ICIs. Esto implicaría la mejora de las tasas de SLE y, en consecuencia, podría aumentar la calidad de vida de los pacientes con CP.

### 6.3 RECIDIVAS, FALLECIMIENTOS Y SUS CAUSAS

Ya se ha comentado en el punto 6.1 que, a los 24 meses, habían sufrido una recidiva 24 pacientes de nuestra serie y el 74,7% continúan sin recidiva. En este periodo de 2 años, se producen el 64,8% del total de las recaídas; y, en consecuencia, que este periodo es clave en el seguimiento (gráfica 2). Además, analizando la curva de SLE y los fallecimientos, se comprueba que existe una relación estadística, mueren antes y en mayor proporción aquellos pacientes con recidiva (gráfica 3).

En este apartado se analizarán los tipos de recidiva, su relación con la SG y la SLE. Además, se examinará el tipo de recaídas según histología. También los fallecimientos y sus causas.

En nuestra base de datos queda recogido si la recidiva (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> o sucesivas) era local (pulmonar o mediastino) o a distancia (pulmonar, hepática, hueso, ganglionar, cerebral u otras). Los datos quedan reflejados en la gráfica 38 y en la tabla 19. En las tablas 20, 21 y 22 se describen los tipos de recidiva en tres grupos: 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup> recidiva.



Gráfica 38: Porcentaje de número de recidivas en nuestra población

Tabla 19: Porcentaje según nº de recidivas

<i>Nº de recidivas</i>	
Sin recidiva, n (%)	56 (59,6)
Una recidiva, n (%)	25 (26,6)
Dos recidivas, n (%)	7 (7,4)
Tres recidivas, n (%)	6 (6,4)

Tabla 20: Distribución de primeras recidivas

<i>Localización de primera recidiva</i>	
Local, n (%)	12 (31,6)
Distancia, n (%)	23 (60,5)
Local y distancia, n (%)	3 (7,9)

Tabla 21: Distribución de segundas recidivas

<i>Localización de segunda recidiva</i>	
Local, n (%)	4 (30,8)
Distancia, n (%)	9 (69,2)

Tabla 22: Distribución de terceras recidivas

<i>Localización de tercera recidiva</i>	
Distancia, n (%)	4 (66,7)
Local y distancia, n (%)	2 (33,3)

En el análisis descriptivo se observa que hay más recaídas a distancia que locales, dato que vuelve a mostrar que el acto quirúrgico de nuestros pacientes es muy satisfactorio. En la tabla 23 se muestra la distribución más detallada de los tipos de primera recidiva que se dan en nuestra muestra.

Tabla 23: Distribución de la localización de las primeras recidivas

	<i>Tipo de primera recidiva</i>		
	<i>Local</i>	<i>Distancia</i>	<i>Local y distancia</i>
Segundo primario pulmonar	3	0	0
Local	6	0	2
Local-Mediastino	3	0	1
Distancia-Hepática	0	4	0
Distancia-Cerebral	0	7	2
Distancia-Hueso	0	4	0
Distancia-Pulmonar	0	10	1
Distancia-Ganglionar	0	5	0
Distancia-Otros	0	8	0

Contrastados con los resultados de grandes muestras de pacientes donde el seguimiento estandarizado reveló que durante los primeros 4 años después de la cirugía, el riesgo de recurrencia varió del 6% al 10% por persona por año, pero luego disminuyó al 2%<sup>225</sup>. Dentro de este período, se puede reconocer un patrón, durante el primer y segundo año que la recurrencia es principalmente local y rara después, mientras que al final del segundo año hasta el final del cuarto año, la recurrencia está dominada por metástasis distantes que disminuyen con el tiempo<sup>226</sup>. Después de 5 años, estos están prácticamente ausentes.

El riesgo de desarrollar un segundo cáncer primario de pulmón exhibe un patrón más uniforme con el tiempo, que varía del 1% al 6% por persona por año y no disminuye con el tiempo<sup>225</sup>. Esto no se limita a los cánceres que se desarrollan en los fumadores, sino que se observó con una magnitud similar en los no fumadores<sup>227</sup>.

El seguimiento después del tratamiento con intención curativa solo es útil si la detección de una recurrencia, local o a distancia, o la detección de un segundo primario metacrónico pueden tratarse con actitud curativa o potencialmente prolongadora de la SLE. Este tipo de tratamiento después de una recurrencia local, a menudo, no es posible y eso se refleja en la peor SG encontrada en aquellos pacientes que tienen recidivas tempranas (gráfica 3) y en las tasas de supervivencia a 5 años en torno al 15% de series antiguas<sup>228</sup>.

Para los segundos primarios, el resultado es mejor con tasas de supervivencia a 5 años que van del 25% al 60%<sup>229</sup>. Esto ilustra que la detección de recurrencia local o un primario metacrónico convendrían hacerla puesto que puede conducir a una terapia que resulte en una SLE prolongada. Por lo tanto, es probable que la evaluación periódica tras una intervención de CP valga la pena. La mayoría de las guías clínicas<sup>10,13</sup> recomiendan durante los primeros dos años después de la cirugía una visita de seguimiento cada 6 meses en ese período, y anualmente a partir de entonces. Un nuevo

hallazgo detectado a través de la historia, el examen físico y / o las imágenes (preferiblemente TC) generalmente debe analizarse por un equipo multidisciplinario experimentado, teniendo en cuenta que un nuevo hallazgo podría ser una complicación del tratamiento, una metástasis o un nuevo primario. De ahí la importancia de tener consolidado el grupo de trabajo del comité de tumores torácicos como se ha comentado en el apartado 2.1.

En general, se recomienda hacer seguimiento con TC y, sin embargo, la evidencia para apoyar esa recomendación ha sido pobre, en ausencia de datos aleatorios hasta los resultados del ensayo IFCT-0302<sup>230</sup>. Se trata de un ensayo aleatorizado multicéntrico que compara 2 programas de seguimiento para estadios completamente resecaos. Los resultados publicados recientemente muestran que con un reclutamiento de 1775 pacientes asignados aleatoriamente a un grupo de seguimiento (888 pacientes al grupo de seguimiento mínimo; 887 pacientes al grupo de seguimiento basado en TC), la mediana de SG no fue significativamente diferente entre los grupos de seguimiento (8,5 años [IC del 95% 7,4 - 9,6] en el grupo de seguimiento mínimo frente a 10,3 años [8,1 - no alcanzado] en el grupo de seguimiento basado en TC. La SLE tampoco fue significativamente diferente entre los grupos de seguimiento. Ahora bien, se detectó recurrencia en 246 (27,7%) de 888 pacientes en el grupo de seguimiento mínimo y en 289 (32,6%) pacientes de 887 en el grupo de seguimiento basado en TC; diagnosticándose, además, un segundo CP primario en 27 (3,0 %) pacientes en el grupo de seguimiento mínimo y en 40 pacientes (4,5 %) en el grupo de seguimiento basado en TC. Por tanto, la adición de TC torácica durante el seguimiento no resultó en una supervivencia más prolongada entre los pacientes con CPNCP intervenidos. Sin embargo, permitió la detección de más casos de recurrencia temprana y segundo CP primario, que son más susceptibles al tratamiento con intención curativa, lo que respalda el uso del seguimiento basado en TC, especialmente en países donde ya se implementó la detección del CP, junto con otras medidas de apoyo. Es importante añadir que no se informaron eventos adversos graves relacionados con los procedimientos del ensayo.

En nuestro centro está protocolizado el siguiente seguimiento tras la cirugía (tabla 24).

Tabla 24: Seguimiento de los pacientes intervenidos en HUI

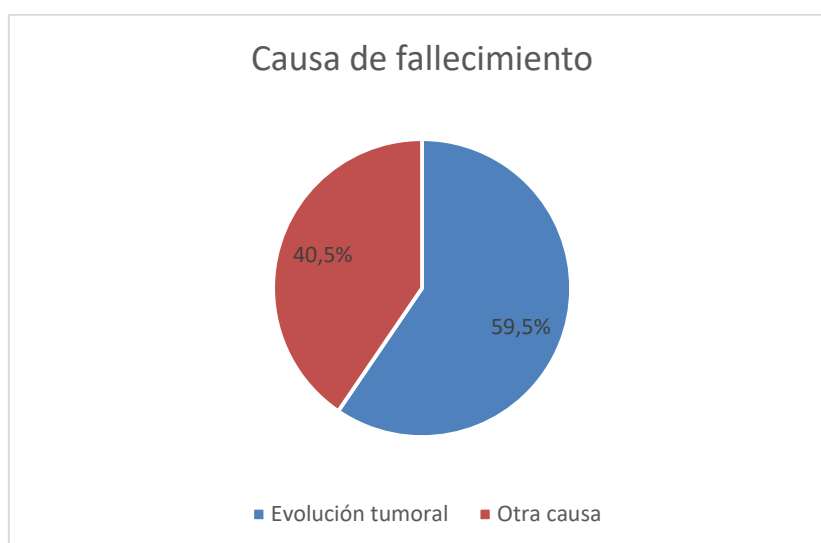
<i>Periodo</i>	<i>Prueba de imagen</i>	<i>Estudios complementarios</i>	<i>Frecuencia</i>
1º año	TAC torácico *	Analítica	Cada 3 meses
2º-3º año	TAC torácico *	Analítica	Cada 6 meses
4º año en adelante	TAC torácico	Analítica	Anual

\*Una vez al año, se solicitará TC toraco-abomino-pélvico.

- Analítica: hemograma, perfil medicina interna/oncología/digestivo. CEA y Ca125.
- Se solicitará PET-TC si en TC se sospecha recidiva o progresión. No de forma rutinaria.
- Tras la cirugía, cirugía torácica (CT) realizará una revisión al mes de la cirugía y otra a los 3-6 meses. Posteriormente el seguimiento se realizará en oncología médica si ha recibido adyuvancia y si no, el propio servicio de CT.
- Revisión anual por parte de neumología, para realización de pruebas de función respiratoria y control de EPOC si el paciente lo presentase.

En cuanto a la causa de fallecimiento distinguimos si es por evolución tumoral u otras causas (respiratoria, cardiaca, cardiorrespiratoria, infecciosa u otras).

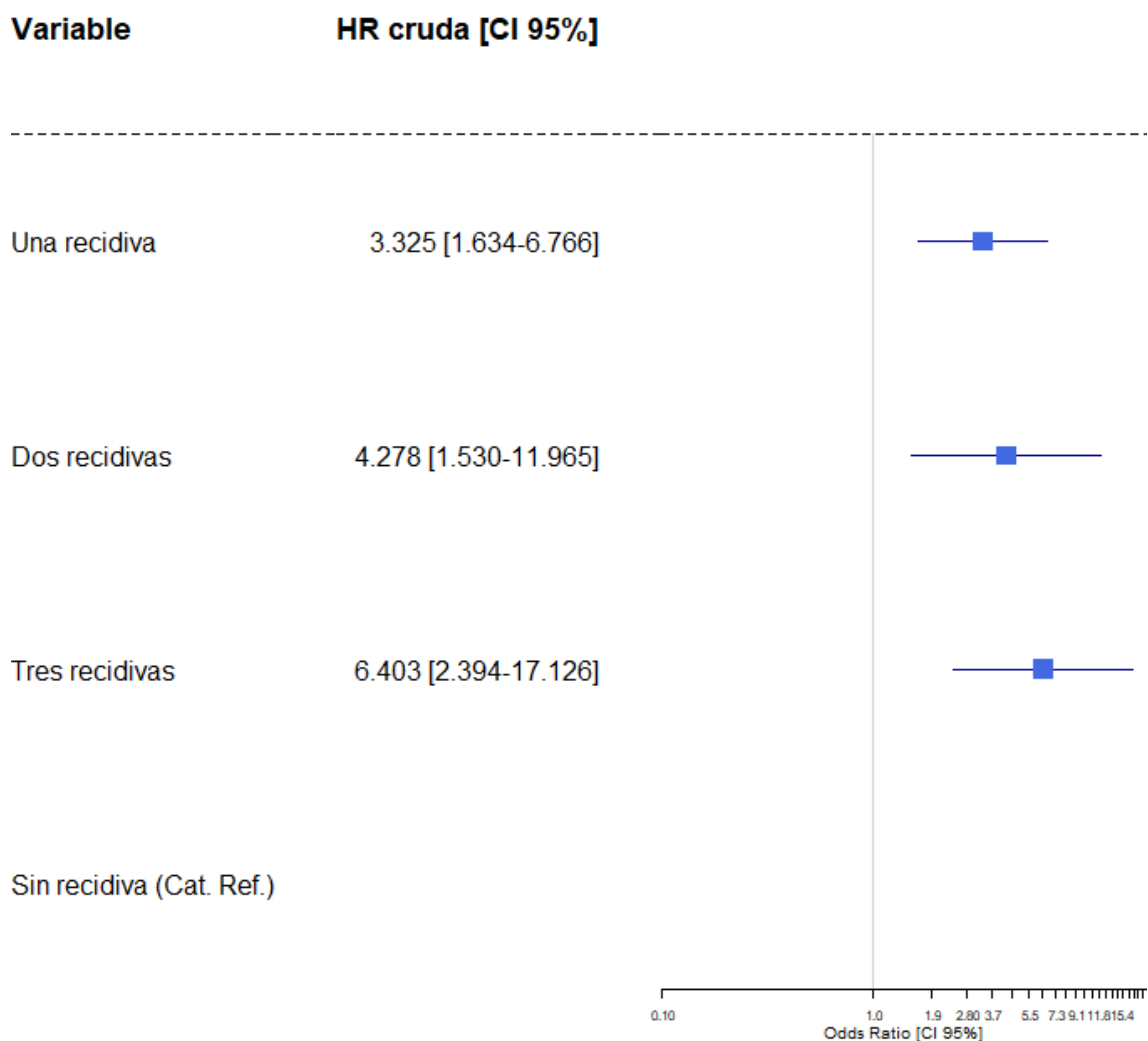
En la gráfica 39 se observa el porcentaje de cada una de las causas de fallecimiento, siendo un 59,5% por evolución tumoral, lógicamente tras recaída; y 40,5% por otra causa.



Gráfica 39: Porcentaje según causa de fallecimiento

En la gráfica 3 se muestra la relación entre recaída y fallecimiento; estadísticamente se ha ampliado el análisis realizando la regresión de Cox entre ambas variables obteniendo que la presencia de alguna recidiva es un factor de riesgo para sufrir el fallecimiento, siendo estos resultados estadísticamente significativos,  $p_{\text{valor}} < 0,000$ . Los análisis indican que los pacientes que presentan una, dos o tres recidivas tienen 3,32; 4,27 y 6,40 veces más riesgo respectivamente, de sufrir el fallecimiento que los pacientes sin recidiva (gráfica 40).

### Regresión de Cox para el riesgo de fallecer según nº de recidivas



Gráfica 40: Regresión de Cox para el riesgo de fallecer según el número de recidivas.



En la tabla 25 podemos ver ese 40,5% de la población que fallece por causas distintas a la evolución tumoral, frecuencias y porcentajes detallados.

Tabla 25: Causas de fallecimiento de la población que no fallece por evolución tumoral

<i>Otras causas de fallecimiento</i>	
Cardio-Respiratoria, n (%)	3 (17,6)
Cirrosis hepática, n (%)	1 (5,9)
Infecciosa, n (%)	1 (5,9)
Otra enfermedad (Leucemia Mieloblástica aguda), n (%)	1 (5,9)
Otro tumor en progresión, n (%)	1 (5,9)
Respiratoria, n (%)	10 (58,8)

En los estudios publicados sobre CP estadio inicial, no siempre es recogida la causa de muerte. Un estudio noruego<sup>231</sup> pretende analizar las causas específicas de muerte de más de 700 pacientes intervenidos de CP. Llegan a la conclusión de que la probabilidad de morir de CP continuó aumentando más de 5 años después de la operación; por lo que recomiendan el seguimiento de estos pacientes más allá de los 5 años. Los factores que contribuyeron a aumentar el riesgo de muerte por otra causa o por CP fueron: edad, función pulmonar reducida, ECOG >2, examen preoperatorio sin emisión de positrones tomografía / tomografía computarizada (PET-TC), diagnóstico histológico de tumor que no sea ADC y carcinoma de células escamosas y estadio localmente avanzado.

Por experiencia y datos similares a los reflejados anteriormente, en nuestro protocolo se ha consensuado hacer seguimiento de los pacientes intervenidos de CP hasta cumplir los 10 años poscirugía.

#### **6.4 SEGUNDOS TUMORES**

En este apartado se analizará la aparición de segundos tumores en nuestra muestra y qué proporción son CP tratables. En la tabla 26 podemos ver que 11 pacientes presentan un segundo tumor tras la cirugía de CP.

Tabla 26: Distribución de la población con segundo tumor

2º primario pulmonar, n (%)	6 (6,4)
Otro primario, n (%)	5 (45,5)
Total, n (%)	11 (11,7)

Eso supone que el 11,7% de nuestra población tiene un segundo tumor y el 6,4% un segundo CP; porcentaje que coincide con las grandes muestras publicadas<sup>225</sup>.

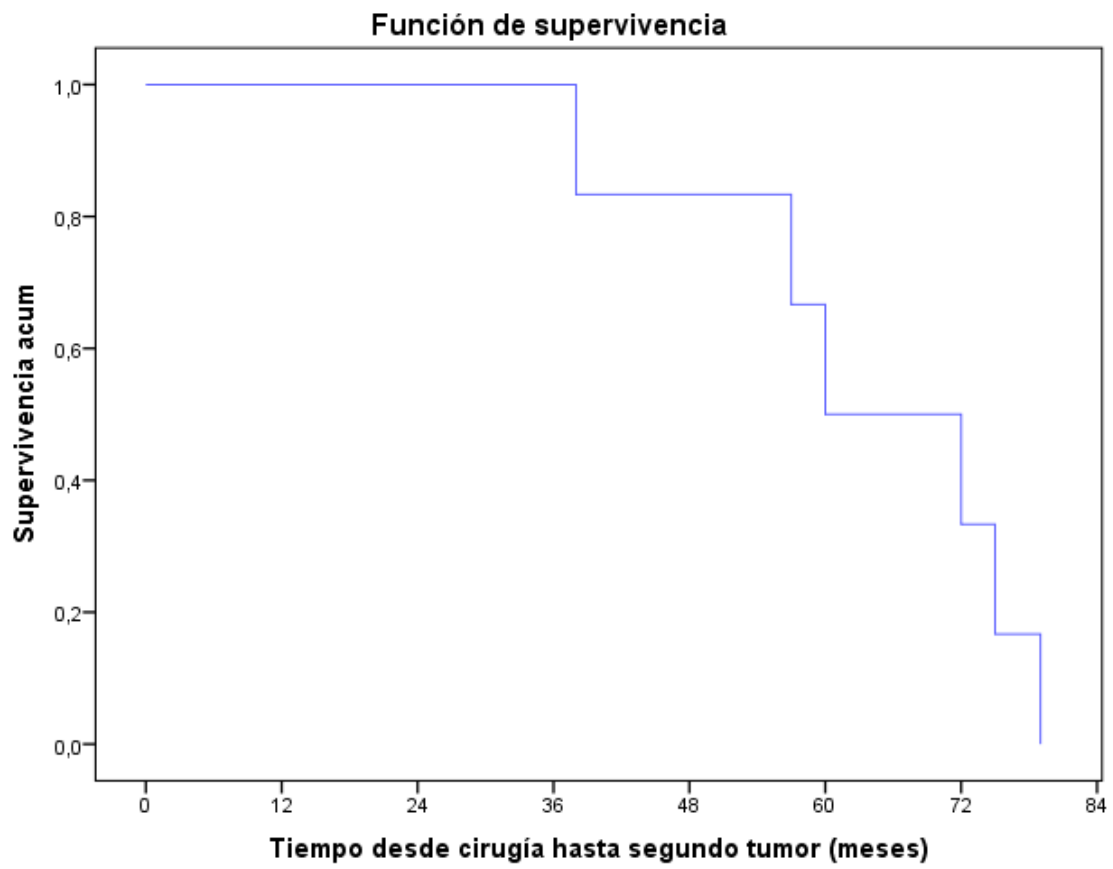
La actitud diagnóstico-terapéutica ante un posible segundo CP es la misma que en el inicial; en el sentido de que si el paciente cumple criterios de operabilidad y reseccabilidad la cirugía debe ser el primer tratamiento que se plantee. En un importante número de pacientes, la función pulmonar estará ya comprometida para una intervención con lobectomía (aún más para neumonectomía si fuera el caso, que no podría realizarse) por lo que se podría optar por una resección menor (en cuña, sublobectomía o atípica). Hay datos que confirman que, probablemente, lo más importante es poder intervenir con márgenes libres y no tanto la resección anatómica en estos segundos tumores, sobre todo en aquellos tumores metacronicos de 2 o menos cm de tamaño<sup>232,233</sup>.

En ocasiones se tiene que optar por tratar el segundo tumor con RT (principalmente con SBRT) o, incluso, no tratarlo, por las características clínicas del paciente o la función pulmonar comprometida. Los resultados, según grandes revisiones retrospectivas en esta situación, orientan a que los pacientes quirúrgicos tuvieron una supervivencia estadísticamente más larga que los pacientes tratados con radiación o no tratados con cirugía o radiación<sup>234</sup>.

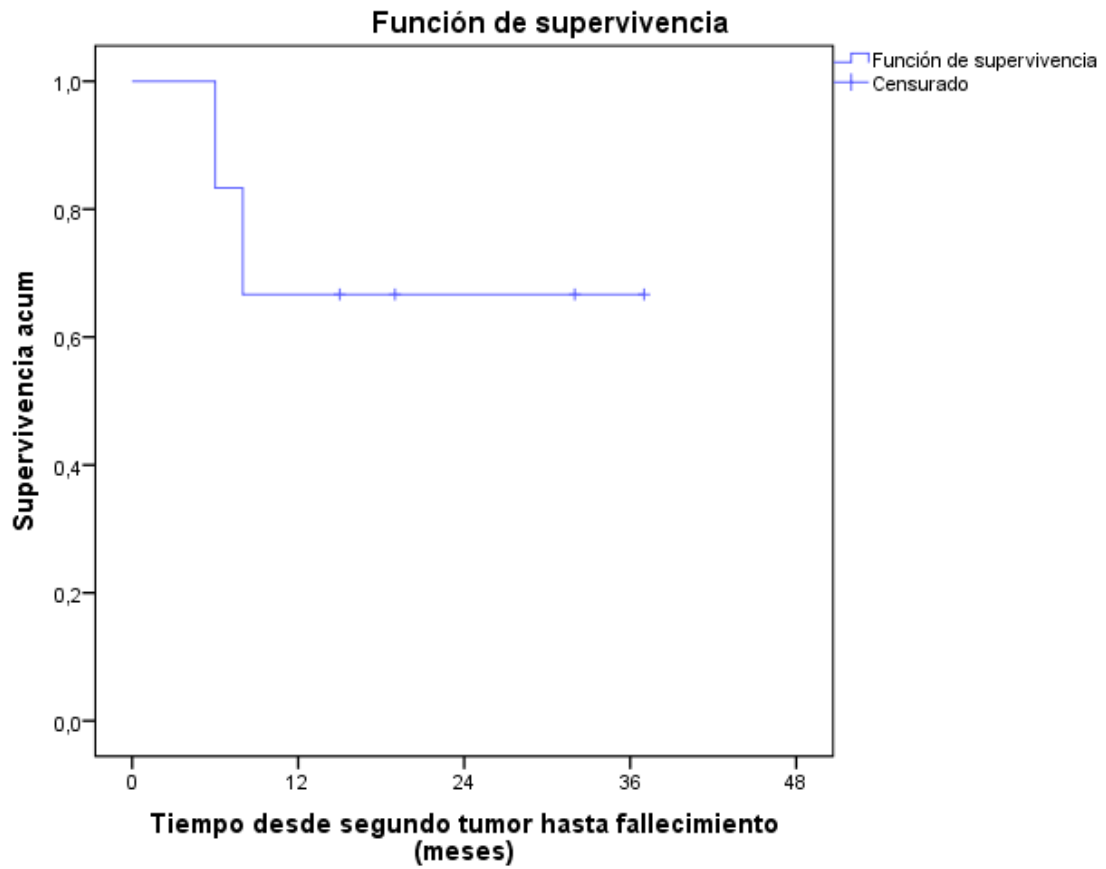
Se analizan los 6 pacientes con un segundo tumor CP, comprobamos que los 6 son varones, con una mediana de edad al diagnóstico de 63 años y todos habían sido fumadores en algún momento (50% fumadores y el otro 50% exfumadores), cinco con un consumo acumulado de tabaco de más de 40 paq/año. Cuatro de ellos tenían un diagnóstico inicial de carcinoma escamoso. Dos fueron intervenidos de inicio con una neumonectomía izq. La mitad se trataba de un E-I patológico y la otra mitad E-II.

Sólo uno de ellos pudo intervenirse del segundo CP. Tres de ellos recibieron SBRT (uno sin opción a diagnóstico histológico de ese segundo tumor). En el momento del corte de nuestra recogida de datos, habían fallecido dos de los seis, ambos por causa respiratoria.

En las gráficas 41 y 42 podemos ver la SLP desde la cirugía hasta segundo CP y la SG desde segundo tumor hasta fallecimiento. Siendo el tiempo medio esperado de supervivencia hasta segundo CP de 63,5 meses y el tiempo medio esperado a fallecimiento desde ese segundo tumor de 27 meses.



Gráfica 41: SLP desde cirugía hasta segundo CP



Gráfica 42: SG desde segundo CP hasta fallecimiento



## CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo de Tesis Doctoral son:

1. Las cifras de recaídas y mortalidad en CPNCP intervenidos siguen siendo demasiado altas. Presentar una recidiva temprana (antes de los 24 meses) es un factor de riesgo para el fallecimiento. Por tanto, poder predecir esta recaída abre una posibilidad de rescate terapéutico o adyuvancia más eficaz.
2. En nuestra serie se confirma que el TNM es el factor pronóstico más potente para SLE y SG. A los 5 años siguen vivos el 75% de la población estadio I y, sin embargo, el 66,7% de los E-III han fallecido en ese punto de corte.
3. PD-L1 se expresa poco en estadios iniciales, por lo que no parece buen biomarcador en estas circunstancias. TIL valorado como intenso y no intenso puede ayudar a seleccionar a aquellos pacientes con mejor pronóstico en los que presentan TIL intenso.
4. El análisis de TGF- $\beta$  con el método de IHQ semicuantitativa no aporta nada como factor pronóstico. Se propone una nueva forma de análisis de TGF- $\beta$  valorando la tinción nuclear y considerando su presencia inequívoca en más del 1% de las células cancerosas viables como positividad de TGF- $\beta$  tumoral. La tinción nuclear es factor de riesgo de recaída; de hecho, en nuestra serie el riesgo es más del doble en los pacientes con tinción presente comparado con los pacientes sin tinción nuclear.
5. Dada su capacidad para promover la aparición de tumores, el TGF- $\beta$  y su vía de señalización ofrecen oportunidades potenciales para la terapia dirigida. Se están desarrollando y evaluando en ensayos clínicos en CP varios agentes dirigidos a diversos componentes de esta vía.
6. Es preciso incorporar datos moleculares (mutación de EGFR al menos) y del MAT (PD-L1) de la pieza quirúrgica para el planteamiento adyuvante del paciente con CPNCP estadios iniciales.
7. El número de pacientes intervenidos que presenta mutación de EGFR está por debajo del 10%; no obstante, deben diagnosticarse para poder hacer un tratamiento adyuvante con ITK según los datos actuales.
8. La detección de recurrencia local o un primario metacrónico conviene hacerla puesto que puede conducir a una terapia que resulte en una SLE prolongada. Por lo tanto, la evaluación periódica tras una intervención de CP es eficiente. En este

sentido se requiere el buen funcionamiento de un comité multidisciplinar de tumores torácicos.

## PUBLICACIONES



International Journal of  
Molecular Sciences



Article

## TGF- $\beta$ Nuclear Staining as a Potential Relapse Risk Factor in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer

Nuria Cárdenas-Quesada <sup>1,†</sup>, Leticia Díaz-Beltrán <sup>1,2,\*,†</sup>, Carmen Rosa-Garrido <sup>2</sup>, Bélgica Márquez-Lobo <sup>3</sup>, Adela Sabio-González <sup>4</sup>, Rafael J. Luque-Barona <sup>4</sup>, María Isabel Núñez <sup>5,6,7,\*</sup> and Pedro Sánchez-Rovira <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medical Oncology Unit, University Hospital of Jaén, 23007 Jaén, Spain

<sup>2</sup> Andalusian Public Foundation for Biosanitary Research in Eastern Andalusia (FIBAO), University Hospital of Jaén, 23007 Jaén, Spain

<sup>3</sup> Provincial Intercentre Unit of Pathological Anatomy of the Province of Granada (UPIGAP), Clínico San Cecilio University Hospital, 18016 Granada, Spain

<sup>4</sup> Pathological Anatomy Unit, University Hospital of Jaén, 23007 Jaén, Spain

<sup>5</sup> Department of Radiology and Physical Medicine, Granada University, 18016 Granada, Spain

<sup>6</sup> Biopathology and Regenerative Medicine Institute (IBIMER), Center for Biomedical Research (CIBM), University of Granada, 18100 Granada, Spain

<sup>7</sup> Biosanitary Research Institute, ibs.Granada, 18016 Granada, Spain

\* Correspondence: leticia.diaz@juntadeandalucia.es (L.D.-B.); isabeln@ugr.es (M.I.N.); Tel.: +34-661-986372 (L.D.-B.); +34-958-242077 (M.I.N.)

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Cárdenas-Quesada, N.; Díaz-Beltrán, L.; Rosa-Garrido, C.; Márquez-Lobo, B.; Sabio-González, A.; Luque-Barona, R.J.; Núñez, M.I.; Sánchez-Rovira, P. TGF- $\beta$  Nuclear Staining as a Potential Relapse Risk Factor in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 13780. <https://doi.org/10.3390/ijms232213780>

Academic Editor: David Mu

Received: 21 September 2022

Accepted: 6 November 2022

Published: 9 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Nowadays, the impact of the tumor-immune microenvironment (TME) in non-small-cell lung cancer (NSCLC) prognosis and treatment response remains unclear. Thus, we evaluated the expression of PD-L1, tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) in NSCLC to identify differences in TME, detect possible new prognostic factors, and assess their relationship. We retrospectively analyzed 55 samples from patients who underwent NSCLC surgery and had over a 5-year follow-up. PD-L1 expression was determined by immunohistochemistry following standard techniques. The presence of TILs was evaluated at low magnification and classified into two categories, “intense” and “non-intense”. Cytoplasmic TGF- $\beta$  staining visualization was divided into four categories, and unequivocal nuclear staining in >1% of viable tumor cells was defined as “present” or “absent”. Our aim was to identify differences in disease-free survival (DFS) and overall survival (OS). Tumor stage was the only objective prognostic factor for OS. PD-L1 expression and the presence of TILs had no prognostic impact, neither their combination. There seems to be a lower expression of PD-L1 and a higher expression of TILs in early stages of the disease. Our TGF- $\beta$  nuclear staining analysis was promising, since it was associated with worse DFS, revealing this protein as a possible prognostic biomarker of recurrence for resectable NSCLC.

**Keywords:** PD-L1; TILs; TGF- $\beta$ ; prognostic factors; checkpoint inhibition; early-stage lung cancer

### 1. Introduction

Lung cancer (LC) is a devastating disease and a major therapeutic burden with poor survival rates. Nowadays, it is the second most common tumor worldwide and is responsible for the highest number of cancer deaths [1]. Despite current evidence [2–4], screening tests have not yet been standardised in routine clinical practice to improve early diagnosis. In fact, almost 80% of cases are still diagnosed at advanced, inoperable stages.

Recently, the identification of comprehensive lung cancer molecular profiles has improved the understanding of this pathology, which has become the paradigm of molecular oncology. Thus, the discovery of driver genetic alterations and potential molecular targets has led towards a better staging and diagnosis of the disease, allowing the development of personalized treatments for an increasing number of patients [5–9]. In the early stages of NSCLC (stage I and II), surgery remains the standard treatment in clinically operable



patients [10], with a 5-year OS ranging from 92% (stage IA1) to 41% (stage IIIA) [6]. Adjuvant chemotherapy (CT) maintains its benefit for patients with N1 and N2 disease (stages II and III), with an overall improvement in absolute survival of 4% to 5% at 5 years [11]. The studies on neoadjuvant CT are less comprehensive, and the results comparison of both therapies did not show a significant difference in OS [12].

These poor survival rates make necessary the identification of new biomarkers that can be used as prognostic factors for lung cancer (neo)adjuvant targeted therapies [13]. In this line, Osimertinib has recently been approved for use as adjuvant therapy after complete tumor resection in patients with stage IB-IIIa NSCLC with epidermal growth factor receptor (EGFR) exon 19 deletions or exon 21 L858R mutations [14].

Prior research in the field of advanced NSCLCs led to an expanded reach and impact of immune checkpoint inhibitors (ICIs), a new therapeutic setting as part of a frontline treatment strategy. Similarly, their use along with CT in neoadjuvant IB-IIIa NSCLC has also shown an increased pathological complete response rate compared to CT alone [15]. Likewise, adjuvant ICIs with anti-PD-L1 has led to increased DFS when compared to best supportive care for patients with PD-L1-positive tumors [16]. Additionally, a phase II clinical trial supports the addition of neoadjuvant Nivolumab to platinum-based CT in patients with resectable stage IIIa NSCLC [17].

So far, however, conflicting data have been obtained about the prognostic and predictive power of the newly discovered biomarkers and treatments under study [17–20]. In this sense, strict, precise, and sensitive biomarkers are still lacking in ICIs treatment to select responders, as is the case with targeted therapies. Hence, there continues to be much interest and, indeed, much progress in elucidating molecular targets that assist with prognosis assessment and treatment selection for patients with operated early-stage NSCLC, with the future moving towards precision medicine and individualised patient management. Ultimately, the development of affordable and reproducible biomarkers has become essential to predict the adjuvant therapeutic efficacy and recurrence rate for these patients. In this sense, nuclear TGF- $\beta$  staining meets these criteria and arises as a potential molecular target whose expression may significantly predict a worse prognosis for resectable lung cancer patients at its early stage [21]. In addition, TGF- $\beta$  inhibition has an impact on the production of regulatory T cells and may enhance the effect of PD-1/PD-L1 inhibitors, leading to improved responses to these therapies [22].

Here, we aimed to evaluate the association of clinicopathologic characteristics and the prognostic value of PDL-1 expression and TILs, and explored the immune microenvironment by assessing their relationship, since they have been suggested as clinically applicable predictive biomarkers in surgically resectable NSCLC. Furthermore, we studied TGF- $\beta$  expression and proposed a more simple and efficient way for its assessment (nuclear staining), since this molecular target has been outlined as a potential prognostic biomarker that may open a new line of research pointed towards TGF- $\beta$  inhibitor therapies in NSCLC, in combination with ICIs in those patients with a worse prognosis.

The chi-squared test, Fisher's exact test, and the student's *t*-test were used to study the differences in patient characteristics according to their results in the previous biomarker analyses of PD-L1, TILs, and TGF-beta expression. The normality study of the numerical variables was carried out using the Shapiro–Wilk test. The evaluation of the differences in survival curves, obtained by Kaplan–Meier, was carried out using the log-rank test. Cox regression was applied to obtain the crude hazard ratio (HRc) of the study variables and the adjusted hazard ratio (HRa) according to the stage, sex, and age of the patients. We used a significance level of 5%. Statistical analyses were carried out with IBM SPSS V21 and R version 4.0.3.

## 2. Results

### 2.1. Baseline Patient and Tumor Characteristics

A comparative analysis between patients with an analyzable sample ( $n = 55$ ) and those without ( $n = 39$ ) found no significant differences in the distribution of the variables

that we consider most important in the evolution of the disease: sex, age, squamous vs. non-squamous histology, stage (I, II, III), type of surgery, and administration of CT (Supplementary Table S1).

The characteristics of the patients with a sample available for assessment and a comparison of the distribution according to the variables under study are shown in Table 1. Of the 55 patients with an available tumor sample for our analysis, more than 48% of them had died, 38.18% had relapsed (21 relapses), and 12% (7 patients) had either developed a second lung tumor (3 patients) or another primary cancer.

We determined OS and DFS in our sample using Cox model regression according to the following characteristics: sex, age, squamous vs. non-squamous histology, stage, type of surgery, EGFR mutation, and CT administration. Statistically significant differences were found in OS according to staging. Thus, we confirmed that staging was the only independent prognostic factor in terms of survival, with lower staging meaning a higher survival rate.

### 2.2. PD-L1 Expression

PD-L1 expression analysis was performed qualitatively in two ways: in three blocks <1% (41 patients), between 1–49% (5 patients) and  $\geq 50\%$  (9 patients); or in two blocks, pooling  $\geq 1\%$  overall (14 patients) versus <1%.

After the analysis of both PD-L1 classifications, we found no statistically significant differences in either OS or DFS. Data of the PD-L1  $\geq 1\%$  vs. <1% comparison is represented in Figure 1. We considered that these results should be adjusted for the staging variable, as we knew its influence on OS. No differences were found when adjusting for staging. This information is also provided in Figure 2.

We also adjusted PD-L1 expression results for sex and age, and, ultimately, for sex and stage, without obtaining statistically relevant results in either case. Hence, the PD-L1 variable did not appear as a possible risk factor for OS or DFS, even when adjusted for sex, age, and stage.

Likewise, our analysis yielded no relationship among PD-L1 expression and the other two variables studied (TILs and TGF- $\beta$ ), with a *p*-value of 0.306 for TILs, 0.172 for TGF- $\beta$ , and 1.000 for nuclear staining, respectively.

### 2.3. Presence of TILs

As previously described, the presence of TILs has been dichotomously assessed (intense, non-intense). In our study, 39 patients presented intense TILs, whereas 16 had non-intense TILs. Our analysis revealed very moderate indications of significance, with a better prognosis in terms of OS with intense TILs (Figure 3). There were no statistically significant differences in DFS between the two groups. Adjusting these data with the staging variable also generated no statistical changes. Adjustments for sex and age, and sex and stage, did not modify our findings either. Therefore, the TILs variable did not manifest as a risk factor for OS and DFS, adjusted for sex, age, and stage.

We then decided to evaluate the possible statistical relationship with the other variables (PD-L1 and TGF- $\beta$ ), and as already mentioned above, no relationship between this variable and PD-L1 was found. Our results reported no significant association, with *p*-values of 0.402 regarding TGF- $\beta$  and 0.645 with respect to nuclear staining. Considering the negative prognostic value of high PD-L1 expression and the positive prognostic value of intense TILs, we analyzed both variables together without finding statistically relevant data, but we did discover that our sample complied with these trends (Figure 4).

**Table 1.** Characteristics of the patients with available sample, and comparison of the distribution according to the study markers.

	Total (n = 55)	PD-L1		p-Value	TIL		p-Value	TGF- $\beta$		p-Value	TGF-B Nuclear Staining		p-Value
		<1% (n = 41)	$\geq$ 1% (n = 14)		Non-Intense (n = 39)	Intense (n = 16)		Weak Expression (n = 7)	High Expression (n = 48)		Absent (n = 25)	Present (n = 30)	
Sex, n (%)				1.000			0.165			0.577			1.000
Male	49 (89.1)	36 (87.8)	13 (92.9)		33 (84.6)	16 (100)		6 (85.7)	43 (89.6)		22 (88.0)	27 (90.0)	
Female	6 (10.9)	5 (12.2)	1 (7.1)		6 (15.4)	0 (0)		1 (14.3)	5 (10.4)		3 (12.0)	3 (10.0)	
Age, mean (SD)	63.93 (9.74)	64.76 (10.17)	61.50 (8.19)	0.284	64.08 (9.73)	63.56 (10.07)	0.861	67.57 (11.23)	63.40 (9.52)	0.294	65.48 (10.19)	62.63 (9.32)	0.285
Histology, n (%)				0.097			0.626			0.686			0.095
squamous cell carcinoma	23 (41.8)	14 (34.1)	9 (64.3)		15 (38.5)	8 (50.0)		2 (28.6)	21 (43.8)		14 (56.0)	9 (30.0)	
non-squamous	32 (58.2)	27 (65.9)	5 (35.7)		24 (61.5)	8 (50.0)		5 (71.4)	27 (56.3)		11 (44.0)	21 (70.0)	
Staging, n (%)				0.189			0.585			1.000			0.864
I	33 (60.0)	27 (65.9)	6 (42.9)		22 (56.4)	11 (68.8)		4 (57.1)	29 (60.4)		14 (56.0)	19 (63.3)	
II	14 (25.5)	10 (24.4)	4 (28.6)		10 (25.6)	4 (25.0)		2 (28.6)	12 (25.0)		7 (28.0)	7 (23.3)	
III	8 (14.5)	4 (9.8)	4 (28.6)		7 (17.9)	1 (6.3)		1 (14.3)	7 (14.6)		4 (16.0)	4 (13.3)	
Type of surgery, n (%)				0.099			0.698			0.211			0.542
Limited resection (segmentectomy or wedge resection)	4 (7.3)	4 (9.8)	0 (0)		3 (7.7)	1 (6.3)		1 (14.3)	3 (6.3)		3 (12.0)	1 (3.3)	
Lobectomy	39 (70.9)	31 (75.6)	8 (57.1)		26 (66.7)	13 (81.3)		6 (85.7)	33 (68.8)		17 (68.0)	22 (73.3)	
Pneumonectomy	12 (21.8)	6 (14.6)	6 (42.9)		10 (25.6)	2 (12.5)		0 (0)	12 (25.0)		5 (20.0)	7 (23.3)	
EGFR mutation, n (%)				0.742			0.343			0.761			0.039
Positive	2 (3.6)	2 (4.9)	0 (0)		1 (2.6)	1 (6.3)		0 (0)	2 (4.2)		0 (0)	2 (6.7)	
wt	31 (56.4)	24 (58.5)	7 (50.0)		24 (61.5)	7 (43.8)		5 (71.4)	26 (54.2)		11 (44.0)	20 (66.7)	
Unknown	22 (40.0)	15 (36.6)	7 (50.0)		14 (35.9)	8 (50.0)		2 (28.6)	20 (41.7)		14 (56.0)	8 (26.7)	
Chemotherapy, n (%)				0.099			0.527			0.346			0.541
No	33 (60.0)	27 (65.9)	6 (42.9)		25 (64.1)	8 (50.0)		4 (57.1)	29 (60.4)		17 (68.0)	16 (53.3)	
Adjuvant	15 (27.3)	8 (19.5)	7 (50.0)		10 (25.6)	5 (31.3)		1 (14.3)	14 (29.2)		24.0	9 (30.0)	
Neo Adjuvant	7 (12.7)	6 (14.6)	1 (7.1)		4 (10.3)	3 (18.8)		2 (28.6)	5 (10.4)		2 (8.0)	5 (16.7)	

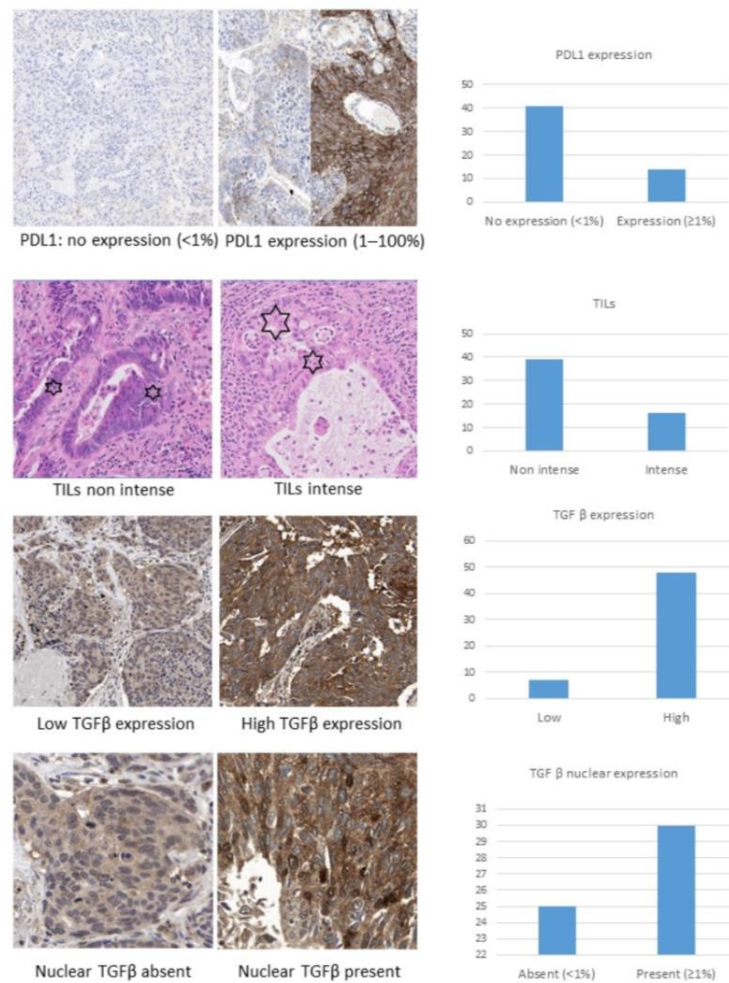
Categorical variables are represented by frequency and percentage. Age is represented by the mean and standard deviation (SD). The *p* values are calculated through the *t*-Student test, chi-squared test, or Fisher's exact test.



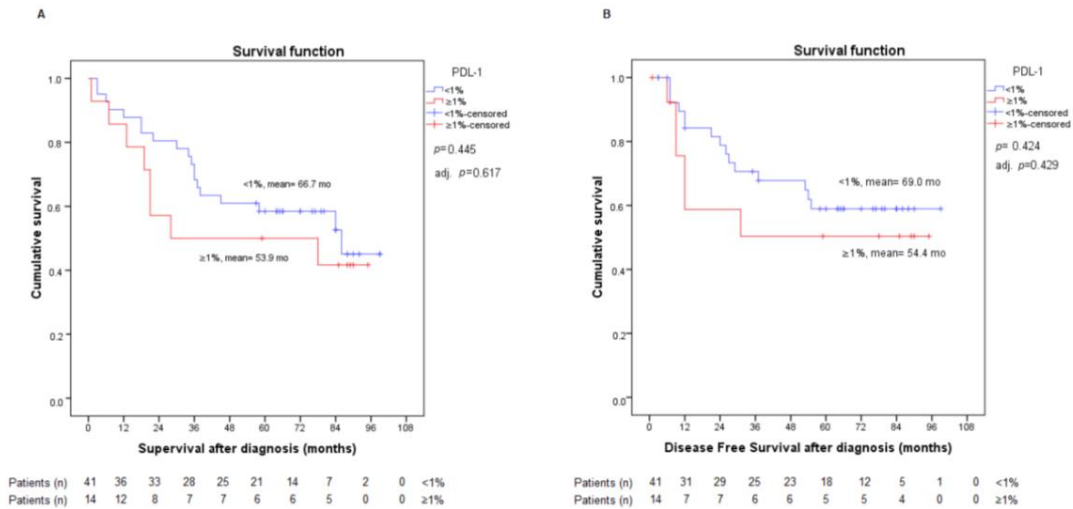
2.4. Assessment of TGF-β Expression

Regarding TGF-β expression, we classified our patients into two categories: those with low TGF-β expression (n = 7) and those with high expression (n = 48); no patient was tested as negative. They were also divided in two groups according to the absence (n = 25) or presence (n = 30) of TGF-β nuclear staining.

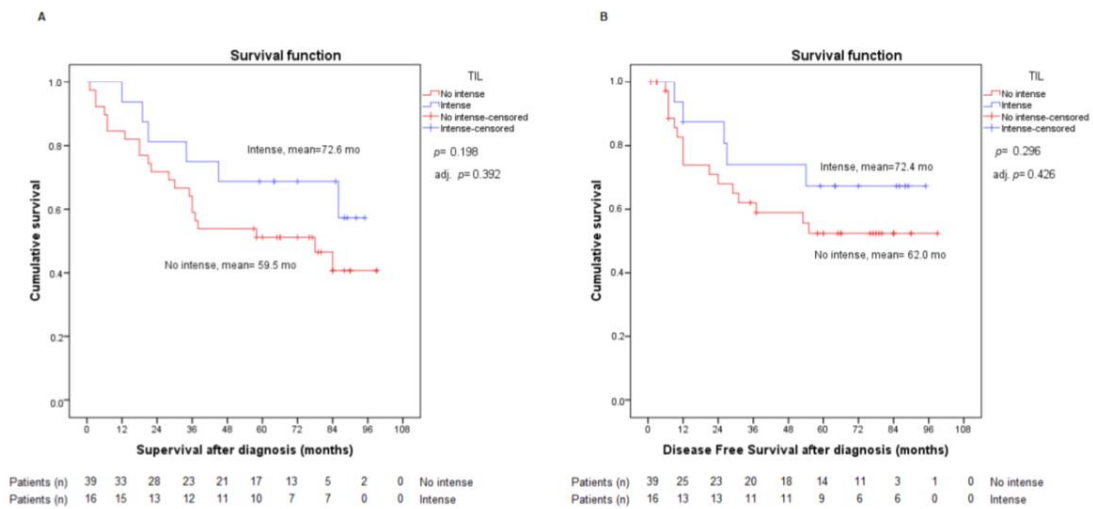
In our statistical analysis, no significant differences were found among all TGF-β patients unified in low or high expression (1 vs. 2–3). Figure 5 shows these data and their adjustment for staging, as in the previous variables.



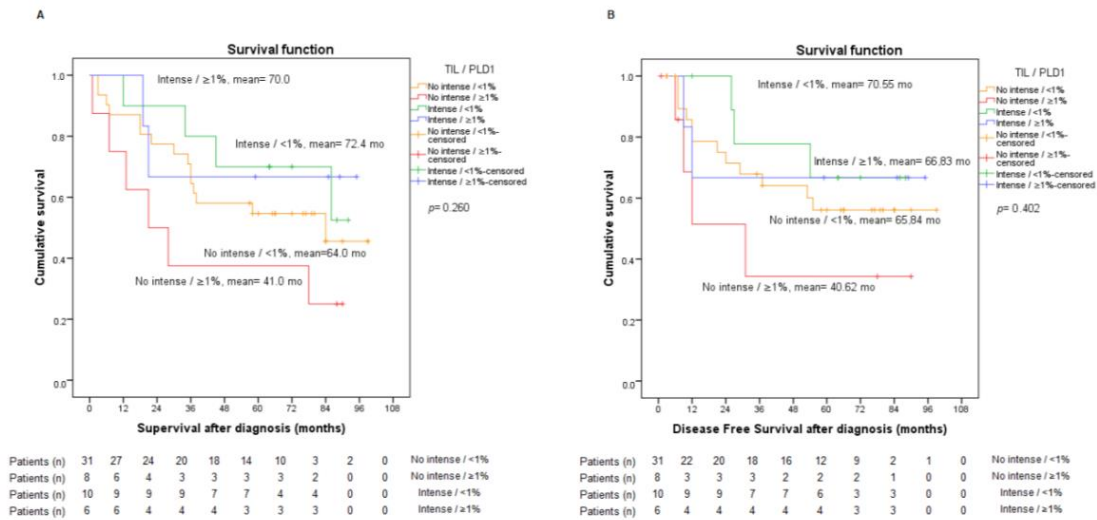
**Figure 1.** Histological algorithm of evaluation (as described in Sections 4.2–4.4 of Section 4) and frequency distribution for the biomarkers of interest. The six-pointed stars show intraepithelial lymphocytes. All images at 20× magnification (digital zoom) except for TGF-β nuclear staining (40×).



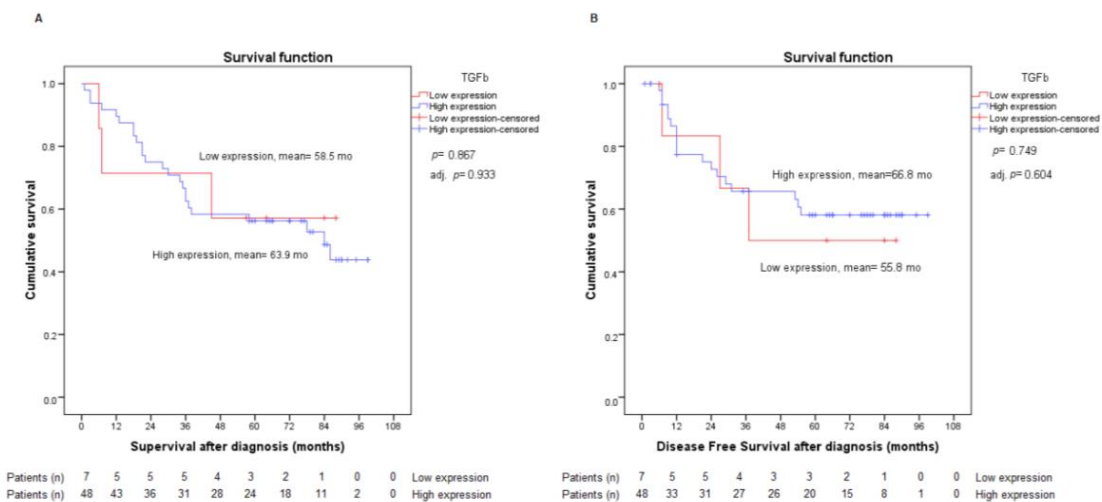
**Figure 2.** Analysis of overall survival (A) and disease-free survival (B) according to PD-L1 expression <1% or ≥1%. Adj. *p*: *p*-value from Cox regression model adjusted by stage.



**Figure 3.** Analysis of overall survival (A) and disease-free survival (B) according to intense or non-intensive TIL expression. Adj. *p*: *p*-value from Cox regression model adjusted by stage.

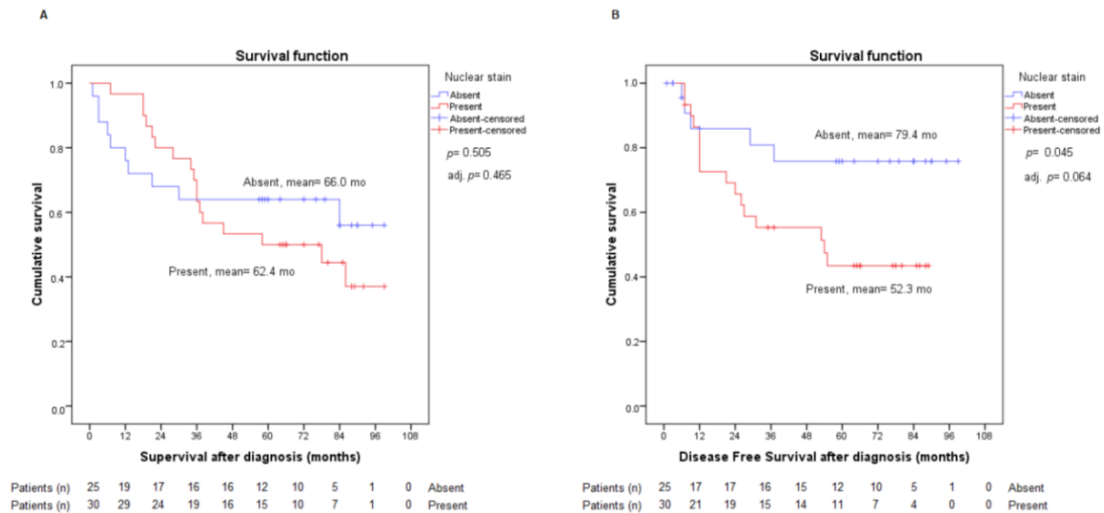


**Figure 4.** Analysis of overall survival (A) and disease-free survival (B) according to PD-L1 expression <1% or ≥1% and intense or non-intense TIL.



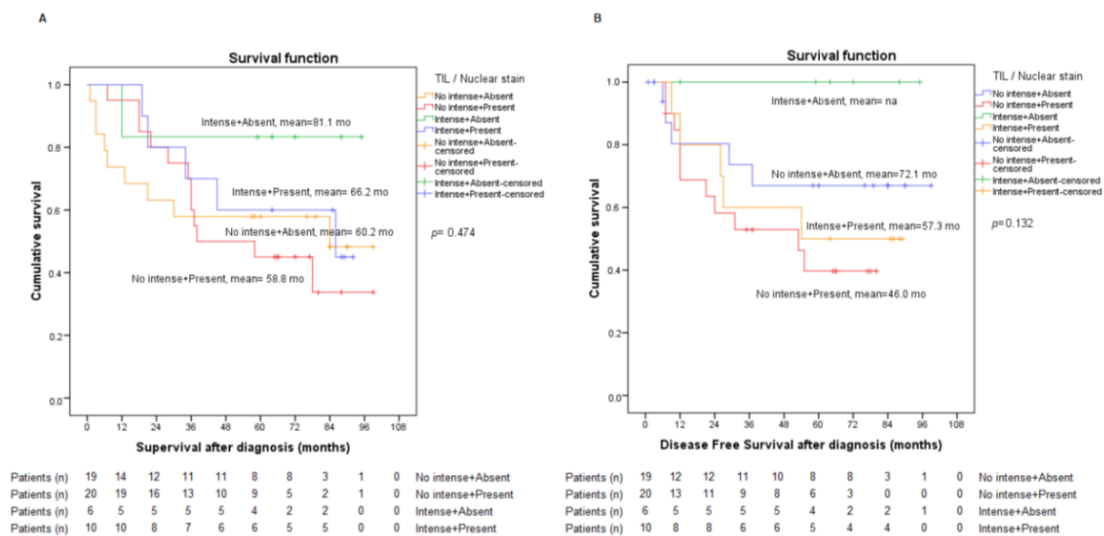
**Figure 5.** Analysis of overall survival (A) and disease-free survival (B) according to low or high TGF-β expression. Adj.  $p$ :  $p$ -value from Cox regression model adjusted by stage.

When analyzing TGF-β nuclear staining, according to the dichotomous variable absent and present, we found statistical significance in the DFS curves in favor of absent nuclear staining, with a  $p$ -value of 0.045. This outcome was not observed in OS; however, significance was maintained when adjusting the result with the variables age and sex ( $p$ -value: 0.044, HRa: 2.832, IC HRa: (1.029–7.794)), and it also remained very close to significance if the adjustment was performed by staging ( $p$ -value 0.064, HRa: 2.597, IC HRa: (0.946–7.126)), as is shown in Figure 6. Therefore, present nuclear staining may arise as a potential relapse risk factor in operated early-stage NSCLC patients, since the risk is more than twice as high for patients with present staining versus patients with absent staining.



**Figure 6.** Analysis of overall survival (A) and disease-free survival (B) according to absent or present TGF-β nuclear staining. Adj. *p*: *p*-value from Cox regression model adjusted by stage.

Unfortunately, there was no statistically significant association between TGF-β or nuclear staining and the rest of the variables under consideration. The *p*-value obtained between TGF-β and nuclear staining analysis was of 0.226. The analysis of DFS and SG combining TIL and nuclear staining did not show statistically significant data either. The graph, however, is consistent with what has already been reported so far in the literature and described in this study. Thus, patients with intense TIL and no nuclear staining may have a better survival rate, whereas, on the other hand, patients with non-intense TIL and who present nuclear staining could have a worse prognosis (Figure 7).



**Figure 7.** Analysis of overall survival (A) and disease-free survival (B) according to intense or non-intense TIL and absent or present TGF-β nuclear staining.



### 3. Discussion

The success of targeted therapies and new immunotherapy approaches has created a new paradigm of personalized therapy in lung cancer. Thus, the identification of clinically relevant cancer biomarkers as potential new targets for drug development is in critical demand. In this sense, herein we have studied PD-L1 expression, TILs status, and TGF- $\beta$  expression in early-stage resectable NSCLC patients to assess their value as predictive and prognostic biomarkers.

Although PD-L1 is known to play a major function in suppressing the immune response, its prognostic value is still being discussed and its role in tumor microenvironment has not been fully elucidated yet [23]. Indeed, PD-L1 expression by IHC is particularly controversial as an ICI biomarker due to discordant results in recent research [24]. Despite some studies finding a robust correlation between high PDL1 expression and a worse prognosis [25] and treatment response after concurrent chemotherapy and radiotherapy [26,27], our analysis suggested that high PD-L1 expression has no prognostic significance. This goes in line with recent evidence [19] revealing that PD-L1 expression is influenced by tumor stage, which may limit its use as a predictive and prognostic indicator. The incidence of PD-L1 expression (by 22C3) in patients with resectable NSCLC is relatively lower compared to patients with a more advanced stage. This fact is also consistent with the low percentage of high PD-L1 values observed in our population. On this matter, Tuminello et al. [23] also concluded that patient characteristics, such as gender and stage, may influence both the immune composition of the TME and post-surgical survival, and, therefore, may distort their true relationship. More recently, data analyzed by the GILT group [18] have also confirmed that PD-L1 tumor expression does not seem to affect early-stage lung cancer prognosis. The disparity in results across studies may be explained by the lack of standardization of the diverse analytical techniques available (i.e., use of different antibodies, platforms, and cut-off thresholds) and the inter-observer variation [28].

Regarding other potential biomarkers, TILs have currently gained increasing attention in the treatment and prognosis of NSCLC, as they constitute a local histopathological reflection of the host's immune response against tumor cells. In this sense, several studies [29–31], including ours, analyzed tumor-infiltrating lymphocyte density and its role in cancer progression, revealing that high levels of TILs correlated with longer overall survival and that TILs were more highly expressed in early stages of the disease. Indeed, our analysis showed higher expression of TILs in early-stage operable lung cancer patients and moderate indications of significance with better prognosis in terms of OS with intense TILs scores. It is worth highlighting that TILs expression is not altered by the possible loss of tissue antigenicity, a factor that could influence PD-L1 expression. Overall, these findings may suggest that TILs appear to be a better prognostic marker for survival than PD-L1, at least for early-stage lung cancer. However, our results are in line with recent evidence [18–20], not supporting PD-L1 expression, TILs status, or the combination of both as significant prognostic indicators for resectable NSCLC.

Regardless of the evidence, the presence of high TILs highlights the key role that the immune system plays in the tumor evolution and the patient's outcome. Thus, recent articles are starting to suggest that immune infiltration could be used to determine which patients would benefit most from adjuvant or neoadjuvant immunotherapy [23,24]. For example, in the PIONeeR study [32], patients with advanced NSCLC responding to anti-PD-L1 ICIs (nivolumab, pembrolizumab, or atezolizumab) had a higher percentage of PD-L1-positive tumor cells and a higher infiltration of cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. In this regard, there are several attempts to classify tumors according to PD-L1 expression and lymphocytic infiltration [33,34] with the consequent therapeutic implications. In fact, the development of an immune score may arise as a novel possible approach to identify patients who would benefit from new immune therapies. Therefore, the evaluation of the immune cell infiltration and PD-L1 expression should be a standard practice in the management of lung cancer patients, despite their limited prognostic relevance.



In this context, TGF- $\beta$  expression has emerged as a possible mechanism triggering the different responses to ICIs. Thus, TGF- $\beta$  inhibition affects the production of regulatory T cells and may potentially increase the effect of PD-1/PD-L1 inhibitors. Indeed, clinical trials have demonstrated the safety and activity of therapeutic approaches simultaneously targeting the PD-1/PD-L1 and TGF- $\beta$  pathways, and the first promising data in this regard have already been published [35]. This evidence suggested the potential significance of TGF- $\beta$  expression in lung cancer and, therefore, its possible use as a prognostic and predictive biomarker for this condition. Furthermore, TGF- $\beta$  plays an important role in the alteration of early epithelial cancer cells to invasive metastatic cancer cells by promoting epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [36], and it has recently been stated that its high expression could significantly predict poor prognosis in patients with NSCLC, since it also stimulates angiogenesis and induces immunosuppression [21].

Herein, we aimed to assess the prognostic value of TGF- $\beta$  in our sample population by dividing its expression values into two groups (low expression and high expression), as performed in Xue et al. 2011 [37] and Huang et al. 2014 [38], without finding significant differences, as previously explained. We, therefore, set out to improve the methodology for assessing TGF- $\beta$  expression by using the immunohistochemical assessment of nuclear staining in a similar way to other markers in other pathologies [39,40], since, to our knowledge, it had not yet been applied to evaluate TGF- $\beta$  prognostic relevance in NSCLC. Hence, a second analysis was conducted by assessing nuclear staining to define TGF- $\beta$  expression in tumor cells. When considering the presence of unequivocal nuclear staining in >1% of viable tumor cells (present or absent) as an additional possible risk factor, the DSF curves revealed clear significance in favor of absent nuclear staining; that is, patients presenting TGF- $\beta$  nuclear staining may be more likely to relapse.

As a result of its tumor-promoting abilities, TGF- $\beta$  and its signaling pathway offer potential opportunities for targeted therapy. As mentioned above, several agents targeting various components of this pathway have been studied or are being developed and evaluated in clinical trials [22,35,36,41]. However, little is known about the expression of TGF- $\beta$  in general and in NSCLC in particular.

Our findings seem promising and may open a new line of research. We recognize, however, that our work has two main limitations. First, this is a retrospective study with a small sample size, so our results should be confirmed with further analysis in a larger cohort. Second, the interpretation of our findings may be constrained, since previous studies evaluating the prognostic impact of TGF- $\beta$  in NSCLC usually refer to plasma levels of TGF- $\beta$ , whereas those that are investigating its possible therapeutic activity with inhibitors do not reflect data on TGF- $\beta$  expression in treated patients.

Notwithstanding, this work proposes a novel methodological approach for the assessment of TGF- $\beta$  nuclear staining as a possible risk factor for recurrence in resectable NSCLC, which may have a prognostic and predictive impact for this condition. Therefore, if this TGF- $\beta$  assessment's techniques were validated and its relationship with relapse in interventional NSCLC were confirmed in other studies, we could conclude that patients presenting this biomarker in their viable tumor cells would benefit from some type of TGF- $\beta$  inhibitor therapy in combination with ICIs. This would lead us to the improvement of disease-free survival rates, and, consequently, may increase the quality of life for lung cancer patients.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Patients

From the 94 patients who underwent surgery for pathological stages I to IIIA NSCLC at the University Hospital of Jaén between 2010 and 2013, 55 samples available for analysis were included in this retrospective study. Tumor characteristics, histological subtype, differentiation, size, invasive depth, and lymph node metastatic status were assessed by specialized pathologists. We used the seventh edition of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), which was current at the date of patient diagnosis.

The median follow-up time from diagnosis was 5.0 (0–8.0) years. Tissue collection and analytical methods were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and were approved by the Provincial Research Ethics Committee of Jaén.

#### 4.2. Assessment of PD-L1 Expression

We performed immunohistochemistry (IHC) analysis (Santa Clara, CA, USA, Dako Autostainer<sup>®</sup> Link 48) on 3  $\mu$ m sections using Dako clone 22C3. The tumor proportion score (TPS) described in the PD-L1 IHC 22C3 pharmDx-NSCLC PD-L1 interpretation manual (accessed June 2021) [42] was used to assess PD-L1 expression. TPS is the percentage of viable tumor cells showing any intensity of partial or complete membrane staining ( $\geq 1+$ ) with respect to the total number of viable tumor cells present in the sample. We considered PD-L1 expression to be present if TPS  $\geq 1\%$ , and a TPS of  $\geq 50\%$  was defined as high PD-L1 expression. This interpretation was carried out by two independent specialist pathologists. Photos of both situations can be found in Figure 1.

#### 4.3. Assessment of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TILs)

The presence of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) was analyzed under a light microscope by selecting the representative tumor infiltrating area stained with hematoxylin and eosin, and in which there were sufficient viable tumor cells without necrosis. We assessed the density of intratumorally lymphocytic infiltration at low magnification (10 $\times$ ) and classified it into two categories, “intense” and “non-intense”. High intensity was defined as a strong infiltration equivalent to the density seen in a metastatic lymph node, such as that described by Brambilla et al. [29]. This classification was performed by two independent pathologists, with discordant cases being agreed in a second step. The lymphocytic infiltrates observed in our samples were peritumoral and we did not distinguish between lymphocytic cell types. Photos of intense and non-intense TILs are shown in Figure 1.

#### 4.4. Assessment of TGF- $\beta$ Expression

Sections (4 mm) of formalin-fixed-paraffin-embedded NSCLC biopsies were treated for deparaffinization, rehydration, and antigen retrieval using standard procedures (EnVision FLEX reagents, Agilent, Dako). Antibodies against TGF-beta (Abcam 190503/1:50 dilution) were used for immunostaining performed on an automated system (Autostainer link 48, Dako). After antigen retrieval, the slides obtained were independently examined by two pulmonary pathologists using light microscopy.

Two assessments of TGF-beta expression in tumor cells were performed, given the absence of a standardized method for this procedure. First, a semi-quantitatively immunohistochemical assessment was conducted, as previously described in Xue et al. 2011 [37] and Huang et al. 2014 [38]. Taking into account the intensity of staining and the number of positive cells, a classification into four categories was established: negative (–): complete absence of staining; weak (+): weak staining—regardless of the percentage of positive cells—or when moderate staining is observed in  $\leq 30\%$  of the cells; moderate (++) : moderate staining is identified in  $>30\%$  of the cells or intense staining in  $\leq 50\%$ ; intense (+++) : intense staining in  $>50\%$  of the cells (Figure 1). Secondly, nuclear staining was assessed as an additional factor, since other studies on pancreatic adenocarcinoma, such as the one by Javle et al. 2014 [39], considered nuclear staining as a criterion for defining TGF-beta expression in tumor cells in a manner analogous to the interpretation of other biomarkers, such as the anti-IDH1-R132H antibody in glial tumors [40]. Thus, we performed the TGF-beta nuclear staining analysis, considering its unequivocal presence in more than 1% of viable cancer cells as tumor TGF-beta positivity (Figure 1).

#### 4.5. Statistical Analysis

Quantitative variables were represented by mean and standard deviation, whereas qualitative variables were defined by frequency and percentage (see Table 1 and Supplementary Table S1).

## 5. Conclusions

To date, it remains challenging to delay or avoid tumor relapse in patients with NSCLC. Although cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors has revolutionized the treatment of this condition, we still lack accurate prognostic and predictive biomarkers to help in clinical decision-making. Our preliminary results suggested that TGF- $\beta$  staining may predict poor prognosis in operable early-stage NSCLC patients, even though further research should be conducted to confirm these findings. Thus, the incorporation of TGF- $\beta$  nuclear staining as a potential prognostic factor of resectable lung cancer should be studied in future work to confirm whether it may represent a viable powerful tool for the identification of patients with a high risk of recurrence being priority candidates for adjuvant treatment with ICIs and TGF- $\beta$  inhibitors.

**Supplementary Materials:** The supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms232213780/s1>.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.C.-Q., L.D.-B., B.M.-L., M.I.N. and P.S.-R.; methodology, N.C.-Q., L.D.-B., C.R.-G., M.I.N. and P.S.-R.; investigation, N.C.-Q., L.D.-B., B.M.-L. and A.S.-G.; validation, N.C.-Q., L.D.-B., C.R.-G., B.M.-L., A.S.-G., R.J.L.-B. and M.I.N.; writing—original draft, writing—review, N.C.-Q., L.D.-B., C.R.-G., M.I.N. and P.S.-R.; editing, N.C.-Q., L.D.-B. and M.I.N.; visualization: N.C.-Q., L.D.-B., C.R.-G., B.M.-L. and A.S.-G.; supervision, N.C.-Q., L.D.-B. and P.S.-R.; project administration, M.I.N. and P.S.-R.; funding acquisition, P.S.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study has been funded by the Andalusian Public Foundation for Biosanitary Research of Eastern Andalusia Alejandro Otero (FIBAO) and the Andalusian Health Service. The assessment of TGF- $\beta$  and PD-L1 expression was performed by the Andalusian public health system biobank (contract number: S2000353).

**Institutional Review Board Statement:** Tissue collection and analytical methods were performed in accordance with the Declaration of Helsinki and were approved by the Provincial Research Ethics Committee of Jaén.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** We are especially grateful to all the patients and their families who contributed the samples and data that made this study possible. In addition, we thank the staff of the Medical Oncology and Pathological Anatomy services of the University Hospital of Jaén for their time and assistance. We thank the reviewers and the editor for their constructive contributions and comments. We finally thank the Andalusian Public Foundation for Biosanitary Research of Eastern Andalusia Alejandro Otero (FIBAO) and the Andalusian Health Service for their support.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 395–409. [[CrossRef](#)]
3. De Koning, H.J.; Van Der Aalst, C.M.; De Jong, P.A.; Scholten, E.T.; Nackaerts, K.; Heuvelmans, M.A.; Lammers, J.-W.J.; Weenink, C.; Yousaf-Khan, U.; Horeweg, N.; et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 503–513. [[CrossRef](#)]
4. Sadate, A.; Ocean, B.V.; Beregi, J.-P.; Hamard, A.; Addala, T.; de Forges, H.; Fabbro-Peray, P.; Frandon, J. Systematic review and meta-analysis on the impact of lung cancer screening by low-dose computed tomography. *Eur. J. Cancer* **2020**, *134*, 107–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Brierley, J.D.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. (Eds.) *TNM Classification of Malignant Tumours*, 8th ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2016.



6. Goldstraw, P.; Chansky, K.; Crowley, J.; Rami-Porta, R.; Asamura, H.; Eberhardt, W.E.; Nicholson, A.G.; Groome, P.; Mitchell, A.; Bolejack, V.; et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, 39–51. [[CrossRef](#)]
7. Travis, W.D.; Brambilla, E.; Nicholson, A.G.; Yatabe, Y.; Austin, J.H.M.; Beasley, M.B.; Chirieac, L.R.; Dacic, S.; Duhig, E.; Flieder, D.B.; et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10*, 1243–1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Planchard, D.; Popat, S.; Kerr, K.; Novello, S.; Smit, E.F.; Faivre-Finn, C.; Mok, T.S.; Reck, M.; Van Schil, P.E.; Hellmann, M.D.; et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, iv192–iv237. [[CrossRef](#)]
9. Majem, M.; Juan, O.; Insa, A.; Reguart, N.; Trigo, J.M.; Carcereny, E.; García-Campelo, R.; García, Y.; Guirado, M.; Provencio, M. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin. Transl. Oncol.* (2018). *Clin. Transl. Oncol.* **2019**, *21*, 3–17. [[CrossRef](#)]
10. Postmus, P.E.; Kerr, K.M.; Oudkerk, M.; Senan, S.; Waller, D.A.; Vansteenkiste, J.; Escriu, C.; Peters, S.; ESMO Guidelines Committee. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, iv1–iv21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Artal Cortés, Á.; Calera Urquiza, L.; Hernando Cubero, J. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: State-of-the-art. *Transl. Lung Cancer Res.* **2015**, *4*, 191–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. NSCLC Meta-analysis Collaborative Group. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet* **2014**, *383*, 1561–1571. [[CrossRef](#)]
13. Vansteenkiste, J.; Wauters, E.; Reymen, B.; Ackermann, C.; Peters, S.; De Ruyscher, D. Current status of immune checkpoint inhibition in early-stage NSCLC. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1244–1253. [[CrossRef](#)]
14. Wu, Y.-L.; Tsuboi, M.; He, J.; John, T.; Grohe, C.; Majem, M.; Goldman, J.W.; Laktionov, K.; Kim, S.-W.; Kato, T.; et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 1711–1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Spicer, J.; Wang, C.; Tanaka, F.; Saylor, G.B.; Chen, K.-N.; Liberman, M.; Vokes, E.E.; Girard, N.; Lu, S.; Provencio, M.; et al. Surgical outcomes from the phase 3 CheckMate 816 trial: Nivolumab (NIVO) + platinum-doublet chemotherapy (chemo) vs chemo alone as neoadjuvant treatment for patients with resectable non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 8503. [[CrossRef](#)]
16. Wakelee, H.A.; Altorki, N.K.; Zhou, C.; Csösz, T.; Vynnychenko, I.O.; Goloborodko, O.; Luft, A.; Akopov, A.; Martinez-Marti, A.; Kenmotsu, H.; et al. IMpower010: Primary results of a phase III global study of atezolizumab versus best supportive care after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small cell lung cancer (NSCLC). *J. Clin. Oncol.* **2021**, *39*, 8500. [[CrossRef](#)]
17. Provencio, M.; Nadal, E.; Insa, A.; García-Campelo, M.R.; Casal-Rubio, J.; Dómine, M.; Majem, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Martínez-Martí, A.; Carpeño, J.D.C. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): An open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet* **2020**, *21*, 1413–1422. [[CrossRef](#)]
18. Tufman, A.; Neumann, J.; Manapov, F.; Sellmer, L.; Jung, A.; Kauffmann-Guerrero, D.; Kahnert, K.; Mertsch, P.; Borgmeier, A.; Semrau, S.; et al. Prognostic and predictive value of PD-L1 expression and tumour infiltrating lymphocytes (TILs) in locally advanced NSCLC treated with simultaneous radiochemotherapy in the randomized, multicenter, phase III German Intergroup lung Trial (GILT). *Lung Cancer* **2021**, *160*, 17–27. [[CrossRef](#)]
19. Lin, G.; Fan, X.; Zhu, W.; Huang, C.; Zhuang, W.; Xu, H.; Lin, X.; Hu, D.; Huang, Y.; Jiang, K.; et al. Prognostic significance of PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocyte in surgically resectable non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 83986–83994. [[CrossRef](#)]
20. Chen, Z.; Zhao, N.; Wang, Q.; Xi, Y.; Tian, X.; Wu, H.; Xu, Y. PD-L1 Protein Expression and Gene Amplification Correlate with the Clinicopathological Characteristics and Prognosis of Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2021**, *13*, 6365–6375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Li, J.; Shen, C.; Wang, X.; Lai, Y.; Zhou, K.; Li, P.; Liu, L.; Che, G. Prognostic value of TGF- $\beta$  in lung cancer: Systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* **2019**, *19*, 691. [[CrossRef](#)]
22. Haque, S.; Morris, J.C. Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. *Hum. Vaccines Immunother.* **2017**, *13*, 1741–1750. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tuminello, S.; Veluswamy, R.; Lieberman-Cribbin, W.; Gnjatic, S.; Petralia, F.; Wang, P.; Flores, R.; Taioli, E. Prognostic value of immune cells in the tumor microenvironment of early-stage lung cancer: A meta-analysis. *Oncotarget* **2019**, *10*, 7142–7155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Duchemann, B.; Remon, J.; Naigeon, M.; Cassard, L.; Jouniaux, J.M.; Boselli, L.; Grivel, J.; Auclin, E.; Desnoyer, A.; Besse, B.; et al. Current and future biomarkers for outcomes with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **2021**, *10*, 2937–2954. [[CrossRef](#)]
25. He, Y.; Yu, H.; Rozeboom, L.; Rivard, C.J.; Ellison, K.; Dziadziuszko, R.; Suda, K.; Ren, S.; Wu, C.; Hou, L.; et al. LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J. Thorac. Oncol.* **2017**, *12*, 814–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Paz-Ares, L.; Spira, A.; Raben, D.; Planchard, D.; Cho, B.; Özgüroglu, M.; Daniel, D.; Villegas, A.; Vicente, D.; Hui, R.; et al. Outcomes with durvalumab by tumour PD-L1 expression in unresectable, stage III non-small-cell lung cancer in the PACIFIC trial. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2020**, *31*, 798–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Spigel, D.R.; Faivre-Finn, C.; Gray, J.E.; Vicente, D.; Planchard, D.; Paz-Ares, L.; Vansteenkiste, J.F.; Garassino, M.C.; Hui, R.; Quantin, X.; et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol. JCO* **2022**, *40*, 1301–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Butter, R.; Hondelink, L.M.; van Elswijk, L.; Blaauwgeers, J.L.; Bloemena, E.; Britstra, R.; Bulkman, N.; van Gulik, A.L.; Monkhorst, K.; de Rooij, M.J.; et al. The impact of a pathologist's personality on the interobserver variability and diagnostic accuracy of predictive PD-L1 immunohistochemistry in lung cancer. *Lung Cancer* **2022**, *166*, 143–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Brambilla, E.; Le Teuff, G.; Marguet, S.; Lantuejoul, S.; Dunant, A.; Graziano, S.; Pirker, R.; Douillard, J.-Y.; Le Chevalier, T.; Filipits, M.; et al. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 1223–1230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Bremnes, R.M.; Busund, L.-T.; Kilvåg, T.L.; Andersen, S.; Richardsen, E.; Paulsen, E.E.; Hald, S.; Khanekhenari, M.R.; Cooper, W.A.; Kao, S.C.; et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, 789–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Horne, Z.D.; Jack, R.; Gray, Z.T.; Siegfried, J.M.; Wilson, D.O.; Yousem, S.A.; Nason, K.S.; Landreneau, R.J.; Luketich, J.D.; Schuchert, M.J. Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer. *J. Surg. Res.* **2011**, *171*, 1–5. [[CrossRef](#)]
32. Barlesi, F.; Greillier, L.; Monville, F.; Foa, C.; le Treut, J.; Audigier-Valette, C.; Vély, F.; Garcia, S.; Sabatier, F.; Ciccolini, J.; et al. LBA53 Precision immuno-oncology for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts) treated with PD1/L1 immune checkpoint inhibitors (ICIs): A first analysis of the PIONEER study. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, S1183. [[CrossRef](#)]
33. Teng, M.W.L.; Ngiow, S.F.; Ribas, A.; Smyth, M.J. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 2139–2145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ock, C.-Y.; Keam, B.; Kim, S.; Lee, J.-S.; Kim, M.; Kim, T.M.; Jeon, Y.K.; Kim, D.-W.; Chung, D.H.; Heo, D.S. Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *22*, 2261–2270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Tschernia, N.P.; Gulley, J.L. Tumor in the Crossfire: Inhibiting TGF- $\beta$  to Enhance Cancer Immunotherapy. *BioDrugs* **2022**, *36*, 153–180. [[CrossRef](#)]
36. Paz-Ares, L.; Kim, T.M.; Vicente, D.; Felip, E.; Lee, D.H.; Lee, K.H.; Lin, C.-C.; Flor, M.J.; Di Nicola, M.; Alvarez, R.M.; et al. Bintrafusp Alfa, a Bifunctional Fusion Protein Targeting TGF- $\beta$  and PD-L1, in Second-Line Treatment of Patients With NSCLC: Results From an Expansion Cohort of a Phase 1 Trial. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* **2020**, *15*, 1210–1222. [[CrossRef](#)]
37. Xue, Y.-J.; Lu, Q.; Sun, Z.-X. CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Med. Oncol.* **2011**, *28*, 1363–1372. [[CrossRef](#)]
38. Huang, A.-L.; Liu, S.-G.; Qi, W.-J.; Zhao, Y.-F.; Li, Y.-M.; Lei, B.; Sheng, W.-J.; Shen, H. TGF- $\beta$ 1 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancers is Correlated with Prognosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 8143–8147. [[CrossRef](#)]
39. Javle, M.; Li, Y.; Tan, D.; Dong, X.; Chang, P.; Kar, S.; Li, D. Biomarkers of TGF- $\beta$  signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e85942. [[CrossRef](#)]
40. Agarwal, S.; Sharma, M.C.; Jha, P.; Pathak, P.; Suri, V.; Sarkar, C.; Chosdol, K.; Suri, A.; Kale, S.S.; Mahapatra, A.K. Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing. *Neuro-Oncology* **2013**, *15*, 718–726. [[CrossRef](#)]
41. Huynh, L.; Hipolito, C.; Dijke, P.T. A Perspective on the Development of TGF- $\beta$  Inhibitors for Cancer Treatment. *Biomolecules* **2019**, *9*, 743. [[CrossRef](#)]
42. Krohn, D. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Interpretation Manual, NSCLC 1% 50%. 2021. Available online: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29158\\_pd-l1-ihc-22c3-pharmdx-nsclc-interpretation-manual.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29158_pd-l1-ihc-22c3-pharmdx-nsclc-interpretation-manual.pdf) (accessed on 26 June 2022).

## Otras publicaciones de interés relacionadas con el trabajo:

1. Ortega Granados AL, Cárdenas Quesada N, Rosa Garrido C, et al. Lung cancer in octogenarians. Retrospective study of clinical characteristics and therapy in a single-center and a 5-year experience. *J Clin Oncol*. 2016; 34(15\_suppl):e21521-e21521. doi:10.1200/JCO.2016.34.15\_suppl.e21521

[https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15\\_suppl.e21521](https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2016.34.15_suppl.e21521)

2. Cárdenas Quesada N, Ortega Granados AL, Márquez Lobo B, et al. Histological features and survival in NSCLC patients treated with surgery with curative intention. *J Clin Oncol*. 2017; 35(15\_suppl):e20080-e20080. doi:10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.e20080

[https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2017.35.15\\_suppl.e20080](https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.e20080)

3. Cárdenas Quesada N, Ortega Granados AL, Márquez Lobo B, Rosa Garrido C, Sanchez Rovira P, Núñez Torres MI. Evaluation of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and survival in patients with resected non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2019; 37(15\_suppl):e20010-e20010. doi:10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.e20010

[https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2019.37.15\\_suppl.e20010](https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.e20010)

## ANEXO

### 1. Certificados del Comité de Ética de la Investigación de la Provincia de Jaén.



Servicio Andaluz de Salud  
CONSEJERÍA DE SALUD

**D<sup>a</sup>. ELISA NIEVES GODOY, SECRETARIA DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE JAÉN**

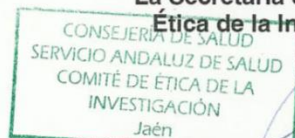
#### CERTIFICA:

Que el Comité de Ética de la Investigación de Jaén ha considerado emitir **informe favorable**, según consta en el acta de la reunión celebrada el día 25 de septiembre de 2014.

Al proyecto de Investigación presentado por la Investigadora Principal: D<sup>a</sup>. Nuria Cárdenas Quesada, FEA de Oncología del Complejo Hospitalario de Jaén, titulado: "Factores pronósticos en el CPNCP estadios iniciales".

Lo que firmo en Jaén a 25 de septiembre de 2014

**La Secretaria del Comité de  
Ética de la Investigación**



**Elisa Nieves Godoy**





## COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE LA PROVINCIA DE JAEN

**D<sup>a</sup>. Ana Laura Ortega Granados, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de la Provincia de Jaén,**

### CERTIFICA

Que este Comité en su reunión de 30/07/2020, ha recibido la propuesta para realizar una Modificación Relevante en el Estudio de Investigación, que fue aprobado en 25/09/2014, titulado:

**TITULO DEL ESTUDIO: "Factores pronósticos en el CPNCP estadios iniciales" - Investigadora principal: FEA de Oncología Médica del Hospital Universitario de Jaén, fue aprobado el 25/09/2014.**

**INVESTIGADOR/ES: D<sup>a</sup>. Nuria Cárdenas Quesada**

Y considera que una vez evaluada la propuesta para la aprobación expresa de la Modificación Relevante, según la normativa vigente y existiendo el quórum suficiente.

Por lo que este Comité emite un **DICTAMEN FAVORABLE A LA MODIFICACIÓN.**

Lo que firmo en Jaén, a 30/07/2020 de 2020,

Fdo.: **D<sup>a</sup>. Ana Laura Ortega Granados**  
**Secretaria del CEI de Jaén**

HOSPITAL UNIVERSITARIO DE JAÉN  
Avda. Ejército Español, 10. 23007 – Jaén  
Unidad de Investigación  
Tel. 953 00 85 19  
ui.chj.sspa@juntadeandalucia.es

Es copia aut@ntica de documento electr@nico

FIRMADO POR	ANA LAURA ORTEGA GRANADOS	28/09/2020 11:48:19	PÁGINA 1/1
VERIFICACIÓN	UUM32LCZVBYS320RWV9U3YK2ZN9DLP	<a href="https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/">https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma/</a>	



## 2. Formulario de información y consentimiento informado escrito para la realización de una resección pulmonar.

**JUNTA DE ANDALUCÍA**

**CONSEJERÍA DE SALUD**

### FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Orden de 8 de julio de 2009 (BOJA nº 152 de fecha 6 de agosto) por la que se dictan instrucciones a los Centros del Sistema Sanitario Público de Andalucía, en relación al procedimiento de Consentimiento Informado.

#### CENTRO SANITARIO

A.Complejo Hospitalario de Jaén

#### SERVICIO DE

### 1. DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA (\*) LA REALIZACIÓN DE UNA RESECCIÓN PULMONAR. Extirpación de parte del pulmón o del pulmón

Este documento sirve para que usted, o quien lo represente, dé su consentimiento para esta intervención. Eso significa que nos autoriza a realizarla.

Puede usted retirar este consentimiento cuando lo desee. Firmarlo no le obliga a usted a hacerse la intervención. De su rechazo no se derivará ninguna consecuencia adversa respecto a la calidad del resto de la atención recibida. Antes de firmar, es importante que lea despacio la información siguiente.

Díganos si tiene alguna duda o necesita más información. Le atenderemos con mucho gusto.

(\*) Indicar el nombre del procedimiento/intervención a realizar; si es posible, además del nombre técnico que siempre debe figurar, puede tratar de expresarlo con un nombre más sencillo.

#### 1.1 LO QUE USTED DEBE SABER:

##### EN QUÉ CONSISTE. PARA QUÉ SIRVE:

La intervención a la que usted va a someterse consiste en la extirpación de una porción de pulmón que puede ser desde un segmento, un lóbulo, dos lóbulos hasta el pulmón completo según se necesite para la erradicación de la enfermedad. En determinadas ocasiones además del pulmón se extirpan otros tejidos como ganglios linfáticos, pared torácica, diafragma, etc.

Sirve para erradicar la zona de pulmón enferma y en caso de enfermedades tumorales además poder conocer en qué fase se encuentra la enfermedad para poder sentar las bases del tratamiento que mejor se adapte a su caso.

##### CÓMO SE REALIZA:

La toracotomía estándar es la intervención más habitual en estos casos. Requiere una anestesia general, ventilación separada de ambos pulmones, colocación de diversas sondas y catéteres corporales para la monitorización de las funciones vitales durante la intervención. Estas intervenciones pueden requerir uso de sangre y/o hemoderivados durante la cirugía o en el postoperatorio. También la colocación y mantenimiento postoperatorio durante un periodo de tiempo variable de uno o dos drenajes torácicos. El periodo postoperatorio inicial transcurrirá en la sala de reanimación o en la unidad de cuidados intensivos (UCI) según valoración del médico, donde el paciente podrá ser visitado por su familia en el horario establecido en la unidad.

Las opciones de esta operación son:

- Neumonectomía: se extirpa todo el pulmón.
- Lobectomía/bilobectomía: se extirpa uno o dos lóbulos
- Segmentectomía: se extirpa una porción de pulmón inferior a un lóbulo
- Linfadenectomía: se extirpan los ganglios linfáticos locales /regionales al tumor.

**QUÉ EFECTOS LE PRODUCIRÁ:**

Desde el punto de vista respiratorio se produce una merma de la función pulmonar proporcional a la cantidad de pulmón extirpado.

Molestias postoperatorias variables en intensidad y tiempo. Cicatriz torácica.

La desaparición del tumor o zona del pulmón enferma.

**EN QUÉ LE BENEFICIARÁ:**

Curación radical de las enfermedades benignas, además de ser el mejor tratamiento disponible en enfermedades malignas de pulmón.

**OTRAS ALTERNATIVAS DISPONIBLES EN SU CASO:**

Cuando se ha indicado la resección pulmonar se entiende que se ha agotado la posibilidad de encontrar cualquiera otra terapia menos agresiva y de mayor eficacia.

En la mayoría de los tumores sólidos pulmonares el tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia no ha igualado ni mejorado los resultados obtenidos con el tratamiento quirúrgico. Estos tratamientos se usan fundamentalmente para casos de enfermedad extendida o como opción en caso de no poderse realizar una extracción por cualquier motivo.

En su caso:

**QUÉ RIESGOS TIENE:**

Cualquier actuación médica tiene riesgos. La mayor parte de las veces los riesgos no se materializan, y la intervención no produce daños o efectos secundarios indeseables. Pero a veces no es así. Por eso es importante que usted conozca los riesgos que pueden aparecer en este proceso o intervención.

- **LOS MÁS FRECUENTES:**

Hemorragia intraoperatoria o postoperatoria que puede requerir el uso de sangre y/o hemoderivados, colocación de nuevos drenajes torácicos e incluso realizar una nueva operación para solucionar el problema. Infección de la herida quirúrgica con o sin infección pleural (zona de los pulmones) que igualmente puede requerir colocación de nuevos drenajes, e incluso nuevas operaciones para su solución, además de uso de antibióticos y otros productos farmacéuticos.

Es de especial gravedad la infección de la cavidad pleural vacía después de la extirpación de todo un pulmón, que generalmente se acompaña de apertura de la sutura del muñón bronquial y fístula (herida), obliga a dejar abierto el tórax (toracostomía abierta).

Infección pulmonar (neumonía) bien por el empeoramiento y extensión de una infección previa, bien por ser adquirida en el hospital. Dolor postoperatorio que en muy raras ocasiones puede derivar en neuralgia persistente.

- **LOS MÁS GRAVES:**

Hemorragia, Infección, Neumonía en grados importantes.

- LOS DERIVADOS DE SUS PROBLEMAS DE SALUD:

---

#### SITUACIONES ESPECIALES QUE DEBEN SER TENIDAS EN CUENTA:

Los pacientes fumadores o con excesivo consumo acumulado de tabaco, al igual que los pacientes que presentan Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) o cualquiera otra enfermedad pulmonar severa tiene potencialmente aumentado el riesgo de padecer complicaciones respiratorias. Otras enfermedades de otros aparatos pueden ocasionar mayor riesgo de complicaciones relacionadas con estas enfermedades pre-existentes que el que tienen los pacientes que no las padecen.

La edad no es una contraindicación absoluta para la realización de una intervención, pero puede aumentar el riesgo de complicaciones cardiovasculares y neurovasculares y trastornos psíquicos.

---

#### OTRAS INFORMACIONES DE INTERÉS (a considerar por el/la profesional):

En determinadas circunstancias puede resultar dañado el nervio frénico (que hace moverse al diafragma) cuya consecuencia mas notable es un grado variable de insuficiencia ventilatoria. En otros casos, sobre todo cuando se opera sobre el pulmón izquierdo, puede dañarse el nervio laríngeo recurrente lo que se traducirá posteriormente en cambios en el tono de la voz.

---

#### OTRAS CUESTIONES PARA LAS QUE LE PEDIMOS SU CONSENTIMIENTO:

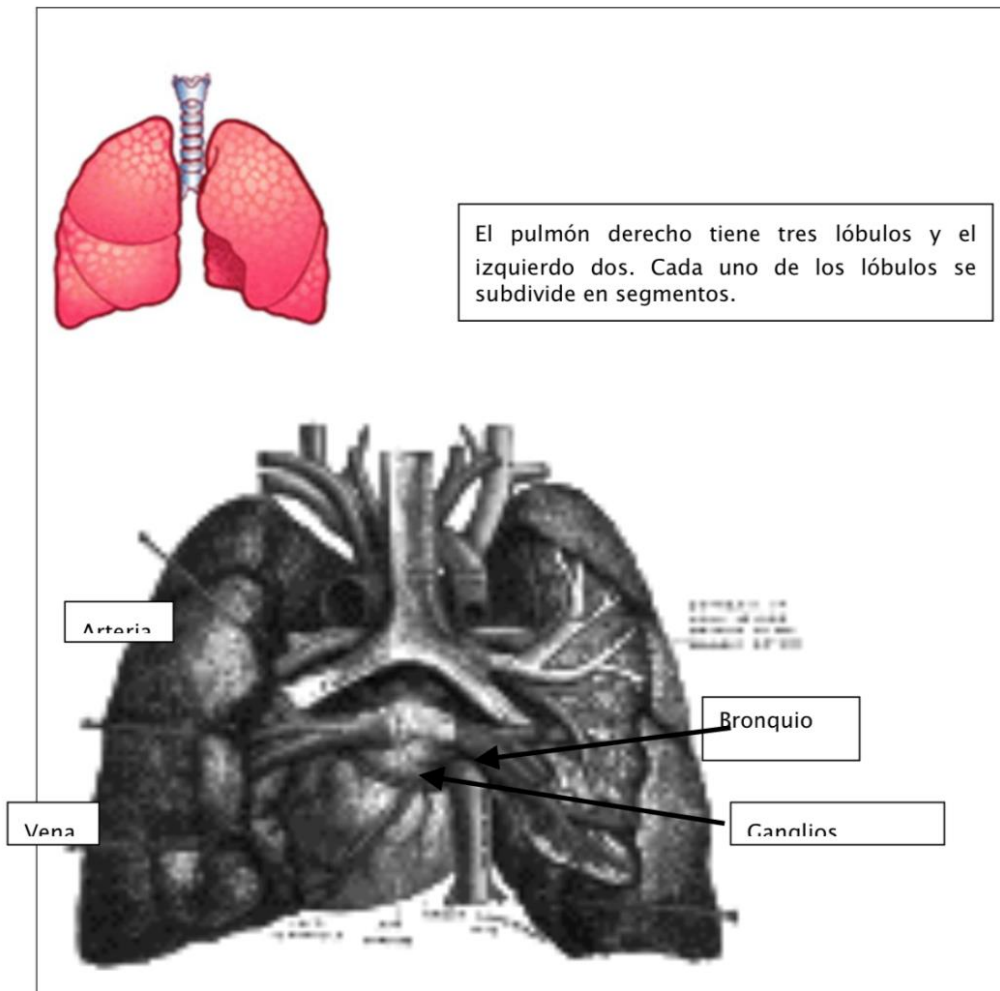
- A veces, durante la intervención, se producen hallazgos imprevistos. Pueden obligar a tener que modificar la forma de hacer la intervención y utilizar variantes de la misma no contempladas inicialmente.

- A veces es necesario tomar muestras biológicas para estudiar mejor su caso. Pueden ser conservadas y utilizadas posteriormente para realizar investigaciones relacionadas con la enfermedad que usted padece. No se usaran directamente para fines comerciales. Si fueran a ser utilizadas para otros fines distintos se le pediría posteriormente el consentimiento expreso para ello. Si no da su consentimiento para ser utilizadas en investigación, las muestras se destruirán una vez dejen de ser útiles para documentar su caso, según las normas del centro. En cualquier caso, se protegerá adecuadamente la confidencialidad en todo momento.

- También puede hacer falta tomar imágenes, como fotos o videos. Sirven para documentar mejor el caso. También pueden usarse para fines docentes de difusión del conocimiento científico. En cualquier caso serán usadas si usted da su autorización. Su identidad siempre será preservada de forma confidencial.

**1.2 IMÁGENES EXPLICATIVAS:**

(En este espacio podrán insertarse con carácter opcional imágenes explicativas, esquemas anatómicos, pictogramas etc. que faciliten y permitan explicar de manera más sencilla la información al paciente.)



En la resección hay que cerrar y cortar una o unas arterias, una o unas venas u un bronquio. Habitualmente se extirpan los ganglios linfáticos para su análisis



<b>CENTRO SANITARIO</b> A.Complejo Hospitalario de Jaén	<b>SERVICIO DE CIRUGÍA TORÁCICA</b>
--	-------------------------------------

## 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

(En el caso de INCAPACIDAD DEL/DE LA PACIENTE será necesario el consentimiento del/de la representante legal)

(En el caso del MENOR DE EDAD, cuando se considere que carece de madurez suficiente, el consentimiento lo darán sus representantes legales, aunque el menor siempre será informado de acuerdo a su grado de entendimiento y, si tiene más de 12 años, se escuchará su opinión. Si el paciente está emancipado o tiene 16 años cumplidos será él quien otorgue el consentimiento. Sin embargo, en caso de actuación de grave riesgo, según el criterio del facultativo, los representantes legales también serán informados y su opinión será tenida en cuenta para la decisión.)

### 2.1 DATOS DEL/DE LA PACIENTE Y DE SU REPRESENTANTE LEGAL (si es necesario)

APELLIDOS Y NOMBRE, DEL PACIENTE	DNI / NIE
APELLIDOS Y NOMBRE, DEL/DE LA REPRESENTANTE LEGAL	DNI / NIE

### 2.2 PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO

APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA
APELLIDOS Y NOMBRE	FECHA	FIRMA

### 2.3 CONSENTIMIENTO

Yo, D/Dña \_\_\_\_\_, manifiesto que estoy conforme con la intervención que se me ha propuesto. He leído y comprendido la información anterior. He podido preguntar y aclarar todas mis dudas. Por eso he tomado consciente y libremente la decisión de autorizarla. También sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.

SI  NO Autorizo a que se realicen las actuaciones oportunas, incluyendo modificaciones en la forma de realizar la intervención, para evitar los peligros o daños potenciales para la vida o la salud, que pudieran surgir en el curso de la intervención.

SI  NO Autorizo la conservación y utilización posterior de mis muestras biológicas para investigación relacionada directamente con la enfermedad que padezco.

SI  NO Autorizo que, en caso de que mis muestras biológicas vayan a ser utilizadas en otras investigaciones diferentes, los investigadores se pongan en contacto conmigo para solicitarme consentimiento.

SI  NO Autorizo la utilización de imágenes con fines docentes o de difusión del conocimiento científico.

(NOTA: Márquese con una cruz.)

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_  
EL/LA PACIENTE Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

Fdo.: \_\_\_\_\_ Fdo.: \_\_\_\_\_

JUNTA DE ANDALUCÍA

CONSEJERÍA DE SALUD

**CENTRO SANITARIO**

A.Complejo Hospitalario de Jaén

**SERVICIO DE CIRUGÍA TORÁCICA****2.4 RECHAZO DE LA INTERVENCIÓN**

Yo, D/Dña. \_\_\_\_\_, no autorizo a la realización de esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA PACIENTE \_\_\_\_\_ Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL \_\_\_\_\_

Fdo.:

Fdo.:

**2.5 REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

Yo, D/Dña \_\_\_\_\_, de forma libre y consciente he decidido retirar el consentimiento para esta intervención. Asumo las consecuencias que de ello puedan derivarse para la salud o la vida.

En \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA PACIENTE \_\_\_\_\_ Consentimiento/Visto Bueno de EL/LA REPRESENTANTE LEGAL \_\_\_\_\_

Fdo.:

Fdo.:

Tabla 27. Características de los pacientes con muestra disponible y comparación de la distribución según los marcadores de estudio.

	Total (n=55)	PD-L1			TIL			TGF- $\beta$			Tinción nuclear TGF- $\beta$		
		<1% (n=41)	=>1% (n=14)	p- valor	No- intenso (n=39)	Intenso (n=16)	p- valor	Baja expresión (n=7)	Alta expresión (n=48)	p- valor	Ausente (n=25)	Presente (n=30)	p- valor
<b>Sexo, n (%)</b>				1.00 0			0.16 5			0.577			1.000
Varón	49 (89.1)	36 (87.8)	13 (92.9)		33 (84.6)	16 (100)		6 (85.7)	43 (89.6)		22 (88.0)	27 (90.0)	
Mujer	6 (10.9)	5 (12.2)	1 (7.1)		6 (15.4)	0 (0)		1 (14.3)	5 (10.4)		3 (12.0)	3 (10.0)	
<b>Edad, media (DE)</b>	63.93 (9.74)	64.76 (10.17)	61.50 (8.19)	0.28 4	64.08 (9.73)	63.56 (10.07)	0.86 1	67.57 (11.23)	63.40 (9.52)	0.294	65.48 (10.19)	62.63 (9.32)	0.285
<b>Histología, n (%)</b>				0.09 7			0.62 6			0.686			0.095
Escamoso	23 (41.8)	14 (34.1)	9 (64.3)		15 (38.5)	8 (50.0)		2 (28.6)	21 (43.8)		14 (56.0)	9 (30.0)	
No escamoso	32 (58.2)	27 (65.9)	5 (35.7)		24 (61.5)	8 (50.0)		5 (71.4)	27 (56.3)		11 (44.0)	21 (70.0)	
<b>Estadio, n (%)</b>				0.18 9			0.58 5			1.000			0.864
I	33 (60.0)	27 (65.9)	6 (42.9)		22 (56.4)	11 (68.8)		4 (57.1)	29 (60.4)		14 (56.0)	19 (63.3)	
II	14 (25.5)	10 (24.4)	4 (28.6)		10 (25.6)	4 (25.0)		2 (28.6)	12 (25.0)		7 (28.0)	7 (23.3)	
III	8 (14.5)	4 (9.8)	4 (28.6)		7 (17.9)	1 (6.3)		1 (14.3)	7 (14.6)		4 (16.0)	4 (13.3)	
<b>Tipo de cirugía, n (%)</b>				0.09 9			0.69 8			0.211			0.542
Resección limitada (segmentectomía o resección en cuña)	4 (7.3)	4 (9.8)	0 (0)		3 (7.7)	1 (6.3)		1 (14.3)	3 (6.3)		3 (12.0)	1 (3.3)	
Lobectomía	39 (70.9)	31 (75.6)	8 (57.1)		26 (66.7)	13 (81.3)		6 (85.7)	33 (68.8)		17 (68.0)	22 (73.3)	

Neumonectomía	12 (21.8)	6 (14.6)	6 (42.9)		10 (25.6)	2 (12.5)		0 (0)	12 (25.0)		5 (20.0)	7 (23.3)	
<b>EGFR mutación, n (%)</b>				0.74 2			0.34 3			0.761			<b>0.039</b>
Positiva	2 (3.6)	2 (4.9)	0 (0)		1 (2.6)	1 (6.3)		0 (0)	2 (4.2)		0 (0)	2 (6.7)	
wt	31 (56.4)	24 (58.5)	7 (50.0)		24 (61.5)	7 (43.8)		5 (71.4)	26 (54.2)		11 (44.0)	20 (66.7)	
Desconocida	22 (40.0)	15 (36.6)	7 (50.0)		14 (35.9)	8 (50.0)		2 (28.6)	20 (41.7)		14 (56.0)	8 (26.7)	
<b>QT, n (%)</b>				0.09 9			0.52 7			0.346			<b>0.541</b>
No	33 (60.0)	27 (65.9)	6 (42.9)		25 (64.1)	8 (50.0)		4 (57.1)	29 (60.4)		17 (68.0)	16 (53.3)	
Adyuvante	15 (27.3)	8 (19.5)	7 (50.0)		10 (25.6)	5 (31.3)		1 (14.3)	14 (29.2)		6 (24.0)	9 (30.0)	
Neo adyuvante	7 (12.7)	6 (14.6)	1 (7.1)		4 (10.3)	3 (18.8)		2 (28.6)	5 (10.4)		2 (8.0)	5 (16.7)	

Las variables categóricas se representan por frecuencia y porcentaje. La edad se representa mediante la media y la desviación estándar (DE). Los p\_valores se calculan mediante la prueba t-Student, la prueba chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher.



**BIBLIOGRAFÍA**

1. The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med.* 2011;365(5):395-409. doi:10.1056/NEJMoa1102873
2. de Koning HJ, van der Aalst CM, de Jong PA, et al. Reduced Lung-Cancer Mortality with Volume CT Screening in a Randomized Trial. *N Engl J Med.* 2020;382(6):503-513. doi:10.1056/NEJMoa1911793
3. Sadate A, Occean BV, Beregi JP, et al. Systematic review and meta-analysis on the impact of lung cancer screening by low-dose computed tomography. *Eur J Cancer.* 2020;134:107-114. doi:10.1016/j.ejca.2020.04.035
4. James D. Brierley (Editor) Mary K. Gospodarowicz (Editor) Christian Wittekind (Editor), ed. *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition | Wiley.*; 2016. Accessed March 31, 2022. <https://www.wiley.com/en-us/TNM+Classification+of+Malignant+Tumours%2C+8th+Edition-p-9781119263579>
5. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39-51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009
6. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243-1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630
7. Garrido P, Conde E, de Castro J, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* 2020;22(7):989-1003. doi:10.1007/s12094-019-02218-4
8. Isla D, Lozano MD, Paz-Ares L, et al. New update to the guidelines on testing predictive biomarkers in non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* Published online 2022. doi:10.1007/s12094-022-03046-9
9. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29:iv192-iv237. doi:10.1093/annonc/mdy275
10. Majem M, Juan O, Insa A, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol.* 2019;21(1):3-17. doi:10.1007/s12094-018-1978-1

11. Las\_cifras\_del\_Cancer\_en\_Espana\_2023.pdf. Accessed February 3, 2023. [https://seom.org/images/Las\\_cifras\\_del\\_Cancer\\_en\\_Espana\\_2023.pdf](https://seom.org/images/Las_cifras_del_Cancer_en_Espana_2023.pdf)
12. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660
13. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2017;28:iv1-iv21. doi:10.1093/annonc/mdx222
14. Rueth NM, Andrade RS. Is VATS Lobectomy Better: Perioperatively, Biologically and Oncologically? *Ann Thorac Surg.* 2010;89(6):S2107-S2111. doi:10.1016/j.athoracsur.2010.03.020
15. Petrella F, Spaggiari L. The smaller the better: a new concept in thoracic surgery? *Lancet Oncol.* 2016;17(6):699-700. doi:10.1016/S1470-2045(16)30049-3
16. Bendixen M, Jørgensen OD, Kronborg C, Andersen C, Licht PB. Postoperative pain and quality of life after lobectomy via video-assisted thoracoscopic surgery or anterolateral thoracotomy for early stage lung cancer: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):836-844. doi:10.1016/S1470-2045(16)00173-X
17. Ma L, Xiang J. Clinical outcomes of video-assisted thoracic surgery and stereotactic body radiation therapy for early-stage non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Thorac Cancer.* 2016;7(4):442-451. doi:10.1111/1759-7714.12352
18. Tandberg DJ, Tong BC, Ackerson BG, Kelsey CR. Surgery versus stereotactic body radiation therapy for stage I non-small cell lung cancer: A comprehensive review. *Cancer.* 2018;124(4):667-678. doi:10.1002/cncr.31196
19. De Leyn P, Doooms C, Kuzdzal J, et al. Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014;45(5):787-798. doi:10.1093/ejcts/ezu028
20. Leiro-Fernández V, Fernández-Villar A. Mediastinal staging for non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10(1). doi:10.21037/tlcr.2020.03.08
21. Burdett S, Rydzewska L, Tierney J, et al. Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. Cochrane Lung Cancer Group, ed. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;2016(10). doi:10.1002/14651858.CD002142.pub4
22. Lally BE, Zelterman D, Colasanto JM, Haffty BG, Detterbeck FC, Wilson LD. Postoperative Radiotherapy for Stage II or III Non-Small-Cell Lung Cancer Using the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. *J Clin Oncol.* 2006;24(19):2998-3006. doi:10.1200/JCO.2005.04.6110
23. Pechoux CL, Pourel N, Barlesi F, et al. Postoperative radiotherapy versus no postoperative radiotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer and proven mediastinal N2 involvement (Lung ART, IFCT 0503): an

- open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(1):104-114. doi:10.1016/S1470-2045(21)00606-9
24. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *The Lancet.* 2010;375(9722):1267-1277. doi:10.1016/S0140-6736(10)60059-1
  25. Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *The Lancet.* 2014;383(9928):1561-1571. doi:10.1016/S0140-6736(13)62159-5
  26. Artal Cortés Á, Calera Urquizu L, Hernando Cubero J. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: state-of-the-art. *Transl Lung Cancer Res.* 2015;4(2):191-197. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.06.01
  26. Rev. Cáncer (Madrid) Vol. 32, Supl. 1, pp. 1-3, 2018.
  28. 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):1823-1833. doi:10.1056/NEJMoa1606774
  29. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *J Clin Oncol.* 2019;37(7):537-546. doi:10.1200/JCO.18.00149
  30. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med.* 2020;383(14):1328-1339. doi:10.1056/NEJMoa1917346
  31. Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, et al. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *The Lancet.* 2021;397(10274):592-604. doi:10.1016/S0140-6736(21)00228-2
  32. Borghaei H, Langer CJ, Paz-Ares L, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with advanced non–small cell lung cancer without tumor PD-L1 expression: A pooled analysis of 3 randomized controlled trials. *Cancer.* 2020;126(22):4867-4877. doi:10.1002/cncr.33142
  33. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021;22(2):198-211. doi:10.1016/S1470-2045(20)30641-0
  34. Granados ALO, Garay DF, Quesada NC, et al. EP1.04-05 Outcomes of Immunotherapy in Elderly Patients. Retrospective Study of Clinical Characteristics in a Single-Center and a 4-Year Experience. *J Thorac Oncol.* 2019;14(10):S968. doi:10.1016/j.jtho.2019.08.2121

35. Rothschild SI, Nachbur R, Herzog N, Passweg JR, Pless M. Second-line therapy improves overall survival in primary refractory non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *ESMO Open*. 2021;6(1). doi:10.1016/j.esmoop.2020.100013
36. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(20):1919-1929. doi:10.1056/NEJMoa1709937
37. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. Published online February 2, 2022;JCO.21.01308. doi:10.1200/JCO.21.01308
38. Brahmer JR, Govindan R, Anders RA, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Immunother Cancer*. 2018;6:75. doi:10.1186/s40425-018-0382-2
39. Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, et al. Tumor Mutation Burden and Efficacy of Nivolumab Monotherapy and in Combination With Ipilimumab in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(5):853-861.e4. doi:10.1016/j.ccell.2018.04.001
40. Cárdenas Quesada N, Ortega Granados AL, Márquez Lobo B, Rosa Garrido C, Sanchez Rovira P, Núñez Torres MI. Evaluation of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and survival in patients with resected non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2019;37(15\_suppl):e20010-e20010. doi:10.1200/JCO.2019.37.15\_suppl.e20010
41. Granados ALO, Verdejo FJG, Quesada NC, et al. P1.07-036 LC-HRMS Metabolomics Profiling in Advanced NSCLC Treated with Anti PD-1 Agents. Metabolic Features at Diagnosis and at Response Evaluation. *J Thorac Oncol*. 2017;12(11):S2009-S2010. doi:10.1016/j.jtho.2017.09.954
42. Banna GL, Passiglia F, Colonese F, et al. Immune-checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer: A tool to improve patients' selection. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2018;129:27-39. doi:10.1016/j.critrevonc.2018.06.016
43. Cárdenas Quesada N, Ortega Granados AL, Márquez Lobo B, et al. Histological features and survival in NSCLC patients treated with surgery with curative intention. *J Clin Oncol*. 2017;35(15\_suppl):e20080-e20080. doi:10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.e20080
44. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-247. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026
45. Provencio M, Serna-Blasco R, Nadal E, et al. Overall Survival and Biomarker Analysis of Neoadjuvant Nivolumab Plus Chemotherapy in Operable Stage IIIA

- Non-Small-Cell Lung Cancer (NADIM phase II trial). *J Clin Oncol*. 2022;40(25):2924-2933. doi:10.1200/JCO.21.02660
46. Jiang J, Wang Y, Gao Y, et al. Neoadjuvant immunotherapy or chemoimmunotherapy in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res*. 2022;11(2):277-294. doi:10.21037/tlcr-22-75
  47. Makoto M, Akira I, Kunihiko K, et al. Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N Engl J Med*. Published online 2010:9.
  48. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-246. doi:10.1016/S1470-2045(11)70393-X
  49. Mitsudomi T, Tada H. EGFR Gene Mutations: Is it Prognostic or Predictive in Surgically Resected Lung Cancer? *J Thorac Oncol*. 2012;7(12):1739-1741. doi:10.1097/JTO.0b013e3182743a0c
  50. Le T, Gerber DE. ALK mutation and inhibition in lung cancer. *Semin Cancer Biol*. 2017;42:81-88. doi:10.1016/j.semcancer.2016.08.007
  51. Tao Y, Zhou Y, Tang L, Chen H, Feng Y, Shi Y. Toxicity profile of anaplastic lymphoma kinase tyrosine kinase inhibitors for patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Invest New Drugs*. 2022;40(4):831-840. doi:10.1007/s10637-022-01242-6
  52. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007;448(7153):561-566. doi:10.1038/nature05945
  53. Minca EC, Portier BP, Wang Z, et al. ALK Status Testing in Non-Small Cell Lung Carcinoma: Correlation Between Ultrasensitive IHC and FISH. *J Mol Diagn*. 2013;15(3):341-346. doi:10.1016/j.jmoldx.2013.01.004
  54. Luk PP, Selinger CI, Mahar A, Cooper WA. Biomarkers for ALK and ROS1 in Lung Cancer: Immunohistochemistry and Fluorescent In Situ Hybridization. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(8):922-928. doi:10.5858/arpa.2017-0502-RA
  55. Lung J, Lin YC, Hung MS, et al. A sensitive and high throughput TaqMan-based reverse transcription quantitative polymerase chain reaction assay efficiently discriminates ALK rearrangement from overexpression for lung cancer FFPE specimens. *Lung Cancer Amst Neth*. 2016;94:114-120. doi:10.1016/j.lungcan.2016.02.004
  56. Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *Eur Soc Med Oncol*. Published online 2020:71.
  57. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine

- Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(3):321-346. doi:10.5858/arpa.2017-0388-CP
58. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al. EGFR Tyrosine Kinase Domain Mutations Are Detected in Histologically Normal Respiratory Epithelium in Lung Cancer Patients. *Cancer Res.* 2005;65(17):7568-7572. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1705
59. Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Risk Factors for Tumor Recurrence in Patients With Early-Stage (Stage I and II) Non-small Cell Lung Cancer: Patient Selection Criteria for Adjuvant Chemotherapy According to the Seventh Edition TNM Classification. *CHEST.* 2011;140(6):1494-1502. doi:10.1378/chest.10-3279
60. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *CHEST.* 2017;151(1):193-203. doi:10.1016/j.chest.2016.10.010
61. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *J Thorac Oncol.* 2007;2(8):706-714. doi:10.1097/JTO.0b013e31812f3c1a
62. Ferreirós J, Cabeza B, Gayete Á, et al. Recomendaciones para el diagnóstico radiológico y la valoración de la respuesta terapéutica en el cáncer de pulmón. Consenso nacional de la Sociedad Española de Radiología Médica y la Sociedad Española de Oncología Médica. *Radiología.* 2015;57(1):66-78. doi:10.1016/j.rx.2014.10.002
63. Akhurst T. Staging of Non-Small-Cell Lung Cancer. *PET Clin.* 2018;13(1):1-10. doi:10.1016/j.cpet.2017.09.004
64. Rami-Porta R, Call S, Doooms C, et al. Lung cancer staging: a concise update. *Eur Respir J.* 2018;51(5). doi:10.1183/13993003.00190-2018
65. Massutí B, Nadal E, Camps C, et al. P1.09-03 Multidisciplinary Thoracic Tumors Board Survey in Spain. *J Thorac Oncol.* 2022;17(9):S107. doi:10.1016/j.jtho.2022.07.178
66. Guirado M, Sanchez-Hernandez A, Pijuan L, Teixido C, Gómez-Caamaño A, Cilleruelo-Ramos Á. Quality indicators and excellence requirements for a multidisciplinary lung cancer tumor board by the Spanish Lung Cancer Group. *Clin Transl Oncol.* 2022;24(3):446-459. doi:10.1007/s12094-021-02712-8
62. Protocolo de tratamiento del cáncer de pulmón del subcomité de tumores torácicos del Hospital Universitario de Jaén. Actualización 2019. Coordinan: Nuria Cárdenas Quesada, Miguel Ángel Moreno Jiménez y Ana Laura Ortega Granados. ISBN: 978-84-1331-231-6.



68. Tobacco EURO. Accessed December 8, 2022. <https://www.who.int/europe/health-topics/tobacco>
69. Laniado-Laborín R. Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Parallel Epidemics of the 21st Century. *Int J Environ Res Public Health*. 2009;6(1):209-224. doi:10.3390/ijerph6010209
70. Doll R, Hill AB. Smoking and Carcinoma of the Lung. *Br Med J*. 1950;2(4682):739-748.
71. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest*. 2007;132(3):29S-55S. doi:10.1378/chest.07-1347
72. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):733-744. doi:10.1038/nrc1190
73. Zhang WP, Yang C, Xu LJ, Wang W, Song L, He XF. Individual and combined effects of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms on lung cancer risk. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(26):e26104. doi:10.1097/MD.00000000000026104
74. Carlsten C, Sagoo GS, Frodsham AJ, Burke W, Higgins JPT. Glutathione S-Transferase M1 (GSTM1) Polymorphisms and Lung Cancer: A Literature-based Systematic HuGE Review and Meta-Analysis. *Am J Epidemiol*. 2008;167(7):759-774. doi:10.1093/aje/kwm383
75. Okamoto T, Suzuki Y, Fujishita T, et al. The prognostic impact of the amount of tobacco smoking in non-small cell lung cancer—Differences between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Lung Cancer*. 2014;85(2):125-130. doi:10.1016/j.lungcan.2014.06.006
76. Zhang Z, Xu F, Wang S, Li N, Wang C. Influence of smoking on histologic type and the efficacy of adjuvant chemotherapy in resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008;60(3):434-440. doi:10.1016/j.lungcan.2007.10.013
77. Nia PS, Weyler J, Colpaert C, Vermeulen P, Marck EV, Schil PV. Prognostic value of smoking status in operated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2005;47(3):351-359. doi:10.1016/j.lungcan.2004.08.011
78. Videtic GMM, Stitt LW, Dar AR, et al. Continued Cigarette Smoking by Patients Receiving Concurrent Chemoradiotherapy for Limited-Stage Small-Cell Lung Cancer Is Associated With Decreased Survival. *J Clin Oncol*. 2003;21(8):1544-1549. doi:10.1200/JCO.2003.10.089
79. Lugg ST, Tikka T, Agostini PJ, et al. Smoking and timing of cessation on postoperative pulmonary complications after curative-intent lung cancer surgery. *J Cardiothorac Surg*. 2017;12:52. doi:10.1186/s13019-017-0614-4
80. Día Mundial Sin Tabaco. Accessed December 8, 2022. <https://www.who.int/es/campaigns/world-no-tobacco-day>

81. Rami-Porta R, Wittekind C, Goldstraw P. Complete resection in lung cancer surgery: proposed definition. *Lung Cancer*. 2005;49(1):25-33. doi:10.1016/j.lungcan.2005.01.001
82. Gagliasso M, Migliaretti G, Ardisson F. Assessing the prognostic impact of the International Association for the Study of Lung Cancer proposed definitions of complete, uncertain, and incomplete resection in non-small cell lung cancer surgery. *Lung Cancer*. 2017;111:124-130. doi:10.1016/j.lungcan.2017.07.013
83. Zhang Y, Sun Y, Wang R, Ye T, Zhang Y, Chen H. Meta-analysis of lobectomy, segmentectomy, and wedge resection for stage I non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol*. 2015;111(3):334-340. doi:10.1002/jso.23800
84. Divisi D, Vico AD, Zaccagna G, Crisci R. Lobectomy versus sublobar resection in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review. *J Thorac Dis*. 2020;12(6). doi:10.21037/jtd.2020.02.54
85. Blasberg JD, Pass HI, Donington JS. Sublobar Resection: A Movement from the Lung Cancer Study Group. *J Thorac Oncol*. 2010;5(10):1583-1593. doi:10.1097/JTO.0b013e3181e77604
86. Altorki NK, Wang X, Kozono D, et al. PL03.06 Lobar or Sub-lobar Resection for Peripheral Clinical Stage IA = 2 cm Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC): Results From an International Randomized Phase III Trial (CALGB 140503 [Alliance]). *J Thorac Oncol*. 2022;17(9, Supplement):S1-S2. doi:10.1016/j.jtho.2022.07.012
87. Veluswamy RR, Ezer N, Mhango G, et al. Limited Resection Versus Lobectomy for Older Patients With Early-Stage Lung Cancer: Impact of Histology. *J Clin Oncol*. 2015;33(30):3447-3453. doi:10.1200/JCO.2014.60.6624
88. Batihan G, Ceylan KC, Usluer O, Kaya ŞÖ. Video-Assisted Thoracoscopic Surgery vs Thoracotomy for Non-Small Cell Lung Cancer Greater Than 5 cm: Is VATS a feasible approach for large tumors? *J Cardiothorac Surg*. 2020;15:261. doi:10.1186/s13019-020-01305-w
89. Belardinilli F, Pernazza A, Mahdavian Y, et al. A multidisciplinary approach for the differential diagnosis between multiple primary lung adenocarcinomas and intrapulmonary metastases. *Pathol - Res Pract*. 2021;220:153387. doi:10.1016/j.prp.2021.153387
90. Griffioen GHMJ, Lagerwaard FJ, Haasbeek CJA, Smit EF, Slotman BJ, Senan S. Treatment of multiple primary lung cancers using stereotactic radiotherapy, either with or without surgery. *Radiother Oncol*. 2013;107(3):403-408. doi:10.1016/j.radonc.2013.04.026
91. Ishikawa Y, Nakayama H, Ito H, et al. Surgical Treatment for Synchronous Primary Lung Adenocarcinomas. *Ann Thorac Surg*. 2014;98(6):1983-1988. doi:10.1016/j.athoracsur.2014.07.006



92. Zhang W, Wei Y, Jiang H, Xu J, Yu D. Video-Assisted Thoracoscopic Surgery Versus Thoracotomy Lymph Node Dissection in Clinical Stage I Lung Cancer: A Meta-Analysis and System Review. *Ann Thorac Surg.* 2016;101(6):2417-2424. doi:10.1016/j.athoracsur.2015.11.055
93. Nath TS, Mohamed N, Gill PK, Khan S. A Comparative Analysis of Video-Assisted Thoracoscopic Surgery and Thoracotomy in Non-Small-Cell Lung Cancer in Terms of Their Oncological Efficacy in Resection: A Systematic Review. *Cureus.* 14(5):e25443. doi:10.7759/cureus.25443
94. Watanabe A, Koyanagi T, Ohsawa H, et al. Systematic node dissection by VATS is not inferior to that through an open thoracotomy: A comparative clinicopathologic retrospective study. *Surgery.* 2005;138(3):510-517. doi:10.1016/j.surg.2005.04.005
95. D'Amico TA, Niland J, Mamet R, Zornosa C, Dexter EU, Onaitis MW. Efficacy of mediastinal lymph node dissection during lobectomy for lung cancer by thoracoscopy and thoracotomy. *Ann Thorac Surg.* 2011;92(1):226-231; discussion 231-232. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.03.134
96. Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1978;76(6):832-839. doi:10.1016/S0022-5223(19)39559-5
97. 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):454-465. doi:10.1016/j.arbres.2011.06.013
98. Huang X, Wang J, Chen Q, Jiang J. Mediastinal Lymph Node Dissection versus Mediastinal Lymph Node Sampling for Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE.* 2014;9(10):e109979. doi:10.1371/journal.pone.0109979
99. Kai L, Zhoumiao C, Shaohua X, et al. The lymph node ratio predicts cancer-specific survival of node-positive non-small cell lung cancer patients: a population-based SEER analysis. *J Cardiothorac Surg.* 2021;16(1):13. doi:10.1186/s13019-020-01390-x
100. Matsuguma H, Oki I, Nakahara R, et al. Proposal of new nodal classifications for non-small-cell lung cancer based on the number and ratio of metastatic lymph nodes. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2012;41(1):19-24. doi:10.1016/j.ejcts.2011.04.016
101. Ludwig MS, Goodman M, Miller DL, Johnstone PAS. Postoperative survival and the number of lymph nodes sampled during resection of node-negative non-small cell lung cancer. *Chest.* 2005;128(3):1545-1550. doi:10.1378/chest.128.3.1545
102. Feng N, Wu B, Zhang X, et al. Lymph node ratio predicts overall survival in patients with stage II non-small cell lung cancer: a population-based SEER analysis. *Discov Oncol.* 2022;13(1):75. doi:10.1007/s12672-022-00542-w

103. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(2):244-285. doi:10.1097/JTO.0b013e318206a221
104. Navani N, Brown JM, Nankivell M, et al. Suitability of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Specimens for Subtyping and Genotyping of Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(12):1316-1322. doi:10.1164/rccm.201202-0294OC
105. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, 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 Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2011;24(5):653-664. doi:10.1038/modpathol.2010.232
106. Warth A, Muley T, Meister M, et al. The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2012;30(13):1438-1446. doi:10.1200/JCO.2011.37.2185
107. Yu Y, Jian H, Shen L, Zhu L, Lu S. Lymph node involvement influenced by lung adenocarcinoma subtypes in tumor size  $\leq 3$  cm disease: A study of 2268 cases. *Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol.* 2016;42(11):1714-1719. doi:10.1016/j.ejso.2016.02.247
108. Yeh YC, Nitadori J ichi, Kadota K, et al. Using frozen section to identify histological patterns in stage I lung adenocarcinoma of  $\leq 3$  cm: accuracy and interobserver agreement. *Histopathology.* 2015;66(7):922-938. doi:10.1111/his.12468
109. Kadota K, Nitadori J ichi, Woo KM, et al. Comprehensive Pathological Analyses in Lung Squamous Cell Carcinoma: Single Cell Invasion, Nuclear Diameter, and Tumor Budding Are Independent Prognostic Factors for Worse Outcomes. *J Thorac Oncol.* 2014;9(8):1126-1139. doi:10.1097/JTO.0000000000000253
110. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:e149185. doi:10.1155/2014/149185
111. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, et al. Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Neoplasms. *Ann Thorac Surg.* 2009;87(2):365-372. doi:10.1016/j.athoracsur.2008.10.067
112. Romero Vielva L. Tumor lymphocytic infiltration in non-small cell lung cancer: the ultimate prognostic marker? Published online January 1, 2016. doi:10.21037/tlcr.2016.07.07

113. Broussard EK, Disis ML. TNM staging in colorectal cancer: T is for T cell and M is for memory. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(6):601-603. doi:10.1200/JCO.2010.32.9078
114. Horne ZD, Jack R, Gray ZT, et al. Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer. *J Surg Res*. 2011;171(1):1-5. doi:10.1016/j.jss.2011.03.068
115. Kilic A, Landreneau RJ, Luketich JD, Pennathur A, Schuchert MJ. Density of tumor-infiltrating lymphocytes correlates with disease recurrence and survival in patients with large non-small-cell lung cancer tumors. *J Surg Res*. 2011;167(2):207-210. doi:10.1016/j.jss.2009.08.029
116. Chen B, Li H, Liu C, et al. Prognostic value of the common tumour-infiltrating lymphocyte subtypes for patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2020;15(11 November). doi:10.1371/journal.pone.0242173
117. Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(3):dju435. doi:10.1093/jnci/dju435
118. Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, et al. Prognostic Effect of Tumor Lymphocytic Infiltration in Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2016;34(11):1223-1230. doi:10.1200/JCO.2015.63.0970
119. Bremnes RM, Busund LT, Kilvær TL, et al. The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(6):789-800. doi:10.1016/j.jtho.2016.01.015
120. Donnem T, Hald SM, Paulsen EE, et al. Stromal CD8+ T-cell Density—A Promising Supplement to TNM Staging in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015;21(11):2635-2643. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1905
121. Geng Y, Shao Y, He W, et al. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2015;37(4):1560-1571. doi:10.1159/000438523
122. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-1570. doi:10.1126/science.1203486
123. Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, et al. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer*. 2004;91(9):1711-1717. doi:10.1038/sj.bjc.6602201
124. Péguillet I, Milder M, Louis D, et al. High Numbers of Differentiated Effector CD4 T Cells Are Found in Patients with Cancer and Correlate with Clinical

- Response after Neoadjuvant Therapy of Breast Cancer. *Cancer Res.* 2014;74(8):2204-2216. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2269
125. Rochigneux P, Garcia AJ, Chanez B, Madroszyk A, Olive D, Garon EB. Medical Treatment of Lung Cancer: Can Immune Cells Predict the Response? A Systematic Review. *Front Immunol.* 2020;11:1036. doi:10.3389/fimmu.2020.01036
  126. Tuminello S, Veluswamy R, Lieberman-Cribbin W, et al. Prognostic value of immune cells in the tumor microenvironment of early-stage lung cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2019;10(67):7142-7155. doi:10.18632/oncotarget.27392
  127. Duchemann B, Remon J, Naigeon M, et al. Current and future biomarkers for outcomes with immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2021;10(6):2937-2954. doi:10.21037/tlcr-20-839
  128. He Y, Yu H, Rozeboom L, et al. LAG-3 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Relationship with PD-1/PD-L1 and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Thorac Oncol.* 2017;12(5):814-823. doi:10.1016/j.jtho.2017.01.019
  129. Paz-Ares L, Spira A, Raben D, et al. Outcomes with durvalumab by tumour PD-L1 expression in unresectable, stage III non-small-cell lung cancer in the PACIFIC trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2020;31(6):798-806. doi:10.1016/j.annonc.2020.03.287
  130. Cárdenas-Quesada N, Díaz-Beltrán L, Rosa-Garrido C, et al. TGF- $\beta$  Nuclear Staining as a Potential Relapse Risk Factor in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(22):13780. doi:10.3390/ijms232213780
  131. Lin G, Fan X, Zhu W, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression and tumor infiltrating lymphocyte in surgically resectable non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(48):83986-83994. doi:10.18632/oncotarget.20233
  132. Tufman A, Neumann J, Manapov F, et al. Prognostic and predictive value of PD-L1 expression and tumour infiltrating lymphocytes (TiLs) in locally advanced NSCLC treated with simultaneous radiochemotherapy in the randomized, multicenter, phase III German Intergroup lung Trial (GILT). *Lung Cancer.* 2021;160:17-27. doi:10.1016/j.lungcan.2021.07.008
  133. Butter R, Hondelink LM, van Elswijk L, et al. The impact of a pathologist's personality on the interobserver variability and diagnostic accuracy of predictive PD-L1 immunohistochemistry in lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth.* 2022;166:143-149. doi:10.1016/j.lungcan.2022.03.002
  134. Khunger M, Hernandez AV, Pasupuleti V, et al. Programmed Cell Death 1 (PD-1) Ligand (PD-L1) Expression in Solid Tumors As a Predictive Biomarker of Benefit From PD-1/PD-L1 Axis Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JCO Precis Oncol.* 2017;1:1-15. doi:10.1200/PO.16.00030

135. Grizzi G, Caccese M, Gkoutakos A, et al. Putative predictors of efficacy for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer: facing the complexity of the immune system. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(12):1055-1069. doi:10.1080/14737159.2017.1393333
136. Hansen AR, Siu LL. PD-L1 Testing in Cancer: Challenges in Companion Diagnostic Development. *JAMA Oncol.* 2016;2(1):15-16. doi:10.1001/jamaoncol.2015.4685
137. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2455-2465. doi:10.1056/NEJMoa1200694
138. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443-2454. doi:10.1056/NEJMoa1200690
139. Taube JM, Klein A, Brahmer JR, et al. Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Clin Cancer Res.* 2014;20(19):5064-5074. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3271
140. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer | Nature. Accessed December 27, 2022. <https://www.nature.com/articles/nature13904>
141. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance - PMC. Accessed December 27, 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4246418/>
142. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014;515(7528):563-567. doi:10.1038/nature14011
143. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2018-2028. doi:10.1056/NEJMoa1501824
144. Schultheis AM, Scheel AH, Ozretić L, et al. PD-L1 expression in small cell neuroendocrine carcinomas. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2015;51(3):421-426. doi:10.1016/j.ejca.2014.12.006
145. Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG, et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2015;10(7):985-989. doi:10.1097/JTO.0000000000000526
146. Sholl LM, Aisner DL, Allen TC, et al. Programmed death ligand-1 immunohistochemistry-A new challenge for pathologists: A perspective from members of the pulmonary pathology society. *Arch Patol Med Lab.* Published online April 2016. doi:10.5858/arpa.2015-0506-SA

147. Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2011;121(6):233-251. doi:10.1042/CS20110086
148. Moustakas A, Heldin P. TGF $\beta$  and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2014;1840(8):2621-2634. doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.004
149. Malliri A, Yeudall W, Nikolic M, Crouch D, Kenneth E, Ozanne B. Sensitivity to transforming growth factor  $\beta$ 1-induced growth arrest is common in human squamous cell carcinoma cell lines: c-MYC down-regulation and p21(waf1) induction are important early events. *Cell Growth Differ Mol Biol J Am Assoc Cancer Res*. 1996;7:1291-1304.
150. Loss of TGF $\beta$  Signaling Destabilizes Homeostasis and Promotes Squamous Cell Carcinomas in Stratified Epithelia: Cancer Cell. Accessed December 27, 2022. [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(07\)00239-5](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(07)00239-5)
151. Bierie B, Moses HL. TGF- $\beta$  and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(1):29-40. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.09.006
152. Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF- $\beta$  superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(1):41-58. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.09.009
153. Massagué J. TGFbeta in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-230. doi:10.1016/j.cell.2008.07.001
154. Connolly EC, Freimuth J, Akhurst RJ. Complexities of TGF- $\beta$  Targeted Cancer Therapy. *Int J Biol Sci*. 2012;8(7):964-978. doi:10.7150/ijbs.4564
155. Tschernia NP, Gulley JL. Tumor in the Crossfire: Inhibiting TGF- $\beta$  to Enhance Cancer Immunotherapy. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther*. 2022;36(2):153-180. doi:10.1007/s40259-022-00521-1
156. Paz-Ares L, Kim TM, Vicente D, et al. Bintrafusp Alfa, a Bifunctional Fusion Protein Targeting TGF- $\beta$  and PD-L1, in Second-Line Treatment of Patients With NSCLC: Results From an Expansion Cohort of a Phase 1 Trial. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2020;15(7):1210-1222. doi:10.1016/j.jtho.2020.03.003
157. Li J, Shen C, Wang X, et al. Prognostic value of TGF- $\beta$  in lung cancer: systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):691. doi:10.1186/s12885-019-5917-5
158. Sanchez-Céspedes M. Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer Amst Neth*. 2003;40(2):111-121. doi:10.1016/s0169-5002(03)00033-3



159. Oxnard GR, Binder A, Jänne PA. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31(8):1097-1104. doi:10.1200/JCO.2012.42.9829
160. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(3):169-181. doi:10.1038/nrc2088
161. Asami K, Atagi S. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for non-small cell lung cancer. *World J Clin Oncol*. 2014;5(4):646-659. doi:10.5306/wjco.v5.i4.646
162. Douillard JY, Shepherd FA, Hirsh V, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomized phase III INTEREST trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010;28(5):744-752. doi:10.1200/JCO.2009.24.3030
163. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. 2004;350(21):2129-2139. doi:10.1056/NEJMoa040938
164. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304(5676):1497-1500. doi:10.1126/science.1099314
165. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(10):958-967. doi:10.1056/NEJMoa0904554
166. Mitsudomi T, Kosaka T, Yatabe Y. Biological and clinical implications of EGFR mutations in lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2006;11(3):190-198. doi:10.1007/s10147-006-0583-4
167. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, Mitsudomi T. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(5):633-639. doi:10.1097/01.pas.0000157935.28066.35
168. García-Foncillas J, Garrido P, Gómez J, Palacios J, Tarón M. Recomendaciones para la determinación de las mutaciones del gen EGFR en el carcinoma de pulmón no microcítico. *Rev Esp Patol*. 2011;44(1):17-31. doi:10.1016/j.patol.2011.02.003
169. Wang X, Goldstein D, Crowe PJ, Yang JL. Next-generation EGFR/HER tyrosine kinase inhibitors for the treatment of patients with non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations: a review of the evidence. *OncoTargets Ther*. 2016;9:5461-5473. doi:10.2147/OTT.S94745
170. Rosell R, Molina MA, Costa C, et al. Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(5):1160-1168. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2158

171. Jackman D, Miller V, Cioffredi LA, et al. Impact of Epidermal Growth Factor Receptor and KRAS Mutations on Clinical Outcomes in Previously Untreated Non-Small Cell Lung Cancer Patients: Results of an Online Tumor Registry of Clinical Trials. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2009;15:5267-5273. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0888
172. Yang JCH, Wu YL, Schuler M, et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol*. 2015;16(2):141-151. doi:10.1016/S1470-2045(14)71173-8
173. Neal JW, Sequist LV. Adjuvant molecularly targeted therapy—epidermal growth factor tyrosine kinase inhibition and beyond. *Transl Lung Cancer Res*. 2013;2(5):411-414. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2013.10.06
174. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, et al. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2012;7(12):1815-1822. doi:10.1097/JTO.0b013e31826bb7b2
175. Ohba T, Toyokawa G, Kometani T, et al. Mutations of the EGFR and K-ras genes in resected stage I lung adenocarcinoma and their clinical significance. *Surg Today*. 2014;44(3):478-486. doi:10.1007/s00595-013-0589-2
176. Takamochi K, Oh S, Matsunaga T, Suzuki K. Prognostic impacts of EGFR mutation status and subtype in patients with surgically resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;154(5):1768-1774.e1. doi:10.1016/j.jtcvs.2017.06.062
177. Kelly K, Altorki NK, Eberhardt WEE, et al. Adjuvant Erlotinib Versus Placebo in Patients With Stage IB-III A Non-Small-Cell Lung Cancer (RADIANT): A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2015;33(34):4007-4014. doi:10.1200/JCO.2015.61.8918
178. Pennell NA, Neal JW, Chaft JE, et al. SELECT: A Phase II Trial of Adjuvant Erlotinib in Patients With Resected Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2019;37(2):97-104. doi:10.1200/JCO.18.00131
179. Gefitinib versus vinorelbina más cisplatino como tratamiento adyuvante para el NSCLC con mutación en EGFR en estadio II-III A (N1-N2) (ADJUVANT/CTONG1104): un estudio aleatorizado, abierto, de fase 3 - PubMed. Accessed December 28, 2022. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29174310/>
180. Wu YL, Herbst RS, Mann H, Rukazenzov Y, Marotti M, Tsuboi M. ADAURA: Phase III, Double-blind, Randomized Study of Osimertinib Versus Placebo in EGFR Mutation-positive Early-stage NSCLC After Complete Surgical Resection. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(4):e533-e536. doi:10.1016/j.clcc.2018.04.004



181. Wu YL, Tsuboi M, John T, et al. A plain language summary of results from the ADAURA study: osimertinib after surgery for patients who have early-stage EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Future Oncol Lond Engl*. 2021;17(35):4827-4835. doi:10.2217/fon-2021-0752
182. Wu YL, Tsuboi M, He J, et al. Osimertinib in Resected EGFR -Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020;383(18):1711-1723. doi:10.1056/NEJMoa2027071
183. Wu YL, John T, Grohe C, et al. Postoperative Chemotherapy Use and Outcomes From ADAURA: Osimertinib as Adjuvant Therapy for Resected EGFR-Mutated NSCLC. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2022;17(3):423-433. doi:10.1016/j.jtho.2021.10.014
184. Majem M, Goldman JW, John T, et al. Health-Related Quality of Life Outcomes in Patients with Resected Epidermal Growth Factor Receptor-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer Who Received Adjuvant Osimertinib in the Phase III ADAURA Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2022;28(11):2286-2296. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-3530
185. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*. 1982;5(6):649-655.
186. Krohn D. PD-L1 IHC 22C3 pharmDx, Interpretation Manual, NSCLC 1% 50%. Published online April 27, 2021. [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29158\\_pd-11-ihc-22C3-pharmdx-nsclc-interpretation-manual.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/29158_pd-11-ihc-22C3-pharmdx-nsclc-interpretation-manual.pdf)
187. Xue YJ, Lu Q, Sun ZX. CD147 overexpression is a prognostic factor and a potential therapeutic target in bladder cancer. *Med Oncol*. 2011;28(4):1363-1372. doi:10.1007/s12032-010-9582-4
188. Huang AL, Liu SG, Qi WJ, et al. TGF- $\beta$ 1 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancers is Correlated with Prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(19):8143-8147. doi:10.7314/APJCP.2014.15.19.8143
189. Javle M, Li Y, Tan D, et al. Biomarkers of TGF- $\beta$  signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer. *PloS One*. 2014;9(1):e85942. doi:10.1371/journal.pone.0085942
190. Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing | Neuro-Oncology | Oxford Academic. Accessed December 27, 2022. <https://academic.oup.com/neuro-oncology/article/15/6/718/1071074>
191. Pérez-Martínez O, Vidal-García I, Montero-Martínez C, Provencio M, Ruano-Ravina A. Description and Survival of Stage I and II Lung Cancer Patients. *Arch Bronconeumol*. 2018;54(8):420-426. doi:10.1016/j.arbres.2018.02.007
192. Cancer of the Breast (Female) - Cancer Stat Facts. SEER. Accessed December 29, 2022. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>

193. Cancer of the Colon and Rectum - Cancer Stat Facts. SEER. Accessed December 29, 2022. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
194. LAS\_CIFRAS\_DEL\_CANCER\_EN\_ESPANA\_2022.pdf. Accessed October 26, 2022. [https://seom.org/images/LAS\\_CIFRAS\\_DEL\\_CANCER\\_EN\\_ESPANA\\_2022.pdf](https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf)
195. Martín-Sánchez JC, Clèries R, Lidón-Moyano C, González-de Paz L, Martínez-Sánchez JM. Diferencias entre hombres y mujeres en la tendencia temporal de la mortalidad por cáncer de pulmón en España (1980-2013). *Arch Bronconeumol*. 2016;52(6):316-320. doi:10.1016/j.arbres.2015.11.016
196. Visbal AL, Williams BA, Nichols FC, et al. Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *Ann Thorac Surg*. 2004;78(1):209-215; discussion 215. doi:10.1016/j.athoracsur.2003.11.021
197. Burris JL, Studts JL, DeRosa AP, Ostroff JS. Systematic Review of Tobacco Use After Lung or Head/Neck Cancer Diagnosis: Results and Recommendations for Future Research. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. 2015;24(10):1450-1461. doi:10.1158/1055-9965.EPI-15-0257
198. Brunelli A, Kim AW, Berger KI, Addrizzo-Harris DJ. Physiologic evaluation of the patient with lung cancer being considered for resectional surgery: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 Suppl):e166S-e190S. doi:10.1378/chest.12-2395
199. Solano-Reina S, De Granda-Orive JI, Jiménez-Ruiz CA. Abandono del tabaquismo: un componente esencial en el tratamiento del paciente con cáncer de pulmón. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(9):477. doi:10.1016/j.arbres.2011.05.005
200. 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(5):1305-1312. doi:10.1378/chest.129.5.1305
201. 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(2):380-386. doi:10.1183/09031936.00144208
202. Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT, et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *Eur Respir J*. 2009;34(1):17-41. doi:10.1183/09031936.00184308
203. Lawrence VA, Cornell JE, Smetana GW, American College of Physicians. Strategies to reduce postoperative pulmonary complications after noncardiothoracic surgery: systematic review for the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2006;144(8):596-608. doi:10.7326/0003-4819-144-8-200604180-00011

204. Lim JU, Yeo CD, Rhee CK, et al. Overall survival of driver mutation-negative non-small cell lung cancer patients with COPD under chemotherapy compared to non-COPD non-small cell lung cancer patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018;13:2139-2146. doi:10.2147/COPD.S167372
205. Varela-Simó G, Barberà-Mir JA, Cordovilla-Pérez R, Duque-Medina JL, López-Encuentra A, Puente-Maestu L. Normativa sobre valoración del riesgo quirúrgico en el carcinoma broncogénico. *Arch Bronconeumol*. 2005;41(12):686-697. doi:10.1016/S0300-2896(05)70724-9
206. Gómez Hernández MT, Valentín NN, Rodríguez Alvarado I, Fuentes Gago M, Varela Simó G, Jiménez López MF. Modificación del riesgo de mortalidad y morbilidad tras resección pulmonar en los últimos 20 años. *Arch Bronconeumol*. 2020;56(1):23-27. doi:10.1016/j.arbres.2019.04.010
207. Cancer of the Lung and Bronchus - Cancer Stat Facts. SEER. Accessed December 29, 2022. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
208. Saghir Z, Dirksen A, Ashraf H, et al. CT screening for lung cancer brings forward early disease. The randomised Danish Lung Cancer Screening Trial: status after five annual screening rounds with low-dose CT. *Thorax*. 2012;67(4):296-301. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200736
209. Sanchez-Salcedo P, Berto J, de-Torres JP, et al. Lung Cancer Screening: Fourteen Year Experience of the Pamplona Early Detection Program (P-IELCAP). *Arch Bronconeumol*. 2015;51(4):169-176. doi:10.1016/j.arbr.2015.02.015
210. Garrido P, Sánchez M, Belda Sanchis J, et al. Reflexiones sobre la implementación del cribado mediante tomografía computarizada de baja dosis en personas con riesgo elevado de padecer cáncer de pulmón en España. *Arch Bronconeumol*. 2017;53(10):568-573. doi:10.1016/j.arbres.2017.03.004
211. Wang Z, Li M, Teng F, Kong L, Yu J. Primary tumor location is an important predictor of survival in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Manag Res*. 2019;11:2269-2280. doi:10.2147/CMAR.S192828
212. Swinson DEB, Jones JL, Richardson D, Cox G, Edwards JG, O'Byrne KJ. Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung Cancer Amst Neth*. 2002;37(3):235-240. doi:10.1016/s0169-5002(02)00172-1
213. Wang J, Chen J, Chen X, Wang B, Li K, Bi J. Blood vessel invasion as a strong independent prognostic indicator in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2011;6(12):e28844. doi:10.1371/journal.pone.0028844
214. Xie HJ, Zhang X, Mo YX, Long H, Rong TH, Su XD. Tumor Volume Is Better Than Diameter for Predicting the Prognosis of Patients with Early-Stage Non-small Cell Lung Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2019;26(8):2401-2408. doi:10.1245/s10434-019-07412-w

215. Wang J, Wu N, Lv C, Yan S, Yang Y. Should patients with stage IB non-small cell lung cancer receive adjuvant chemotherapy? A comparison of survival between the 8th and 7th editions of the AJCC TNM staging system for stage IB patients. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2019;145(2):463-469. doi:10.1007/s00432-018-2801-7
216. Strauss GM, Herndon JE, Maddaus MA, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(31):5043-5051. doi:10.1200/JCO.2008.16.4855
217. Park HJ, Park HS, Cha YJ, et al. Efficacy of adjuvant chemotherapy for completely resected stage IB non-small cell lung cancer: a retrospective study. *J Thorac Dis*. 2018;10(4):2279-2287. doi:10.21037/jtd.2018.03.184
218. AstraZeneca. *A Phase III, Randomised, Controlled, Multi-Center, 3-Arm Study of Neoadjuvant Osimertinib as Monotherapy or in Combination With Chemotherapy Versus Standard of Care Chemotherapy Alone for the Treatment of Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Positive, Resectable Non-Small Cell Lung Cancer*. clinicaltrials.gov; 2022. Accessed December 28, 2022. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04351555>
219. Chen Z, Zhao N, Wang Q, et al. PD-L1 Protein Expression and Gene Amplification Correlate with the Clinicopathological Characteristics and Prognosis of Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2021;13:6365-6375. doi:10.2147/CMAR.S309946
220. Barlesi F, Greillier L, Monville F, et al. LBA53 Precision immuno-oncology for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts) treated with PD1/L1 immune checkpoint inhibitors (ICIs): A first analysis of the PIONeer study. *Ann Oncol*. 2020;31:S1183. doi:10.1016/j.annonc.2020.08.2286
221. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75(11):2139-2145. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0255
222. Ock CY, Keam B, Kim S, et al. Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016;22(9):2261-2270. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2834
223. Haque S, Morris JC. Transforming growth factor- $\beta$ : A therapeutic target for cancer. *Hum Vaccines Immunother*. 2017;13(8):1741-1750. doi:10.1080/21645515.2017.1327107
224. Huynh LK, Hipolito CJ, ten Dijke P. A Perspective on the Development of TGF- $\beta$  Inhibitors for Cancer Treatment. *Biomolecules*. 2019;9(11):743. doi:10.3390/biom9110743

225. Lou F, Huang J, Sima CS, Dycoco J, Rusch V, Bach PB. Patterns of recurrence and second primary lung cancer in early-stage lung cancer survivors followed with routine computed tomography surveillance. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145(1):75-81; discussion 81-82. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.09.030
226. Demicheli R, Fornili M, Ambrogi F, et al. Recurrence dynamics for non-small-cell lung cancer: effect of surgery on the development of metastases. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2012;7(4):723-730. doi:10.1097/JTO.0b013e31824a9022
227. Second Primary Lung Cancers: Smokers v. Nonsmokers after Resection of Stage I Lung Adenocarcinoma - PMC. Accessed January 1, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4410355/>
228. Voltolini L, Paladini P, Luzzi L, Ghiribelli C, Di Bisceglie M, Gotti G. Iterative surgical resections for local recurrent and second primary bronchogenic carcinoma. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2000;18(5):529-534. doi:10.1016/s1010-7940(00)00572-8
229. Hamaji M, Allen MS, Cassivi SD, et al. Surgical treatment of metachronous second primary lung cancer after complete resection of non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2013;145(3):683-690; discussion 690-691. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.12.051
230. Westeel V, Foucher P, Scherpereel A, et al. Chest CT scan plus x-ray versus chest x-ray for the follow-up of completely resected non-small-cell lung cancer (IFCT-0302): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(9):1180-1188. doi:10.1016/S1470-2045(22)00451-X
231. Bugge AS, Lund MB, Valberg M, Brustugun OT, Solberg S, Kongerud J. Cause-specific death after surgical resection for early-stage non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg.* 2018;53(1):221-227. doi:10.1093/ejcts/ezx274
232. Ayub A, Rehmani SS, Al-Ayoubi AM, Raad W, Flores RM, Bhora FY. Pulmonary Resection for Second Lung Cancer After Pneumonectomy: A Population-Based Study. *Ann Thorac Surg.* 2017;104(4):1131-1137. doi:10.1016/j.athoracsur.2017.04.043
233. Yang X, Zhan C, Li M, et al. Lobectomy Versus Sublobectomy in Metachronous Second Primary Lung Cancer: A Propensity Score Study. *Ann Thorac Surg.* 2018;106(3):880-887. doi:10.1016/j.athoracsur.2018.04.071
234. Taioli E, Lee DSD, Kaufman A, et al. Second Primary Lung Cancers Demonstrate Better Survival with Surgery than Radiation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2016;28(1):195-200. doi:10.1053/j.semtcvs.2016.02.010