

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA

DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA



TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICO EN ESTADIOS
INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULA NO PEQUEÑA
INTERVENIDOS: KI-67 Y PD-L1

Presentada por **Carlos Gálvez Muñoz** para optar al grado de Doctor por la
Universidad Miguel Hernández de Elche

Dirigida por:

Dr. F. Ignacio Aranda López

Dr. Javier Gallego Plazas

Alicante, 2017



D. JAVIER FERNANDEZ SÁNCHEZ, Director del Departamento de Medicina Clínica de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa como Tesis Doctoral del trabajo **“Análisis de factores pronóstico en estadios iniciales de cáncer de pulmón de célula no pequeña intervenidos: Ki-67 y PD-L1”** presentado por **D. Carlos Gálvez Muñoz** bajo la dirección del Dr. D. F. Ignacio Aranda López y del Dr. D. Javier Gallego Plazas.

Lo que firmo en San Juan de Alicante a 8 de Junio de 2017. .

Prof. J. Fernández

Director

Dpto. Medicina Clínica



DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante

Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450

c.electrónico: med.psiqui@umh.es



D. F. Ignacio Aranda López, Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario de Alicante, y D. Javier Gallego Plazas, Especialista en Oncología Médica del Hospital General Universitario de Elche, como Directores de la Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo **“Análisis de factores pronóstico en estadios iniciales de cáncer de pulmón de célula no pequeña intervenidos: Ki-67 y PD-L1”** realizado por **D. Carlos Gálvez Muñoz** ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección, y reúne, a nuestro juicio, todos los requisitos para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente para optar al Grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante a 08 de Junio de 2017.

Fdo. Dr. D. F. Ignacio Aranda López

Director Tesis Doctoral

Fdo. Dr. D. Javier Gallego Plazas

Director Tesis Doctoral

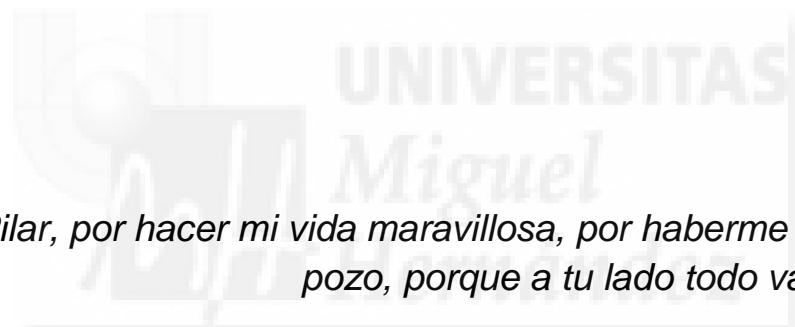


DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLINICA

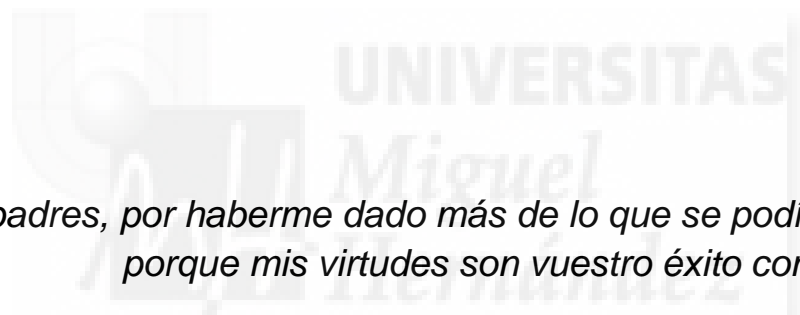
Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 San Juan de Alicante

Telf.: 96 5919449 – Fax: 96 5919450

c.electrónico: med.psiqui@umh.es



A Pilar, por hacer mi vida maravillosa, por haberme sacado del pozo, porque a tu lado todo vale la pena.



*A mis padres, por haberme dado más de lo que se podía siempre;
porque mis virtudes son vuestro éxito como padres.*

*A Elisa, por ser mi ejemplo, por darme siempre y no pedirme nunca,
por tu bondad sin límites.*

A Edgar, Adriana y Claudia.

A Nacho Aranda, por ser el promotor incansable que inició este proyecto de investigación y supo desviar el rumbo hacia nuevos horizontes.

A Javier Gallego, por tus brillantes consejos y por tu ayuda siempre rápida. Has aportado un carácter de enorme profesionalidad a este proyecto.

A José Manuel Rodríguez Paniagua, por haber sido mi “maestro”, no sólo en el Hospital sino también fuera de él; tu dedicación al paciente y tu disfrute de la vida son inigualables.

A Sergio y a Juanma, porque juntos “somos uno más”. Gracias por haberme enseñado casi todo, y porque por encima de todo, somos hermanos.

A Fran y a Julio, porque habéis sido los residentes que ojalá hubiera sabido ser. Espero con mi ejemplo haberos aportado algo en vuestro ya vasto conocimiento, y recordad que nunca es suficiente.

A Joaquín Roca, por haberme tratado como un hijo, y por ser el médico que ojalá algún día pueda llegar a ser.

A María Pérez, Eva Ortuño, porque con vosotras empezó todo, por ser las mejores instrumentistas que conozco, por hacerme mejor cirujano.

A María Galiana, José Navarro y María Jesús Rivera, porque en vuestras manos pondría mi vida, por haberme enseñado y dejado crecer, porque... ¡Oh boy!.

A Joan Gil y Tomeu Massuti por su disponibilidad con este trabajo y por sus enormes conocimientos.

A Fini, por tu trabajo inestimable y tu colaboración con una eterna sonrisa.

A Laura Paños, por ser mi familia en los mundos quirúrgicos, y por la alegría que me transmites esas tardes.

A Rosa Herrero, por ser mi “madre” hospitalaria, por cuidar de mi y por estar a mi lado contra viento y marea.

A Juana Rodríguez, mi otra “madre hospitalaria”, por haberme tratado con tanto cariño y haber hecho de tus dominios mi hogar.

A Marina De Irala, Marta Ortega, Patricia y Rosa Cabrera, porque operar a vuestro lado es un placer, porque juntos comenzamos aquel camino novedoso.

A Pilar Rubio y a Loli, porque sin vosotras las consultas no existirían, y por vuestra bondad y cariño.

A los miembros del Comité de Tumores Torácicos del H.General de Alicante, por enseñarme tanto y por vuestros esfuerzos por mejorar la calidad asistencial al paciente.

Al personal de la 5ªB y de Reanimación/UCIN del H.General de Alicante, por vuestra profesionalidad y colaboración con mis proyectos, y por hacer de ésta mi segunda casa.

A los “Alacantins”, porque hace muchos años cambiasteis mi vida, y porque con vosotros, la amistad se convierte en familia.

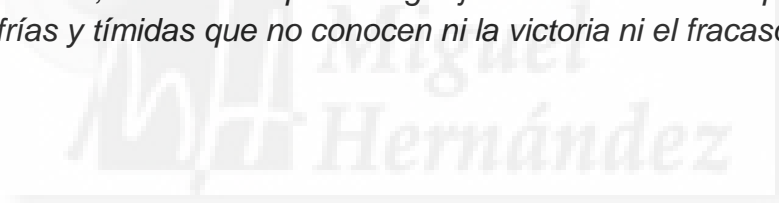
A los Doctores Alfonso Morcillo, Eugeni López, Teresa García, David Orts, Juan Arenas, Cristina Llorca, María Cleofe Fernández, José Luis Recuero, María José Martínez y Sergio Bolufer por amablemente formar parte del Tribunal de Evaluación de esta tesis doctoral.

A la Dirección del Hospital General Universitario de Alicante, por la confianza depositada en mi en momentos complicados.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía Torácica, Juan José Mafé, Benno Baschwitz, José Venegas y Jorge Cerezal.

A mis pacientes, porque vuestro cariño es mi motor, porque me enseñáis que siempre vale la pena, y porque este camino lo andamos juntos.

“No es el crítico quien cuenta; ni aquellos que señalan como el hombre fuerte se tambalea, o en qué ocasiones el autor de los hechos podría haberlo hecho mejor. El reconocimiento pertenece realmente al hombre que está en la arena, con el rostro desfigurado por el polvo, sudor y sangre; al que se esfuerza valientemente, yerra y da un traspié tras otro pues no hay esfuerzo sin error o fallo; a aquel que realmente se empeña en lograr su cometido; quien conoce grandes entusiasmos, grandes devociones; quien se consagra a una causa digna; quien en el mejor de los casos encuentra al final el triunfo inherente al logro grandioso; y que en el peor de los casos, si fracasa, al menos caerá con la frente bien alta, de manera que su lugar jamás estará entre aquellas almas frías y tímidas que no conocen ni la victoria ni el fracaso”



Man in the Arena. Theodore Roosevelt, 1910

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción	19
1.1. Cáncer de pulmón: Contextualización del problema	20
1.2. Definición y epidemiología del cáncer de pulmón	20
1.2.1. Definición	20
1.2.2. Epidemiología	21
1.2.2.1. Distribución por edad	26
1.2.2.2. Distribución por raza	26
1.2.2.3. Distribución geográfica	27
1.2.2.4. Distribución socioeconómica	27
1.2.2.5. Distribución por tipo histológico	27
1.3. Principales factores de riesgo de cáncer de pulmón	28
1.3.1. Tabaco	28
1.3.2. Humo de segunda mano	28
1.3.3. Contaminación ambiental	29
1.3.4. Radón	29
1.3.5. Asbesto	30
1.3.6. Patología pulmonar	30
1.3.7. Dieta	30
1.3.8. Factores genéticos	30
1.4. Clasificación histológica del cáncer de pulmón	31
1.5. Estadificación TNM del cáncer de pulmón	35
1.6. Tratamiento del cáncer de pulmón en estadio inicial	40
1.7. Factores pronósticos del cáncer de pulmón	41
1.7.1. Factores relacionados con el paciente	42
1.7.1.1. Estado general o performance status (PS)	42
1.7.1.2. Calidad de vida	43
1.7.1.3. Sexo	43
1.7.2. Factores relacionados con el tumor	43
1.7.2.1. Tipo histológico	43
1.7.2.2. Estadio TNM	44
1.7.2.3. Grado histológico	44
1.7.2.4. Marcadores serológicos	45
1.7.2.5. Marcadores moleculares	45
1.8. Índice de proliferación Ki-67	46

1.8.1. Evaluación de la expresión de Ki-67.....	47
1.8.2. Valor pronóstico de Ki-67 en cáncer de pulmón.....	47
1.8.3. Relación de Ki-67 con variables clínico-patológicas.....	49
1.9. Respuesta inmune antitumoral.....	50
1.10. Definición de PD-1 y PD-L1.....	56
1.10.1. Expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón.....	59
1.10.1.1. Evaluación de la expresión de PD-L1.....	59
1.10.1.2. Situación actual de la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón.....	64
1.10.1.3. Expresión de PD-L1 según subtipos histológicos.....	65
1.10.2. Relación de PD-L1 con variables clínico-patológicas en cáncer de pulmón.....	67
1.10.3. Relación de PD-L1 con mutaciones dirigidas por oncogenes.....	67
1.10.4. Relación de PD-L1 con la supervivencia en cáncer de pulmón.....	70
1.10.5. Relevancia terapéutica de la terapia anti PD-1 y anti PD-L1.....	73
1.10.6. PD-L1 como biomarcador de respuesta a terapias dirigidas.....	76
2. Justificación.....	79
3. Hipótesis.....	83
4. Objetivos.....	85
5. Metodología.....	87
5.1. Diseño de estudio.....	88
5.1.1. Tipo de estudio.....	88
5.1.2. Ámbito de estudio.....	88
5.1.3. Población de estudio.....	88
5.1.3.1. Criterios de inclusión.....	88
5.1.3.2. Criterios de exclusión.....	89
5.1.4. Fuentes de datos.....	90
5.1.5. Tamaño muestral y tipo de muestreo.....	91
5.2. Variables a estudio.....	91
5.2.1. Variables de identificación y clínicas.....	91
5.2.2. Variables morfológicas clásicas.....	93
5.2.3. Variables inmunohistoquímicas.....	95
5.2.4. Variables de resultado.....	96
5.3. Construcción de las matrices de tejido (TMA's).....	97
5.4. Técnicas inmunohistoquímicas.....	99
5.4.1. Aplicación de la IHQ.....	99

5.4.2. Valoración de las técnicas de IHQ	99
5.4.2.1. Valoración de marcadores de proliferación celular	100
5.4.2.2. Valoración de expresión de PD-L1	101
5.5. Análisis de datos	104
5.5.1. Estudio descriptivo	104
5.5.2. Estudio de asociación	105
5.5.3. Estudio de supervivencia	105
5.6. Medios y financiación	106
5.7. Aspectos éticos	106
6. Resultados	109
6.1. Descripción de la muestra	110
6.1.1. Variables clínico-patológicas	110
6.1.2. Variables inmunohistoquímicas	118
6.1.3. Variables de resultado	120
6.2. Relación con variables clínico-patológicas	124
6.2.1. Relación de Ki-67 con variables clínico-patológicas	124
6.2.2. Relación de PD-L1 con variables clínico-patológicas	126
6.3. Análisis de supervivencia	128
6.3.1. Análisis univariante de supervivencia	128
6.3.2. Análisis multivariante de supervivencia	146
7. Discusión	149
7.1. Discusión de la metodología	150
7.2. Discusión de los resultados	155
7.2.1. Respuesta al objetivo 1	158
7.2.2. Respuesta al objetivo 2	162
7.2.3. Respuesta al objetivo 3	166
7.2.4. Respuesta al objetivo 4	170
7.2.4.1.	170
7.2.4.2.	173
8. Conclusiones	179
9. Bibliografía	183
10. Abreviaturas	203
11. Anexos	207



1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER DE PULMÓN: CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA

El cáncer de pulmón es un problema epidémico a nivel mundial puesto que constituye el segundo tumor maligno no cutáneo más frecuente tanto en hombres como en mujeres (después del cáncer de próstata y de mama, respectivamente). Además es la primera causa de muerte por cáncer, suponiendo uno de cada cuatro fallecimientos por esta causa según datos de la Sociedad Americana de Cáncer de 2016 (1). A pesar de los importantes avances en su diagnóstico más precoz, en el conocimiento de su etiopatogenia así como en los tratamientos, la supervivencia sigue siendo baja en comparación con otras neoplasias malignas como el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, por lo que constituye un gran desafío para la comunidad científica en la era de la medicina de precisión y la innovación tecnológica. Es por ello esencial ahondar en el conocimiento de su etiopatogenia así como lograr una mejor caracterización de los tumores en términos no sólo de estadificación sino de comportamiento biológico para poder determinar así subgrupos en función de su pronóstico y desarrollar nuevas dianas terapéuticas para personalizar los tratamientos.

A lo largo de esta tesis doctoral nos referiremos exclusivamente al cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) para lo cual utilizaremos el término “cáncer de pulmón”, y nos centraremos en los estadios localizados sin afectación ganglionar.

1.2. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PULMÓN

1.2.1. Definición

El carcinoma pulmonar incluye todos los tumores epiteliales primitivos malignos excluyendo los tumores pleomórficos, los carcinomas sarcomatoides y los tumores de las glándulas bronquiales. Las células basales bronquiales indiferenciadas dan lugar por diferenciación a las células ciliadas, mucosas y neuroendocrinas, pudiendo ser cualquiera de estos tipos el origen de los tumores epiteliales malignos.

De entre ellos, el 80-85% corresponden al carcinoma de pulmón de célula no pequeña (CPCNP), excluyéndose por tanto el carcinoma de pulmón de célula pequeña (o “microcítico”) que pertenece al espectro de los tumores neuroendocrinos pulmonares. De aquí en adelante nos referiremos sólo al carcinoma de pulmón de célula no pequeña como “cáncer de pulmón”. Los principales subtipos de cáncer de pulmón son: adenocarcinoma, carcinoma escamoso (o “epidermoide”), carcinoma adenoescamoso y carcinoma indiferenciado de célula grande.

1.2.2. Epidemiología

A principios del siglo XX, el cáncer de pulmón era una rara enfermedad, pero debido a la influencia del tabaco en su génesis (es responsable de aproximadamente el 80% de los casos), a mitad del siglo se había convertido ya en una enfermedad epidémica. De acuerdo a los datos de GLOBOCAN (Proyecto de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, IARC) de 2012, si consideramos ambos sexos, el cáncer de pulmón es la neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial con 1.824.701 nuevos casos en 2012. El cáncer de pulmón tuvo una prevalencia a 5 años en 2012 de 1.893.098 casos (5.8%), siendo el tercero más prevalente en varones tras el cáncer de próstata y colorrectal (1.266.696 casos), y el sexto más prevalente en mujeres tras el cáncer de mama, colorrectal, cérvix, endometrio y tiroides (626.382 casos), debido principalmente a su baja supervivencia en comparación con las otras neoplasias más prevalentes(2).

En España, su prevalencia a 5 años en 2012 fue de 28.148 casos (4.8%), con 22.768 casos en varones (7%) y 5.380 casos en mujeres (2.1%), según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)(3).

Uno de los hechos de mayor relevancia es que actualmente constituye la segunda neoplasia maligna no cutánea más frecuente tras el cáncer de próstata y el de mama en hombres y en mujeres respectivamente, suponiendo el 13% de los nuevos diagnósticos de cáncer con un total de 1.824.701 nuevos casos en 2012 a nivel mundial (1.241.601 casos en hombres y 583.100 casos en mujeres)(Figura 1), según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)(2). La incidencia en los hombres ha continuado su descenso desde mediados de la década de 1980, pero esta reducción solo se inició en las mujeres a mediados de la década de 2000 en Estados Unidos según datos del Instituto Nacional del Cáncer (NIH), debido a

una más tardía incorporación al tabaquismo en mujeres con un pico en la incidencia en tabaquismo dos décadas posterior en ellas(4).

Figura 1. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en el Mundo en 2012 (ambos sexos). GLOBOCAN 2012(3).



En España su incidencia en 2012 fue de 26.715 nuevos casos (12.4%) siendo la tercera neoplasia maligna más frecuente, con 21.780 nuevos casos en hombres (16.9%; segundo más frecuente) y 4.935 nuevos casos en mujeres (5.7%; cuarto más frecuente), según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)(3). Su incidencia fue de 22.430 nuevos casos en hombres (Figura 2) y 5.917 en mujeres (Figura 3) en 2015 (28.347 totales, Figura 4). En España no se ha alcanzado todavía el pico de incidencia, con unas previsiones para el año 2035 de 40.831 nuevos casos, probablemente en relación a una incorporación más tardía de medidas sociales en la lucha contra el tabaquismo. Desde un punto de vista temporal, la incidencia del cáncer de pulmón en hombres alcanzó un máximo en el periodo 2001-2003 y actualmente está empezando a disminuir según datos de la Red Nacional de Estudio del Cáncer (REDECAN)(5). En las mujeres, por el contrario, la incidencia aumentó de forma importante desde una tasa de 7,0 por 100.000 en el periodo 1993-1997 a una tasa de 11,2 por 100.000 en el periodo 2003-2007. Por ello, aunque la incidencia continúa siendo mucho más elevada en hombres, la razón entre la incidencia de cáncer de pulmón en hombres y mujeres ha descendido. Si en el periodo 1993-1997 la

proporción de hombres que desarrollaron cáncer de pulmón fue 9,6 veces superior a la de las mujeres, en el periodo 2003-2007 esta razón era de 6,3.

Figura 2. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en 2015 (varones) según datos de REDECAN. (3)



REDECAN. Cancer Incidence in Spain 2015. Clin Transl Oncol. DOI 10.1007/s12094-016-1607-9

Figura 3. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en 2015 (mujeres) según datos de REDECAN. (3)



REDECAN. Cancer Incidence in Spain 2015. Clin Transl Oncol. DOI 10.1007/s12094-016-1607-9

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

Figura 4. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en 2015 (ambos sexos) según datos de REDECAN. (3)

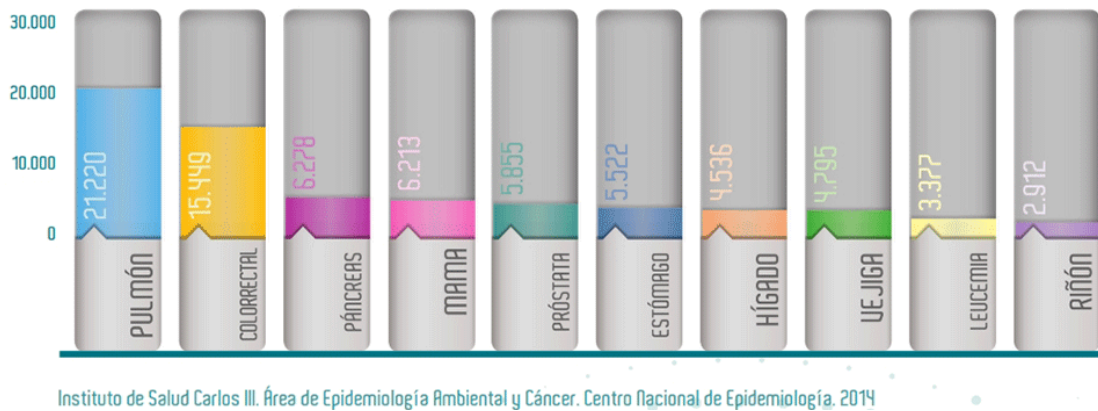


REDECAN. Cancer Incidence in Spain 2015. Clin Transl Oncol. DOI 10.1007/s12094-016-1607-9

En cuanto a la mortalidad, el cáncer de pulmón es el responsable del mayor número de muertes por cáncer (casi un 20% del total en 2012), con 1.589.925 muertes (1.098.702 muertes en hombres, 23.6%; 491.223 muertes en mujeres, 13.8%), sumando más muertes que la suma de las ocasionadas por el cáncer colorrectal, de mama y próstata juntos, según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)(6). Es la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda en mujeres por detrás del cáncer de mama (2). En Estados Unidos por ejemplo, se estima que en 2016 el 27% y el 26% de las muertes por cáncer en hombres y mujeres respectivamente fueron debidas al cáncer de pulmón (7). Debido a la alta letalidad y la escasa variabilidad de su supervivencia según áreas geográficas, los patrones de mortalidad se acercan mucho a su incidencia.

La mortalidad en España en 2012 fue de 21.118 muertes (20.6%), con 17.430 muertes en hombres (17.4%) y 3.688 muertes en mujeres (9.4%), según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)(3). Esta mortalidad estimada disminuyó muy levemente en hombres en 2014 con 17.173 muertes pero todavía siendo la primera causa de muerte por cáncer, y se incrementó en mujeres con 4.047 muertes siendo la tercera causa de muerte por cáncer dicho año (Figura 5).

Figura 5. Mortalidad Estimada por tipo de tumor en España para el año 2014 según datos del Instituto de Salud Carlos III. (3)



La supervivencia del cáncer de pulmón continúa siendo muy baja en cifras generales cuando la comparamos con otras neoplasias malignas como la mama o el cáncer colorrectal, con una supervivencia global a 5 años de tan sólo el 18% en Estados Unidos en un análisis de 2016, debido principalmente a que más de la mitad de los casos son diagnosticados en estadio avanzado donde la supervivencia global a 5 años es de tan sólo un 4%(7). Según datos de la Sociedad Americana del Cáncer de 2016, la supervivencia global a 5 años en los estadios iniciales no sobrepasa el 50% (IA 49%; IB 45%) siendo algo mayor en grandes series, con un descenso considerable hasta el 30% y 31% en el caso de los estadios IIA y IIB respectivamente, si bien en este análisis se incluyen los tumores con afectación ganglionar hiliar (1). En España, la supervivencia a 5 años ajustada por edad en el periodo de 2000-2004 fue del 10% en hombres y del 14.7% en mujeres (8).

Estos datos reflejan la enorme relevancia del cáncer de pulmón en la salud poblacional, siendo una de las neoplasias malignas más diagnosticada al año globalmente y en nuestro país, y presentando una supervivencia global a 5 años muy por debajo de la observada en otros tumores. A pesar de que en los últimos años se han tomado medidas en nuestro país encaminadas a disminuir la incidencia del tabaquismo en la población como principal factor de riesgo de esta neoplasia, y a pesar también del avance en los tratamientos quirúrgicos y oncológicos, es necesario un esfuerzo por profundizar en las bases etiopatogénicas de su desarrollo para así

identificar todos los posibles factores de riesgo y tener una percepción más real del comportamiento del tumor en cada paciente, y así poder establecer subgrupos de riesgo con diferente pronóstico que permitan desarrollar nuevos esquemas de tratamiento adaptados a los mismos.

1.2.2.1. Distribución por Edad

El cáncer de pulmón es una enfermedad de edades más avanzadas, con menos del 0.5% de las muertes en menores de 40 años. Desde el nacimiento hasta los 39 años de edad, la probabilidad de desarrollar un cáncer de pulmón es del 0.03%(9), mientras que por encima de los 70 años la probabilidad es del 6.4% para hombres y del 4.8% para mujeres(7). Existe un claro incremento de la tasa de cáncer de pulmón especialmente a partir de los 50 años.

1.2.2.2. Distribución por Raza

Existe una importante diferencia racial en la incidencia de cáncer de pulmón, siendo hasta un 47% superior en hombres afroamericanos respecto a hombres blancos americanos, con una mortalidad hasta un 42% superior en 1990 aunque esta diferencia se ha reducido hasta un 25% en 2008(4). Esta diferencia en la incidencia podría ser debida en parte a una mayor susceptibilidad a la carcinogénesis inducida por el tabaco, si bien también puede estar relacionada con el tipo de tabaco fumado, siendo el tabaco mentolado hasta tres veces más frecuente en afroamericanos que en blancos, y conllevando un mayor riesgo de carcinogénesis (9). Respecto a la supervivencia, se ha apreciado una menor supervivencia global a 5 años para todos los estadios de entre el 12% y el 15% en los afroamericanos respecto a sus homólogos blancos americanos, probablemente secundaria a un diagnóstico más tardío y un menor acceso a medicina basada en la evidencia en esta población(4).

Por otro lado se ha observado una mayor supervivencia en pacientes asiáticos respecto a la población blanca, y se relaciona principalmente con características tumorales diferenciales como por ejemplo una mayor prevalencia de mutaciones en EGFR (epidermic growth factor receptor) que permiten terapias con inhibidores de la tirosín-kinasa.(4)

1.2.2.3. Distribución geográfica

Existen diferencias en los patrones geográficos de incidencia de cáncer de pulmón, si bien pueden deberse a diferencias en la calidad de la valoración de las cifras(4). El cáncer de pulmón es más frecuente en países desarrollados (Europa, Norte América) que en países en desarrollo (África, América del Sur), y sigue el patrón del tabaquismo con una latencia de entre 20 y 40 años. Como la tendencia del hábito tabáquico está en constante cambio se prevé que la incidencia del cáncer de pulmón se modificará produciéndose un importante incremento en Japón y China, y un marcado descenso en Europa y Norte América (9).

1.2.2.4. Distribución socioeconómica

Existe evidencia de una asociación entre nivel socioeconómico bajo y cáncer de pulmón, relacionado con una mayor prevalencia de tabaquismo, una mayor exposición ocupacional y ambiental a carcinógenos y dietas menos favorables (9).

1.2.2.5. Distribución por tipo histológico

Hasta la década de los años 80 del pasado siglo, el carcinoma escamoso era el subtipo histológico más frecuente de cáncer de pulmón con una incidencia ajustada por edad de 13.4/100.000 personas para el escamoso frente a 10.5/100.000 personas para adenocarcinoma. Desde entonces se produjo una inversión en la tendencia, siendo actualmente el adenocarcinoma sin lugar a duda el subtipo histológico más frecuente. Se ha postulado si la mejoría en los métodos diagnósticos ha permitido detectar tumores más periféricos, o si las mejores técnicas de tinción de la mucina han incrementado la sensibilidad al adenocarcinoma, pero también se ha observado que los nuevos cigarrillos contienen mayor cantidad de nitrosaminas, las cuales se han asociado a adenocarcinoma en modelos animales y se inhalan hasta la vía aérea más periférica.

1.3. PRINCIPALES FACTORES DE RIESGO DEL CÁNCER DE PULMÓN

Los principales factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de pulmón son el tabaco, el humo de segunda mano, la contaminación ambiental, el radón, el asbesto y la patología pulmonar subyacente. De entre ellos, el tabaco destaca por encima de los demás, pudiendo atribuírsele el 80% de los casos, aunque entre un 10-25% de los cánceres de pulmón ocurren en no fumadores.

1.3.1. Tabaco

Es el principal factor de riesgo de cáncer de pulmón siendo responsable del 80% de los casos en hombres y del 50% de los casos en mujeres (10). Incrementa en 20 puntos el riesgo de desarrollarlo, y su incidencia sigue la curva del patrón de tabaquismo con un decalaje de 20 años (11). Su efecto es cuantitativo puesto que el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón se incrementa con la cantidad fumada al día, y la duración del hábito (12,13). El consumo de tabaco sigue en ascenso en países de ingresos bajos o intermedios, por lo que la incidencia de cáncer de pulmón en los mismos se espera que se incremente en las próximas décadas, especialmente en China. Por el contrario, en Europa Occidental se produjo un descenso del 26% en el consumo de tabaco entre 1990-2009 (14), si bien desde 2009 a 2012 apenas se produjeron cambios en la tasa de fumadores en Europa (de un 29% a un 28%). El cese del hábito tabáquico tiene efectos beneficiosos sobre el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón: un hombre fumador de toda la vida tiene un riesgo acumulado del 15.9% de morir de cáncer de pulmón a los 75 años de edad, pero si deja de fumar a los 60, 50, 40 y 30 años el riesgo desciende hasta un 9.9%, 6%, 3% y 1.7% respectivamente (15).

1.3.2. Humo de segunda mano

La exposición al humo de otros fumadores se asocia con un riesgo incrementado de cáncer de pulmón, por lo que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) definió en 1992 el humo de segunda mano como carcinógeno (16). Está compuesto por el humo que desprende el cigarrillo y el que exhalan los fumadores, siendo el primero el más carcinógeno y el mayoritario. El número de no

fumadores que fallecen al año por cáncer de pulmón es el mismo que los fallecidos por cáncer de ovario. Un estudio japonés de 1981 observó un riesgo relativo de 1.8 de desarrollar cáncer de pulmón en mujeres no fumadoras cuyos maridos fumaban, respecto a mujeres no fumadoras cuyos maridos no fumaban (17), con una relación dosis-respuesta. Se considera que un 25% de los cánceres de pulmón en no fumadores son debidos al humo de segunda mano. Entre los modos para evitar la exposición de los más desprotegidos (los niños) y los que han decidido no fumar, son fundamentales las medidas relativas a la legislación para evitar el tabaco en lugares públicos.

1.3.3. Contaminación ambiental

Muchos estudios epidemiológicos han mostrado la relación entre la exposición a la contaminación ambiental cada vez mayor del mundo civilizado y el cáncer de pulmón (18). En un estudio Europeo de 2013 se encontró una asociación estadísticamente significativa entre el cáncer de pulmón y el nivel ambiental de partículas de menos de 10 μm (HR 1.22; IC 1.03-1.45), y dichos niveles se relacionaban con el incremento del riesgo de desarrollar adenocarcinoma. Del mismo modo mostraba como el tráfico rodado también tenía influencia en el cáncer de pulmón de los habitantes (19). En el año 2013, la IARC clasificó la contaminación ambiental y las materias particuladas como carcinógenos de Grupo 1 dada la evidencia de que la exposición a las mismas se asocia con riesgo de cáncer.

1.3.4. Radón

La exposición al radón y su inhalación es responsable de aproximadamente un 9% de las muertes por cáncer de pulmón y de un 2% de todas las muertes por cáncer en Europa (20). El radón es un gas que deriva de la desintegración natural del uranio presente la corteza terrestre, y que si bien es ubicuo, en general la concentración en las casas es baja, pero en aquellas con malos sistemas de ventilación puede ser más elevada que los niveles aceptables (4 pCi/L), pudiendo depositarse en el epitelio bronquial sus partículas sólidas que emiten radiación a las células del mismo. Se identificó como factor de riesgo de cáncer de pulmón debido a las altas tasas en trabajadores de minas de uranio (21). Su relación con el desarrollo de cáncer de pulmón es lineal sin aparente concentración umbral. Se ha visto que la mayoría de muertes por radón se deben a concentraciones moderadas y no tanto a

concentraciones altas en un bajo porcentaje de hogares. Deben tomarse políticas y medidas para evitar la exposición ambiental en hogares al radón en las nuevas construcciones.

1.3.5. Asbesto

El asbesto es un grupo de fibras naturales de silicato de magnesio hidratado que se utilizan en la construcción y para aislamiento. La exposición al mismo tenía lugar principalmente hace décadas en trabajadores expuestos. Desde la década de los 50 del siglo XX se relacionó la exposición al asbesto con el cáncer de pulmón, aunque existe controversia sobre si es necesaria la presencia de asbestosis para poder atribuir este efecto al asbesto o no. Está demostrado además que presenta una sinergia potente con el tabaco en la génesis del cáncer de pulmón.

1.3.6. Patología pulmonar

Existe asociación entre determinadas enfermedades respiratorias y el cáncer de pulmón, principalmente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otros procesos que desembocan en fibrosis, como la fibrosis pulmonar idiopática, la asbestosis o la silicosis. La prevalencia de la EPOC en pacientes con cáncer de pulmón es de entre un 50-65% (22), claramente superior a la de la población general, y los individuos con fibrosis pulmonar difusa tienen entre 8 y 14 veces incrementado el riesgo de cáncer de pulmón (23)

1.3.7. Dieta

A diferencia de lo que ocurre con otras neoplasias malignas del tracto gastrointestinal, no existe evidencia clara sobre una posible asociación entre dieta y cáncer de pulmón. En un estudio prospectivo Europeo (24) que analizaba la relación de la dieta con la aparición de cáncer, se observó una relación inversa entre el consumo de fruta y el cáncer de pulmón, no observada por ejemplo en el consumo de verdura salvo en fumadores, observando también un descenso en el riesgo de carcinoma escamoso con el incremento en la ingesta diaria de frutas y vegetales.

1.3.8. Factores genéticos

En el cáncer de pulmón no se ha demostrado ninguna alteración genética concluyente que defina su aparición, a diferencia de otras neoplasias malignas, si bien

se ha visto un mayor riesgo de desarrollarlo en familiares de primer grado a raíz de un estudio de 1963. Un meta-análisis que incluía 28 estudios de casos-controles y 17 estudios de cohortes observacionales demostró un incremento del riesgo de cáncer de pulmón asociado con tener un familiar afecto (riesgo relativo 1,8, 95% CI 1,6-2,0), el cual era mayor en familiares con parientes diagnosticados de cáncer de pulmón a edades tempranas y con múltiples miembros de la familia afectados (25). En general se cree que la susceptibilidad genética viene definida por las vías de activación y detoxificación de los componentes carcinogénicos del tabaco. Existen determinados polimorfismos enzimáticos que han demostrado un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, que afectan a enzimas como el CYP1A1, CYP2D6 y GST entre otras (26,27).

1.4. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN

La clasificación del cáncer de pulmón de célula no pequeña basada en criterios histológicos sigue siendo la base para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento, y se emplea de forma generalizada en todo el mundo.

La primera clasificación publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO por sus siglas en inglés) en 1967, se basaba exclusivamente en métodos de tinción con hematoxilina/eosina (H/E) sobre muestras de piezas quirúrgicas. La clasificación vigente hasta el año 2015, fue la publicada por este mismo organismo en 2004, en la que se habían incorporado técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), mucina y factores genéticos, aunque se basaba también en piezas de resección. Durante la pasada década la histología se ha convertido en un factor determinante del tratamiento del CÁNCER DE PULMÓN. El diagnóstico patológico del cáncer de pulmón es ahora un proceso secuencial, que comienza con el diagnóstico morfológico, seguido por la IHQ cuando se precisa, y continuado por la caracterización molecular del tumor (28).

Pero hay que recordar que una mayoría de los casos de cáncer de pulmón son diagnosticados en estadio avanzado, por lo que habitualmente solo están disponibles grandes muestras tumorales (como las provenientes de resección quirúrgica) en una minoría de los casos. Por ello es esencial que en la medida de lo posible cualquier

procedimiento para la toma de muestra diagnóstica, trate de maximizar la cantidad de tejido conseguido.

La actual clasificación de “Tumores del Pulmón. Pleura, Timo y Corazón”, publicada en 2015 por la OMS(29), ha introducido cambios importantes, la mayoría de los cuales tienen su base en las sugerencias sobre clasificación del Adenocarcinoma que se hicieron en 2011 por la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), American Thoracic Society (ATS), y la European Respiratory Society (ERS)(Tabla 1).

Los principales cambios en esta edición de 2015 en comparación con la de 2004, son:

1. El uso de la IHQ a lo largo de toda la clasificación, no sólo para pequeñas biopsias o citologías, sino también para piezas de resección de adenocarcinomas sólidos, carcinomas escamosos no queratinizantes, carcinomas de célula grande, tumores neuroendocrinos y carcinomas sarcomatoides.
2. Mayor énfasis en los estudios genéticos, en particular en integrar test moleculares para ayudar a personalizar los tratamientos en pacientes con enfermedad avanzada distinguiendo entre los dos principales subgrupos de adenocarcinoma y carcinoma escamoso, dada la posibilidad de realizar en cada subgrupo análisis de mutaciones, reordenamientos y expresión de biomarcadores específicos con vistas a proporcionar un tratamiento u otro. En los adenocarcinomas o tumores con componente adenocarcinoma sospechado está indicado el estudio de mutaciones en el EGFR (epidermal growth factor receptor) y reordenamientos en ALK (anaplastic lymphoma kinase)(30).
3. Incluye una nueva clasificación para biopsias pequeñas y citologías (dado que 2/3 de los casos se diagnostican en estadio avanzado), como ya propuso la clasificación IASLC/ATS/ERS en 2011, con una aproximación diferente a la clasificación de piezas de resección. En ella se identifican tumores con patrón de adenocarcinoma o carcinoma escamoso claros, y en caso contrario se propone un panel básico de IHQ con marcadores de adenocarcinoma (TTF-1, Napsina-A), así como mucina, o de carcinoma escamoso (p40, p63, o citoqueratina 5/6), con el objetivo de evitar el término “carcinoma de célula no pequeña no especificable” (NSCC NOS), lo que se consigue hasta en el 90%

- de los casos.
4. Aproximación completamente diferente al adenocarcinoma de pulmón, como la planteada en 2011 por la IASLC/ATS/ERS con sus diferentes propuestas que se correlacionan con diferentes subgrupos pronósticos con correlaciones moleculares diferentes.
 5. Incluye la diseminación a través de espacios aéreos como otra vía de diseminación junto a la invasión vascular y de pleura visceral del adenocarcinoma(31).
 6. Restringe el diagnóstico de carcinoma de célula grande (CCG) sólo a tumores resecaados que carecen de cualquier diferenciación morfológica o IHQ clara, con reclasificación de los previos subtipos de CCG en diferentes categorías según corresponda, no pudiendo establecerse este diagnóstico en muestras de biopsia o citología.
 7. Reclasifica a los carcinomas de células escamosas en subtipo queratinizantes (algún grado de queratinización), no queratinizantes y basaloideos (más del 50% de componente basaloide), requiriendo los no queratinizantes pruebas IHQ de diferenciación escamosa (p40, p63, CK5-6).
 8. Agrupa los tumores neuroendocrinos en una única categoría.
 9. Añade el *carcinoma de proteína nuclear en testes* (NUT) a la categoría de *tumores no clasificados / otros*.
 10. Sustituye el término hemangioma esclerosante por el de neumocitoma esclerosante y lo mueve a la categoría adenoma.
 11. Cambia el término hamartoma por “hamartoma pulmonar”.
 12. Crea un grupo de tumores PEComatosos que incluye:
 - a. Linfangioleiomiomatosis (LAM)
 - b. PEComa benigno (con una variante tipo tumor células claras)
 - c. PEComa maligno
 13. Introduce la entidad sarcoma mixoide pulmonar.
 14. Añade las entidades carcinoma mioepitelial y mioepitelioma que pueden mostrar los reordenamientos del gen *EWSR1*.
 15. Reconoce la utilidad de las fusiones *WWTR1-CAMTA1* en el diagnóstico de los hemangioendoteliomas epitelioides.
 16. Añade la enfermedad de Erdheim-Chester a los tumores linfoproliferativos, y crea un nuevo grupo de *tumores de origen ectópico* para incluir tumores de

células germinales, timoma intrapulmonar, melanoma y meningioma.

Tabla 1. Clasificación de los tumores pulmonares de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015). (29)

Histologic Type and Subtypes	ICDO Code	Histologic Type and Subtypes	ICDO Code
Epithelial tumors		Papillomas	
Adenocarcinoma	8140/3	Squamous cell papilloma	8052/0
Lepidic adenocarcinoma*	8250/3 ⁴	Exophytic	8052/0
Acinar adenocarcinoma	8551/3 ⁴	Inverted	8053/0
Papillary adenocarcinoma	8260/3	Glandular papilloma	8260/0
Micropapillary adenocarcinoma*	8265/3	Mixed squamous and glandular papilloma	8560/0
Solid adenocarcinoma	8230/3	Adenomas	
Invasive mucinous adenocarcinoma*	8253/3 ⁴	Sclerosing pneumocytoma*	8832/0
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3 ⁴	Alveolar adenoma	8251/0
Colloid adenocarcinoma	8480/3	Papillary adenoma	8260/0
Fetal adenocarcinoma	8333/3	Mucinous cystadenoma	8470/0
Enteric adenocarcinoma*	8144/3	Mucous gland adenoma	8480/0
Minimally invasive adenocarcinoma*		Mesenchymal tumors	
Nonmucinous	8256/3 ⁴	Pulmonary hamartoma	8992/0 ⁴
Mucinous	8257/3 ⁴	Chondroma	9220/0
Preinvasive lesions		PEComatous tumors*	
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0 ⁴	Lymphangioliomyomatosis	9174/1
Adenocarcinoma in situ*		PEComa, benign*	8714/0
Nonmucinous	8250/2 ⁴	Clear cell tumor	8005/0
Mucinous	8253/2 ⁴	PEComa, malignant*	8714/3
Squamous cell carcinoma	8070/3	Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Keratinizing squamous cell carcinoma*	8071/3	Diffuse pulmonary lymphangiomatosis	
Nonkeratinizing squamous cell carcinoma*	8072/3	Inflammatory myofibroblastic tumor	8825/1
Basaloid squamous cell carcinoma*	8083/3	Epithelioid hemangioendothelioma	9133/3
Preinvasive lesion		Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2	Synovial sarcoma	9040/3
Neuroendocrine tumors		Pulmonary artery intimal sarcoma	9137/3
Small cell carcinoma	8041/3	Pulmonary myxoid sarcoma with <i>EWSR1-CREB1</i> translocation ⁴	8842/3 ⁴
Combined small cell carcinoma	8045/3	Myoepithelial tumors*	
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelioma	8982/0
Combined large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Myoepithelial carcinoma	8982/3
Carcinoid tumors		Lymphohistiocytic tumors	
Typical carcinoid tumor	8240/3	Extranodal marginal zone lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	9699/3
Atypical carcinoid tumor	8249/3	Diffuse large cell lymphoma	9680/3
Preinvasive lesion		Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	8040/0 ⁴	Intravascular large B cell lymphoma*	9712/3
Large cell carcinoma	8012/3	Pulmonary Langerhans cell histiocytosis	9751/1
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Erdheim-Chester disease	9750/1
Sarcomatoid carcinomas		Tumors of ectopic origin	
Pleomorphic carcinoma	8022/3	Germ cell tumors	
Spindle cell carcinoma	8032/3	Teratoma, mature	9080/0
Giant cell carcinoma	8031/3	Teratoma, immature	9080/1
Carcinosarcoma	8980/3	Intrapulmonary thymoma	8580/3
Pulmonary blastoma	8972/3	Melanoma	8270/3
Other and Unclassified carcinomas		Meningioma, NOS	9530/0
Lymphoepithelioma-like carcinoma	8082/3	Metastatic tumors	
NUT carcinoma*	8023/3 ⁴		
Salivary gland-type tumors			
Mucoepidermoid carcinoma	8430/3		
Adenoid cystic carcinoma	8200/3		
Epithelial-myoepithelial carcinoma	8562/3		
Pleomorphic adenoma	8940/0		

(Continued)

*The morphology codes are from the ICDO.² Behavior is coded /0 for benign tumors, /1 for unspecified, borderline or uncertain behavior, /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia, and /3 for malignant tumors.

⁴The classification is modified from the previous WHO classification³ taking into account changes in our understanding of these lesions.

¹This table is reproduced from the 2015 WHO Classification by Travis et al.¹

²These new codes were approved by the International Agency on Cancer Research/WHO Committee for ICDO.

³New terms changed or entities added since 2004 WHO Classification.³

LCNEC, large cell neuroendocrine carcinoma, WHO, World Health Organization; ICDO International Classification of Diseases for Oncology.

1.5. ESTADIFICACIÓN TNM DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón de célula no pequeña se estadifica en función de la extensión tumoral mediante el sistema TNM, que describe la progresión natural a nivel local o a distancia (via hematógena o linfática). Junto a la histología, constituye a día de hoy el principal factor pronóstico y determina el tratamiento de los pacientes.

Este sistema se basa en tres categorías o componentes, seguidos de sufijos alfanuméricos que cuantifican su afectación:

- El componente T: describe la extensión del tumor primario determinada por el tamaño, la localización, las estructuras afectas o los fenómenos derivados de la invasión tumoral primaria.
- El componente N: describe la afectación ganglionar que en condiciones normales tiene manera de forma centrípeta desde los ganglios intrapulmonares y los hiliares, a los mediastínicos ipsilaterales, y posteriormente a los mediastínicos contralaterales y supraclaviculares.
- El componente M: describe la extensión metastásica intratorácica y a distancia.

En la Tabla 2 se muestran con detalle las descripciones de las distintas posibilidades de los componentes TNM según la 7ª Edición (32), vigente durante la realización de este proyecto de investigación.

Junto con estos 3 principales componentes descriptores, existen otros descriptores opcionales relevantes por su trascendencia pronóstica (33):

- Localización anatómica (bronquio principal, lóbulos superiores, medios o inferiores)
- Grado histopatológico (G1 bien diferenciado, G2 moderadamente diferenciado, G3 pobremente diferenciado, G4 indiferenciado)
- Invasión linfática (L) (L0 invasión linfática ausente, L1 invasión linfática presente)
- Invasión venosa (V) (V0 invasión venosa ausente, V1 invasión venosa microscópica, V2 invasión venosa macroscópica)
- Invasión perineural (Pn) (Pn0 invasión perineural ausente, Pn1 invasión perineural presente)

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

- Tumor residual (R) (R0 tumor residual ausente, R1 tumor residual microscópico, R2 tumor residual macroscópico)

La estadificación TNM tiene validez en diferentes momentos del proceso de abordaje de un cáncer de pulmón:

- cTNM: es la estadificación clínica o pre-tratamiento, que ocurre previo a iniciar actuaciones terapéuticas basada en la exploración física y los estudios complementarios.
- ycTNM: en aquellos cánceres de pulmón que precisan de algún tipo de tratamiento de inducción, utilizamos esta nomenclatura para su posterior estadificación clínica tras el mismo.
- pTNM: es la estadificación patológica tras la cirugía y se denominaría ypTNM si el paciente recibió tratamiento de inducción previo a la misma
- rTNM: esta nomenclatura hace referencia a la estadificación de las recurrencias tras un periodo “libre de enfermedad”.
- aTNM: finalmente esta nomenclatura hace referencia a la estadificación en cadáveres, o sea, estudio post-mortem.

La clasificación TNM y por estadios actual es la 7ª Edición del año 2009 (32). Esta clasificación TNM es una iniciativa de la Asociación Internacional para el estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC), la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y el Comité Mixto Americano sobre Cáncer de Pulmón (AJCC), basada en el análisis de la base de datos de la IASLC, que incluye datos de 100.896 pacientes entre 1990-2000, basados en 46 bases de datos de 20 países en Asia, Australia, Norteamérica y Europa, de entre los cuales finalmente se analizaron 81.495 pacientes con cáncer de pulmón. Los principales cambios en esta 7ª edición respecto a la previa, se relacionan con:

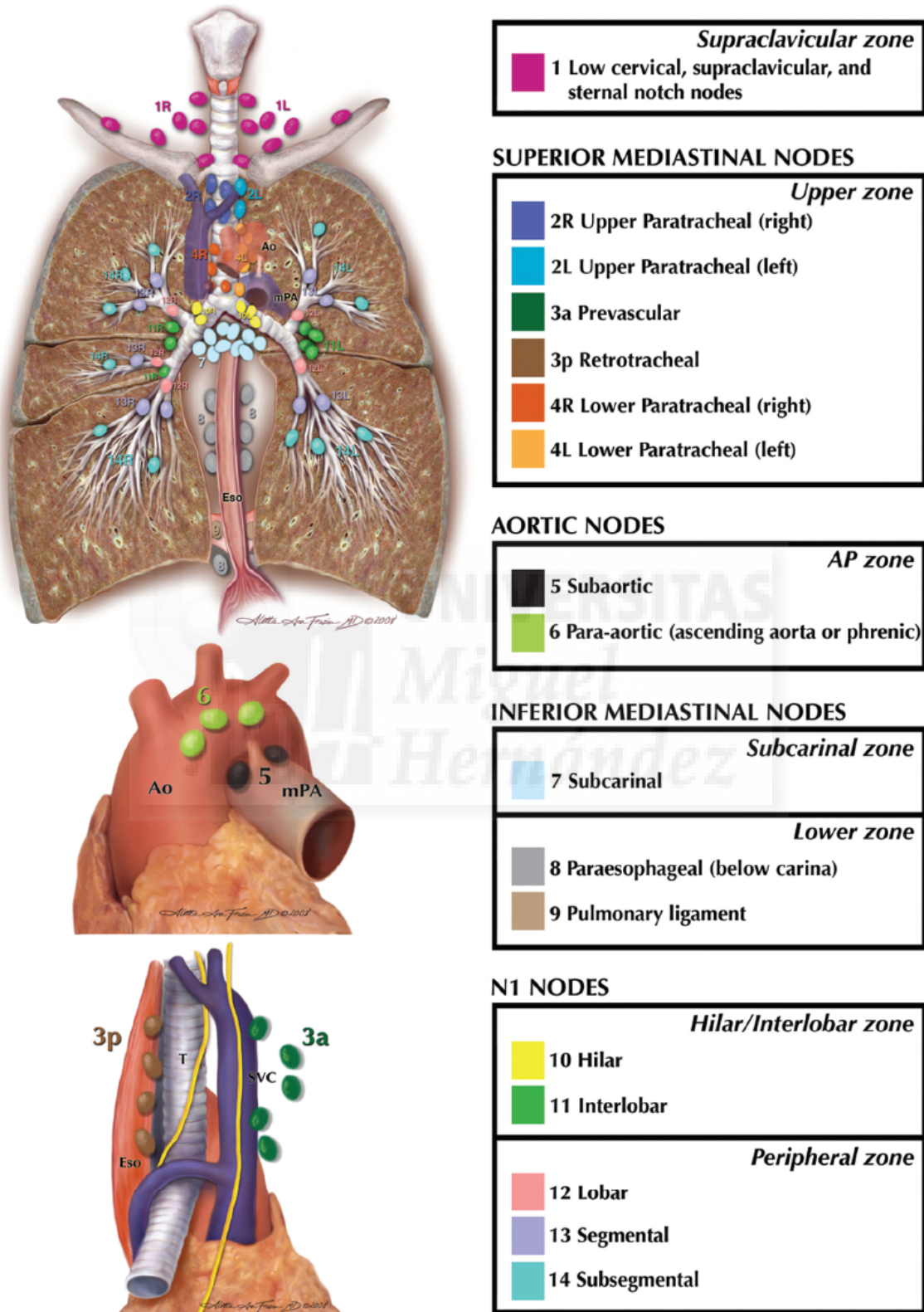
- Destacar el tamaño tumoral como factor pronóstico.
- El papel de los nódulos satélite en mismo lóbulo o en lóbulo ipsilateral distinto.
- Adaptar la clasificación de la diseminación pleural.
- Categorizar la enfermedad metastásica como intra o extratorácica.
- Nuevo mapa regional ganglionar (Figura 6).
- Papel de la invasión pleural visceral y su correcta definición.

Tabla 2. Descriptores T, N y M de la 7ª Edición de la Estadificación del cáncer de pulmón según la IASLC. (32)

T (Primary Tumor)	
TX	Primary tumor cannot be assessed, or tumor proven by the presence of malignant cells in sputum or bronchial washings but not visualized by imaging or bronchoscopy
T0	No evidence of primary tumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm in greatest dimension, surrounded by lung or visceral pleura, without bronchoscopic evidence of invasion more proximal than the lobar bronchus (i.e., not in the main bronchus) ^a
T1a	Tumor ≤ 2 cm in greatest dimension
T1b	Tumor > 2 cm but ≤ 3 cm in greatest dimension
T2	Tumor > 3 cm but ≤ 7 cm or tumor with any of the following features (T2 tumors with these features are classified T2a if ≤ 5 cm) Involves main bronchus, ≥ 2 cm distal to the carina Invades visceral pleura Associated with atelectasis or obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung
T2a	Tumor > 3 cm but ≤ 5 cm in greatest dimension
T2b	Tumor > 5 cm but ≤ 7 cm in greatest dimension
T3	Tumor > 7 cm or one that directly invades any of the following: chest wall (including superior sulcus tumors), diaphragm, phrenic nerve, mediastinal pleura, parietal pericardium; or tumor in the main bronchus < 2 cm distal to the carina ^a but without involvement of the carina; or associated atelectasis or obstructive pneumonitis of the entire lung or separate tumor nodule(s) in the same lobe
T4	Tumor of any size that invades any of the following: mediastinum, heart, great vessels, trachea, recurrent laryngeal nerve, esophagus, vertebral body, carina; separate tumor nodule(s) in a different ipsilateral lobe
N (Regional Lymph Nodes)	
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Metastasis in ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar lymph nodes and intrapulmonary nodes, including involvement by direct extension
N2	Metastasis in ipsilateral mediastinal and/or subcarinal lymph node(s)
N3	Metastasis in contralateral mediastinal, contralateral hilar, ipsilateral or contralateral scalene, or supraclavicular lymph node(s)
M (Distant Metastasis)	
MX	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis
M1a	Separate tumor nodule(s) in a contralateral lobe; tumor with pleural nodules or malignant pleural (or pericardial) effusion ^b
M1b	Distant metastasis

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

Figura 6. Nuevo mapa de la estadificación ganglionar según la 7ª Edición TNM del cáncer de pulmón de la IASLC (34).



ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

La clasificación TNM constituye un factor pronóstico en cáncer de pulmón, puesto que refleja características tumorales que identifican categorías de resultado en relación con la supervivencia, y es independiente del tratamiento. Las distintas categorías de los componentes T, N y M, se han ido agrupando en función de estadios tumorales (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IVa, IVb) que presentan pronóstico similar (Figura 7). A pesar de ello, la 7ª Edición del TNM en Cáncer de Pulmón proporciona tan sólo un valor del coeficiente de determinación <0.3 , por lo que la mayoría de la valoración pronóstica permanece desconocida (32).

Figura 7. Estadios del cáncer de pulmón según la 7ª Edición TNM de la IASLC (32).

Sixth Edition T/M Descriptor	Proposed T/M	N0	N1	N2	N3
T1 (≤ 2 cm)	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1 ($>2-3$ cm)	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 (≤ 5 cm)	T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2 ($>5-7$ cm)	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2 (>7 cm)	T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3 invasion		IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (same lobe nodules)		IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (extension)	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1 (ipsilateral lung)		IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
T4 (pleural effusion)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (contralateral lung)		IV	IV	IV	IV
M1 (distant)	M1b	IV	IV	IV	IV

Denominamos estadios localizados a aquellos en los que no existe afectación ganglionar mediastínica o superior, ni metástasis a distancia, por lo que tradicionalmente comprende los estadios I y II. Dentro de estos estadios, existe heterogeneidad puesto que algunos estadios incluyen tumores de mayor tamaño sin afectación ganglionar así como tumores de menor tamaño con afectación ganglionar N1.

Recientemente se han aprobado los cambios que definen la 8ª Edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón (35), pero dado que no se hallaban vigentes al inicio de este trabajo de investigación ni han sido considerados en la descripción de los casos aquí recogidos, no serán considerados en el mismo. Se espera que en sucesivas clasificaciones TNM del cáncer de pulmón se incluyan no sólo descriptores

anatómicos o morfológicos, sino también aspectos clínicos del paciente y aspectos moleculares del tumor para conseguir mejores estimaciones pronósticas y subclasificaciones predictivas que guíen la actitud terapéutica.

1.6. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN EN ESTADIO INICIAL

El tratamiento de los estadios localizados de cáncer de pulmón (estadios I y II) sin afectación ganglionar y sin contraindicación quirúrgica es la cirugía, siendo las resecciones lobares o superiores (bilobectomía, neumonectomía) la recomendación estándar salvo circunstancias puntuales. La resección pulmonar debe acompañarse de un muestreo o disección ganglionar hilio-mediastínica sistemática. El abordaje por videotoracoscopia o cirugía torácica videoasistida (VATS, video-assisted thoracic surgery) es el recomendado debido a sus beneficios en términos de curso perioperatorio y de eficacia oncológica (36).

Las resecciones anatómicas sublobares (segmentectomías anatómicas, resecciones sublobares) están indicadas en pacientes que no toleran funcionalmente una resección lobar superior, o en pacientes con adenocarcinoma <2 cm localizados en el tercio periférico del pulmón, que cumplan al menos uno de estos 3 criterios:

- Adenocarcinoma in situ (adenocarcinomas <2 cm de patrón de crecimiento lepidico, mucinoso, no mucinoso o mixto)
- $\geq 50\%$ de apariencia en vidrio deslustrado en TAC
- Tiempo de duplicación > 400 días

Dichas resecciones sublobares deben acompañarse también de muestreo o disección ganglionar hilio-mediastínica sistemática, y obtener márgenes ≥ 2 cm o superiores al diámetro tumoral mayor (37).

El tratamiento adyuvante con quimioterapia basada en platinos está indicado en estadios II, que incluye tumores con afectación ganglionar N1 y tumores de más de 5 centímetros. No está indicada en cambio en estadios IA y IB, salvo en el seno de ensayos clínicos o en casos de mal pronóstico (tumores de >4 cm, resecciones no

anatómicas, tumores pobremente diferenciados, invasión linfovascular, invasión pleura visceral, afectación ganglionar desconocida Nx)(38).

Aquellos pacientes en los que la cirugía no se puede llevar a cabo debido a criterios de inoperabilidad funcional, o por rechazo del paciente, se puede plantear como alternativa la radioterapia fraccionada con intención curativa.

1.7. FACTORES PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE PULMÓN

Los factores pronóstico son aquellos que influyen en la evolución de la enfermedad independientemente del tratamiento. A pesar de los importantes avances en el diagnóstico, la estadificación, la identificación de factores pronóstico y el tratamiento, la supervivencia global a 5 años del cáncer de pulmón tan sólo se ha incrementado muy levemente de un pobre 15.7% a un 17.4% en la última década (39).

En estadios iniciales en los que la cirugía es el tratamiento estándar, la supervivencia global a 5 años ronda el 60-80% en los estadios I, y tan sólo el 30-50% en los estadios II en grandes series (40). De hecho, en los estadios más tempranos (IA), la supervivencia global a 5 años es del 73% tras cirugía completa. Es más, hasta un 19% y un 30% de los estadios IA y IB tendrán recurrencia de la enfermedad a 5 años (41). Ello significa que a pesar de que la cirugía tiene intención curativa en dichos estadios, un porcentaje muy importante de los casos fallecen a 5 años tras resección completa. Estas cifras distan mucho de las obtenidas en otras neoplasias malignas, y resaltan la necesidad de profundizar en el conocimiento de los factores pronósticos del cáncer de pulmón, así como en factores predictores de respuesta a los tratamientos, para ser capaces de subclassificar mejor a los pacientes afectados y poder ofrecerles las mejores estrategias de tratamiento combinado en función del riesgo.

Junto con el estadio según la clasificación TNM, los principales factores pronósticos en cáncer de pulmón se agrupan en tres categorías:

1.7.1. Factores relacionados con el paciente

1.7.1.1. Estado General o Performance Status (PS)

Al igual que en otras muchas neoplasias malignas, la situación funcional global del paciente o performance status se ha correlacionado con el pronóstico y constituye un factor de decisión terapéutica (42). Existen varias escalas para valorar el estado general, pero las más usadas son la de Karnofsky y el ECOG.

La escala de Karnofsky mide la capacidad de los pacientes con cáncer de realizar actividades rutinarias, y tiene una puntuación que oscila entre 0 y 100, siendo 100 la puntuación más alta que corresponde a paciente “normal, sin quejas, sin indicios de enfermedad”. Ha demostrado ser un factor predictor independiente de mortalidad, y una puntuación por debajo de 50 indica una elevada mortalidad en los 6 meses siguientes (Tabla 2).

La escala ECOG (también llamada Escala de la OMS o Zubrod Score) es una forma de medir la calidad de vida de pacientes oncológicos, diseñada por el Eastern Cooperative Oncologic Group de Estados Unidos y validada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Su puntuación fluctúa entre 0 y 5, siendo 0 la máxima puntuación, que describe un paciente asintomático capaz de realizar el trabajo y las actividades de la vida diaria (Tabla 3).

Tabla 3. Principales escalas para la valoración del estado general del paciente oncológico (43).

ECOG	KARNOFSKY	DEFINICIÓN
0	100	Asintomático
1	80-90	Con síntomas. Ambulatorio
2	60-70	Con síntomas. En cama menos del 50% del día
3	40-50	Con síntomas. En cama más del 50% del día
4	20-30	Postrado en cama

* ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

1.7.1.2. Calidad de vida

En línea con el estado general del paciente, la calidad de vida determinada por la enfermedad ha mostrado en diversos estudios ser un factor pronóstico independiente de mortalidad. En un estudio publicado en 2011 que evaluaba la calidad de vida en todos los estadios del cáncer de pulmón utilizando el cuestionario de la European Organization for the Research and Treatment of Cancer Core Quality of Life Questionnaire (QLQ-C30), se concluyó que la calidad de vida y la función física predicen un aumento de la supervivencia (cada 10 puntos en el incremento de la función física evaluada, mejoró la supervivencia un 10%) (44).

1.7.1.3. Sexo

Existen numerosos estudios que correlacionan diferente pronóstico en el cáncer de pulmón en función del sexo, con una mayor supervivencia en mujeres (45).

1.7.2. Factores relacionados con el tumor

1.7.2.1. Tipo histológico

El subtipo histológico de cáncer de pulmón es un factor pronóstico independiente probado, si bien existe cierta controversia. Clásicamente se ha considerado que el pronóstico es mejor en pacientes con carcinoma escamoso que con adenocarcinoma (supervivencia global a 5 años del 65% frente al 55%) (46,47).

Desde la aprobación de la nueva clasificación del adenocarcinoma pulmonar en 2011 por la IASLC/ATS/ERS, numerosos estudios han demostrado la relevancia del tipo histológico en la determinación de subgrupos pronósticos independientemente del estadio TNM. Los adenocarcinomas lepidicos en estadio I suelen presentar un pronóstico excelente, y en los casos de recaída suelen hallarse en relación con un margen de resección próximo, componente micropapilar o invasión pleural o vascular presente. Los subtipos sólidos y micropapilar de adenocarcinoma han mostrado un peor pronóstico. Los micropapilares presentan una menor supervivencia global (48) y libre de enfermedad en resecciones limitadas. Los adenocarcinomas sólidos presentan una alta frecuencia de recurrencia múltiple temprana extratorácica con baja supervivencia posterior (49). Nuevos estudios apuntan a una mejor respuesta a la quimioterapia adyuvante de los subtipos sólido y micropapilar respecto al subtipo acinar o papilar.(50)

Entre los carcinomas escamosos, algunos estudios apuntan a un peor pronóstico en el carcinoma escamoso basaloide (51), aunque existe controversia al respecto. No existe por el momento una repercusión clínica en función de los subtipos histológicos de carcinoma escamoso (29).

1.7.2.2. Estadio TNM

Es el factor pronóstico probado más importante y mejor estudiado. Los estadios tumorales TNM se agrupan en función de su pronóstico, y cada revisión del estadiaje TNM remarca nuevos hallazgos en relación con la supervivencia y su asociación con los componentes de dicho sistema de estadificación. En relación con el componente T, el tamaño del tumor primario tiene mayor relevancia pronóstica cuanto más precoz es el estadio, condicionando diferencias significativas de supervivencia entre pacientes con tumores T1 y T2. En relación al componente N, además de la subclasificación numérica en función de mejor a peor pronóstico (N1-3), se ha observado una supervivencia similar en pacientes N1 multiestación que en pacientes N2 uniestación. La presencia de metástasis a distancia siempre se asocia a enfermedad incurable, con perspectivas de supervivencia corta. Sin embargo, algunas localizaciones metastásicas predicen un peor pronóstico, tales como las metástasis óseas o hepáticas. Las metástasis cerebrales son relativamente frecuentes, pero si la lesión es única, su control con radioterapia o cirugía puede suponer una supervivencia más prolongada.

1.7.2.3. Grado histológico

No existe un sistema de clasificación del grado histológico establecida para la mayoría de cánceres de pulmón, por lo que su relevancia pronóstica no puede sistematizarse. Existen subtipos cuya gradación histológica es inherente en su definición, como por ejemplo los tumores neuroendocrinos: carcinoides típicos de bajo grado, carcinoides atípicos de grado intermedio y carcinoma microcítico y neuroendocrino de célula grande de alto grado. Los carcinomas de célula grande y los carcinomas pleomórficos son siempre de alto grado.

En el caso de los adenocarcinomas, actualmente se acepta la clasificación según el patrón morfológico predominante en bajo grado (lepídicos), grado intermedio (acinares y papilares) y alto grado (micropapilares y sólidos)(52)(53), si bien en los de grado intermedio se considera que el grado nuclear y el recuento mitótico pueden

servir para diferenciar categorías pronósticas. En el caso de carcinoma escamoso existe muy poca evidencia científica al respecto, pero el diámetro nuclear parece ser un factor pronóstico independiente, aunque el grado nuclear también ha mostrado distinción pronóstica en muestras de aspirado(54).

1.7.2.4. Marcadores serológicos.

No existe ningún marcador serológico específico de cáncer de pulmón, no obstante los más estudiados son el CEA y el CYFRA 21-1. De ellos, el mejor estudiado es el antígeno carcinoembrionario (CEA), habiéndose encontrado relación entre valores elevados preoperatorios y recaída posterior de la enfermedad (55). Se considera que estos pacientes son buenos candidatos para tratamiento adyuvante, aunque a día de hoy no existe indicación clara al respecto en guías clínicas. El fragmento 19 de la citoqueratina (CYFRA 21-1) también es considerado un factor independiente de peor pronóstico (con valores superiores a 3,6 ng/ml) según varios estudios(56).

1.7.2.5. Marcadores moleculares.

Gracias al enorme avance en el estudio de las alteraciones genéticas relacionadas con el desarrollo del cáncer de pulmón, se ha conseguido avanzar en el análisis de algunos marcadores como factores pronóstico, capaces de predecir el comportamiento de la enfermedad. Su importancia radica en la posibilidad de establecer perfiles pronósticos para poder así clasificar en pacientes de bajo o alto riesgo y personalizar las estrategias terapéuticas (57).

De entre las mutaciones más estudiadas en cáncer de pulmón, cabe destacar:

- a) Las mutaciones del EGFR (epidermal growth factor receptor): El protooncogen C-erbB-1 codifica este receptor. Las mutaciones en dicho protooncogen pueden conllevar activación de EGFR, dando lugar al crecimiento tumoral descontrolado. Aunque existe alguna relación documentada entre sobreexpresión de EGFR y supervivencia acortada en el CPNCP estadio I, todavía no hay datos suficientes para considerarlo un marcador molecular con significación pronóstica.
- b) El protooncogen C-erbB-2 codifica una tirosín quinasa transmembrana (p185neu) que actúa como receptor de factor de crecimiento. Su

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

- sobreexpresión en adenocarcinomas se considera un factor pronóstico negativo independiente.
- c) K-ras (Kirsten rat sarcoma oncogen homolog): mediador de la señal del EGFR. En pacientes no tratados, la presencia de mutaciones en K-ras proporciona peor pronóstico.
 - d) La angiogénesis y la degradación de la membrana basal. Entre los métodos existentes para la evaluación de la angiogénesis se encuentra la identificación del número de microvasos por técnicas como el marcaje con anticuerpo monoclonal CD34. Los tumores más vascularizados tienen una importante disminución de supervivencia. Igualmente, aquellos que producen mayor cantidad de proteasas que degradan la matriz mucoproteica son más proclives a la invasión y metastatización (58).

1.8. ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN Ki-67

Ki-67 es una proteína nuclear de unión al DNA, también conocida como MKI67, que se cree se encuentra codificada por el gen MKI67 en el brazo largo del cromosoma 10 (10q25) y que se descubrió hace ya más de 30 años (59). Dicha proteína se asocia con la proliferación celular y se relaciona con la transcripción del RNA ribosomal, de modo que su inactivación conlleva la inhibición de la síntesis de RNA ribosomal. Es un marcador celular de proliferación que durante la interfase se detecta en el núcleo celular, pero durante las fases de la mitosis se halla principalmente en la superficie de los cromosomas, pudiendo ser detectada en todas las fases del ciclo (G1, S, G2, M) salvo habitualmente en las células quiescentes (G0). Sin embargo, pequeñas cantidades de Ki-67 pueden ser detectadas en células quiescentes (60). Ha sido empleada para diferenciar las células en crecimiento de las que no lo están, si bien su función exacta aún no está del todo clara.

Inicialmente fue definida por el anticuerpo monoclonal Ki-67, creado mediante la inmunización de ratones con núcleos de líneas celulares de Linfoma Hodgkin. Su nombre deriva de Kiel, la ciudad de origen, y el número del clon original (61).

Una alta tasa de proliferación celular se correlaciona con una mayor agresividad tumoral y con peor supervivencia. Ki-67 es un potente biomarcador con valor

pronóstico y/o predictivo en cáncer de mama (62), próstata (63), mieloma múltiple (64) y colorrectal (65). Según indicaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los tumores neuroendocrinos gastroentéricos y pancreáticos la tinción de Ki-67 está indicada de forma rutinaria (61).

1.8.1. Evaluación de la expresión de Ki-67

Existen diferentes técnicas para evaluar la expresión de la proteína Ki-67, si bien habitualmente se emplean técnicas de IHQ para su valoración mediante el uso de anticuerpos monoclonales (anti-Ki-67 mAb, anti MIB-1 mAb). Habitualmente se realiza la valoración en varios cores de la muestra tumoral, y después se extrae la media de las mediciones. No todos los estudios describen el número de células tumorales (CT's) de entre las que se realiza el recuento de células teñidas para Ki-67, con posibilidades que van desde las 100 CT's, 500-1000 CT's o 1000 CT's (61).

No existe un protocolo establecido sobre el modo de contar las células teñidas por dichos anticuerpos monoclonales, del mismo modo que no existe un punto de corte establecido para determinar qué se denomina resultado positivo. Se han utilizado numerosos puntos de corte, y entre ellos los más empleados son el 10%, 25% y 50% de las células, si bien la mayoría de estudios oscilan entre el 25-30% (66). En un meta-análisis de Wen y cols. de 2015 (67), se observó la misma correlación negativa en términos de supervivencia global utilizando los 3 puntos de corte referidos (10, 25, 50%). Como se ha mencionado previamente, algunos estudios han determinado el 25% y el 50% como puntos de corte para la determinación de resultados positivos en la expresión de Ki-67 en adenocarcinomas y carcinomas escamosos respectivamente (68), si bien no existe consenso al respecto.

1.8.2. Valor pronóstico de Ki-67 en cáncer de pulmón

Numerosos estudios han evaluado la asociación de Ki-67 como índice de proliferación celular y el pronóstico de los pacientes con CPCNP, si bien la mayoría de los estudios presentan un pequeño tamaño muestral, son heterogéneos en su diseño y con puntos de corte muy variables, lo que dificulta su comparación. Consecuentemente, los resultados alcanzados hasta la fecha han sido inconsistentes.

Un meta-análisis de Martin y cols. de 2004, que incluía 17 estudios, sugirió que la expresión de Ki-67 en el cáncer de pulmón se relacionaba con el pronóstico, de modo

que una elevada expresión de Ki-67 se correlacionaba con peor supervivencia global (HR 1.56, IC 95% 1.30-1.87)(69), no obstante, a día de hoy no es un biomarcador que se analice de forma rutinaria en cáncer de pulmón.

En el meta-análisis de Wen y cols. de 2015(67) que analizaba 32 estudios con 5600 pacientes, se observó asociación significativa entre expresión elevada de Ki-67 y sexo varón, fumador, subtipo no adenocarcinoma, componente T elevado (T2-4) y pobre/moderado grado de diferenciación. En dicho estudio, se observó correlación entre expresión alta de Ki-67 y supervivencia global (SG) (HR 1.59, IC 95% 1.35-1.88, $p < .001$) tanto en población asiática como en no asiática (HR 1.97, IC 95% 1.43-2.71, $p < .001$; y HR 1.37, IC 95% 1.15-1.64, $p = .013$). Se determinó que dicha asociación con la SG se observaba en todos aquellos estudios que incluían estadios iniciales, pero no en aquellos que analizaban estadios III-IV. Esta asociación era significativa en los subtipos adenocarcinoma pero no en los no adenocarcinoma, y de hecho en los adenocarcinoma era significativa sólo en pacientes asiáticos (vs. no asiáticos) y en estadios iniciales (vs. estadios avanzados). También se observó asociación entre la elevada expresión de Ki-67 y peor supervivencia libre de enfermedad (SLE) (HR 2.21, IC 95% 1.43-3.43, $p < .001$). Ki-67 demostró ser predictor de SG y SLE en los subtipos adenocarcinoma en población asiática y en estadios no avanzados, lo cual es concordante con el mayor estudio a gran escala realizado en 2014 por Warth y cols. y que incluía 1482 pacientes (68). En este estudio se observó que una mayor actividad proliferativa medida por Ki-67 se correlacionaba con peor SG y SLE en los adenocarcinomas, utilizando un punto de corte de Ki-67 del 25% (SLE 60.3 meses, SG 71.3 meses Ki-67 < 25%; vs. SLE 54.3 meses, SG 56.4 meses Ki-67 \geq 25%). En el análisis multivariante, un mayor índice de Ki-67 resultó predictor de una menor SG (HR 1.56; IC 1.15-2.12, $p = .004$) pero no de SLE (HR 1.11; IC No disponible, $p = .442$). En el caso de los carcinomas escamosos, se observó el efecto contrario: un mayor índice de proliferación según Ki-67 correlacionaba con una mayor SG y SLE (63.2 meses y 65.9 meses para Ki-67 < 50% vs. 73.7 meses y 74.4 meses para Ki-67 \geq 50%). Sería aconsejable poder delimitar al menos 2 puntos de corte de Ki-67 para cada subtipo histológico de modo que determinaran un área intermedia “gris” donde otros parámetros debieran ser tenidos en cuenta a la hora de calificar el pronóstico del paciente, dado que un único punto de corte tiene el problema ya conocido de que un valor inmediatamente por debajo y un valor inmediatamente por encima son considerados opuestos cuando probablemente su comportamiento sea

similar. También se observó en este interesante estudio que en los adenocarcinomas que recibían tratamiento adyuvante se perdía el efecto del Ki-67 sobre la supervivencia, indicando quizás que los adenocarcinomas muy proliferativos podrían beneficiarse más de tratamiento adyuvante.

Varios estudios más coinciden en esta relación proporcional inversa entre expresión alta de Ki-67 y supervivencia en subtipos adenocarcinoma (70–72), sugiriendo un probable papel como factor pronóstico en el cáncer de pulmón tipo adenocarcinoma, de modo a que mayor actividad proliferativa en los mismos, peor supervivencia.

En un estudio de 2014 de Ahn y cols. sobre 116 pacientes con cáncer de pulmón en estadios I-III intervenidos con intención curativa, se observó en el análisis univariante una correlación entre expresión alta de Ki-67 (>40%) y peor SG ($=.027$) y SLE ($=.005$), si bien en el análisis multivariante resultó factor predictor independiente tan sólo de SLE pero no de SG (66).

Las células proliferantes son más sensibles a los tratamientos antineoplásicos, ya que dichos agentes pueden afectar a la maquinaria celular durante la mitosis, por lo que Ki-67 podría predecir sensibilidad a algunos agentes quimioterápicos (73), si bien un meta-análisis de Jakobsen y cols. de 2013 no encontró correlación entre los niveles de Ki-67 y la respuesta a tratamiento adyuvante (61).

1.8.3. Relación de Ki-67 con variables clínicopatológicas

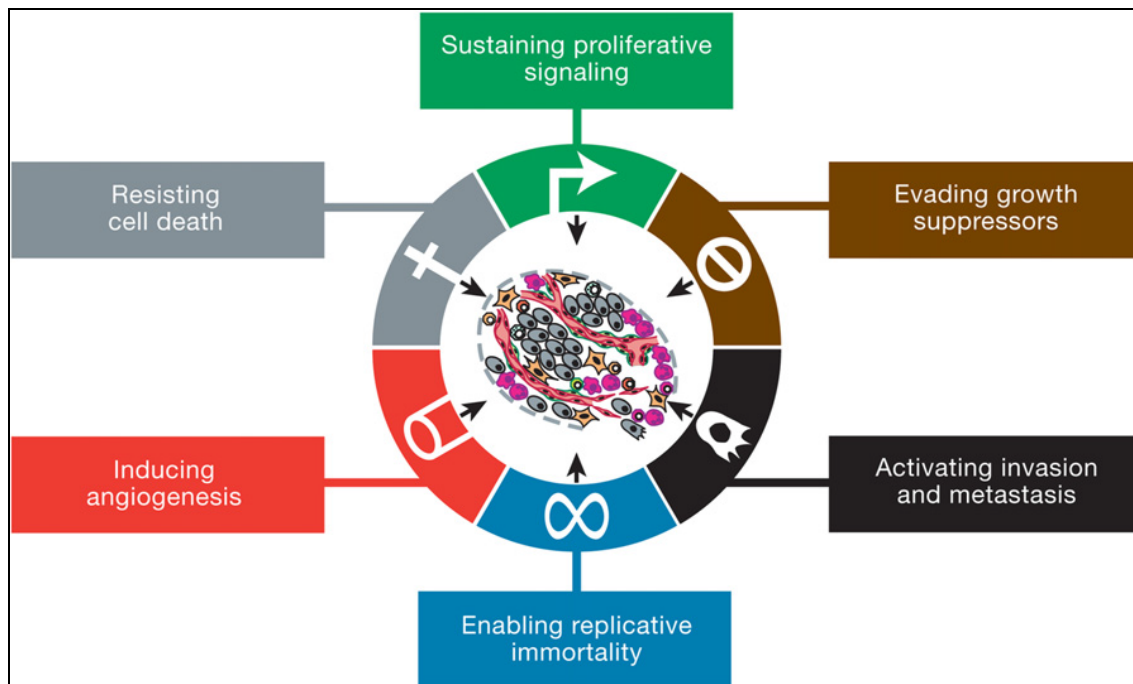
La expresión de Ki-67 presenta variabilidad en función de variables clínicas y patológicas. Algunos estudios apuntan a que determinados subtipos histológicos presentan un mayor índice proliferativo expresado según Ki-67. En el estudio de Warth y cols., se observó un mayor índice proliferativo Ki-67 en carcinoma escamoso respecto al adenocarcinoma (52.8% vs. 25.8%), así como una variabilidad en el mismo según los subtipos de adenocarcinoma, con el subtipo sólido como el más proliferativo (39.4%), siendo el lepidico el menos proliferativo (9.5%)(68). También observaron correlación del índice de proliferación evaluado mediante Ki-67 con el estadio TNM y el estatus T y N del mismo, tanto en la cohorte global de cáncer de pulmón como en la cohorte de adenocarcinomas, no encontrando dicha correlación en la cohorte de escamosos.

En el estudio de Ahn y cols., se observó correlación entre la elevada expresión de Ki-67 (>40%) y sexo varón (26% en hombres vs. 4% en mujeres, $p<.002$), tabaquismo (31% en fumadores vs. 10% en nunca fumadores, $p<.024$) e histología no adenocarcinoma (30% en no adenocarcinomas vs. 11% en adenocarcinomas, $p<.012$) (66). El estudio de Kim y cols. de 2015, encontró asociación entre una elevada expresión de Ki-67 y pobre diferenciación tumoral ($p=.008$), afectando negativamente a la supervivencia en estadios localmente avanzados (III)(74)

Aunque no existe clara concordancia y hacen falta mejores estudios para evaluar dichas asociaciones, parece que los tumores que presentan un elevado índice proliferativo asocian otras variables con valor pronóstico negativo.

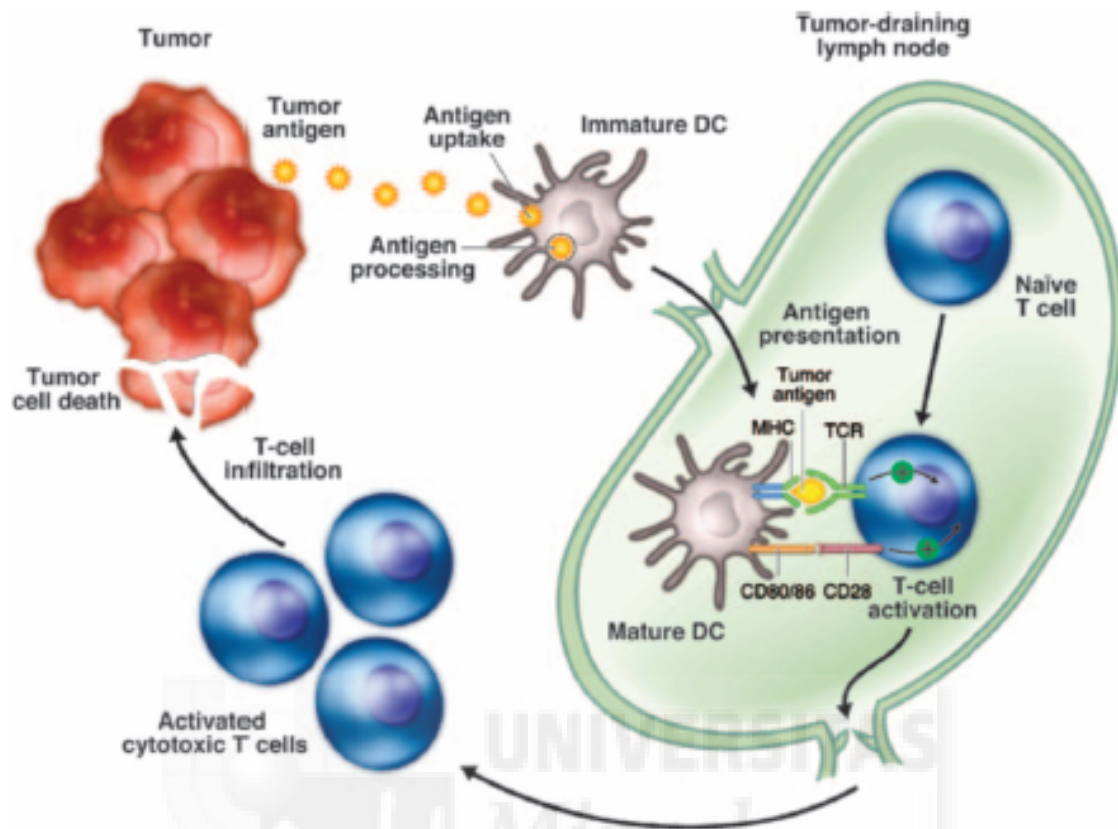
1.9. RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL

Tradicionalmente se considera que el proceso de génesis tumoral se asienta sobre 6 puntos clave: autosuficiencia en señales de crecimiento, resistencia a las señales inhibitorias de crecimiento, resistencia a la apoptosis, potencial de crecimiento ilimitado, angiogenesis mantenida y potencial de metastatización (Figura 8)(75).

Figura 8. Puntos clave en la génesis tumoral (75).


En los últimos años se considera que el séptimo punto clave sería la capacidad de escape de la vigilancia inmune antitumoral (76). El sistema inmune tiene la capacidad de destruir células tumorales (puesto que éstas deben aparecer como “no propias”) e inhibir el crecimiento tumoral mediante mecanismos mediados por su respuesta innata y adaptativa. La respuesta inmune innata no es antígeno-específica, se desarrolla rápido mediante múltiples células efectoras como las células natural-killers (NK), leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, y células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), que llevan a la liberación de interferón γ (IFN γ), perforina y otras citoquinas proinflamatorias que conducen a la apoptosis de células tumorales (77). Por otro lado, la respuesta adaptativa es antígeno-específica, se desarrolla más lentamente y con memoria inmune, y está mediada por la respuesta humoral y celular de células B y T (Figura 9). Es ésta respuesta adaptativa la que ofrece una defensa más robusta y duradera frente al desarrollo tumoral.

Figura 9. Respuesta inmune adaptativa (78).



* La respuesta inmune antitumoral adaptativa se inicia con las células dendríticas (DC's) inmaduras, que capturan y procesan los antígenos tumorales. Esas DC's posteriormente sufren maduración y migran a los ganglios linfáticos de drenaje del tumor, donde los presentan antígenos tumorales dentro de las moléculas MHC a las células T inmaduras, desencadenando una respuesta T protectora. La activación de las células T requiere interacción no sólo entre el complejo antígeno-MHC, sino también entre una serie de moléculas co-estimulantes incluido el CD80 / 86 en las DC's y el receptor CD28 en las células T. La respuesta inmune adaptativa culmina con la infiltración de células T citotóxicas activadas en el tumor, matando células tumorales. DC, célula dendrítica; MHC, complejo mayor de histocompatibilidad; TCR, receptor de células T.

La respuesta inmune adaptativa antitumoral se inicia con las células dendríticas inmaduras que capturan antígenos liberados por las células tumorales y, tras su maduración (activación), las presentan en los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC) tipo I a las células T en los ganglios linfáticos regionales de drenaje del tumor, produciéndose la respuesta protectora de las células T en forma de

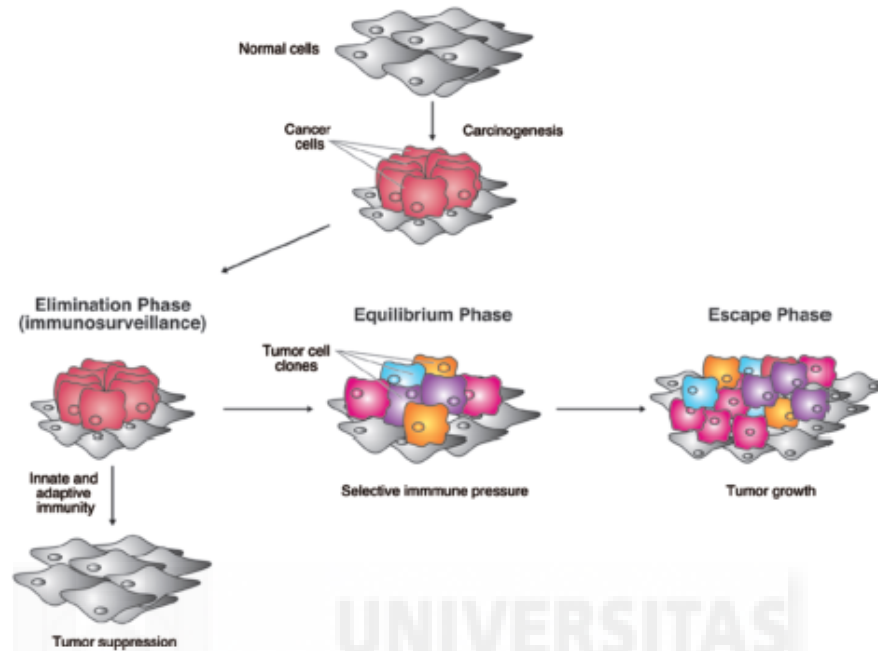
células T colaboradoras CD4+ (Células Th) y células T citotóxicas CD8+ (células Tc)(79). Para dicha activación de la respuesta mediada por células T, se requieren además moléculas co-estimuladoras. Una vez activadas, éstas células son capaces de infiltrar y destruir células tumorales. Las células Th también secretan citoquinas que atraen a otros tipos celulares inflamatorios, del mismo modo que las células dendríticas también activan una respuesta de células B mediada por anticuerpos y una respuesta de células NK.

El papel de la vigilancia inmune antitumoral en el desarrollo del cáncer sigue siendo objeto de estudio, si bien parece evidente que juega un rol importante ya que los pacientes con inmunodeficiencias presentan una mayor probabilidad de desarrollar algún tipo de neoplasia maligna. Las células tumorales tratan de escapar de dicha vigilancia mediante la inmunoselección (selección de variantes celulares tumorales no-inmunogénicas, también llamado inmuoedición) y la inmunosupresión (supresión activa de la respuesta inmune). El modo en el que las células tumorales tratan de evadir esa respuesta inmune se basa en la pérdida de expresión de antígenos en los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), la secreción de citoquinas inmunosupresoras, la inducción de células T reguladoras, y finalmente un fallo del sistema inmune derivado de la enfermedad en sí misma (80).

El mayor conocimiento de los procesos implicados ha permitido entender que el sistema inmune juega un papel dual en relación con el cáncer, dado que por un lado inhibe el crecimiento tumoral pero también puede promover el desarrollo tumoral mediante la selección de los tipos celulares que mejor sobreviven a un ambiente inmune competente (inmuoedición). El proceso de inmuoedición, se compone de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. (Figura 10). Inicialmente, se activa la respuesta inmune adaptativa que resulta en la eliminación de células tumorales en fases preclínicas(81). Los clones tumorales que sobreviven a este ataque inicial, permanece en fase latente o de equilibrio, sin apreciarse crecimiento tumoral, pero su inmunogenicidad permanece oculta debido a una presión inmune selectiva de la respuesta adaptativa (antígeno-específica). En un momento dado, cambios en esos clones tumorales secundarios a dicha presión inmune selectiva, o cambios en el sistema inmune secundarios a la inmunosupresión mantenida, producen un escape de dicha respuesta que se traduce en el crecimiento tumoral. Las células tumorales que entran en esa fase de escape son capaces de crear un estado de inmunosupresión en

el microambiente tumoral utilizando los mismos mecanismo de control de la respuesta inmune por la que se evita el daño a tejidos sanos (82).

Figura 10. Inmunoedición (78).



* El proceso de Inmunoedición consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, la respuesta inmune innata y adaptativa reconocen y destruyen células tumorales suprimiendo el desarrollo tumoral. Durante la fase de equilibrio, los clones tumorales que han superado la fase de eliminación permanecen quiescentes, sin que exista crecimiento tumoral pero la inmunogenicidad del tumoral permanece oculta debido a la presión inmune. Durante la fase de escape, clones celulares tumorales resistentes al sistema inmune proliferan descontroladamente.

Las células claves responsables de la inmunosupresión en el microambiente tumoral son las células T reguladoras (CD4+, CD25+, Fox3p factor transcripción+), las células supresoras derivadas mieloides (MDSC) y los macrófagos asociados al tumor (83). Las primeras inhiben la función y la proliferación de las células T CD4+ y CD8+ específicas de tumor, así como inhiben también a las células NK. Las MDSC inducen a las células T reguladoras, e inhiben la respuesta efectora de las células T mediante la

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

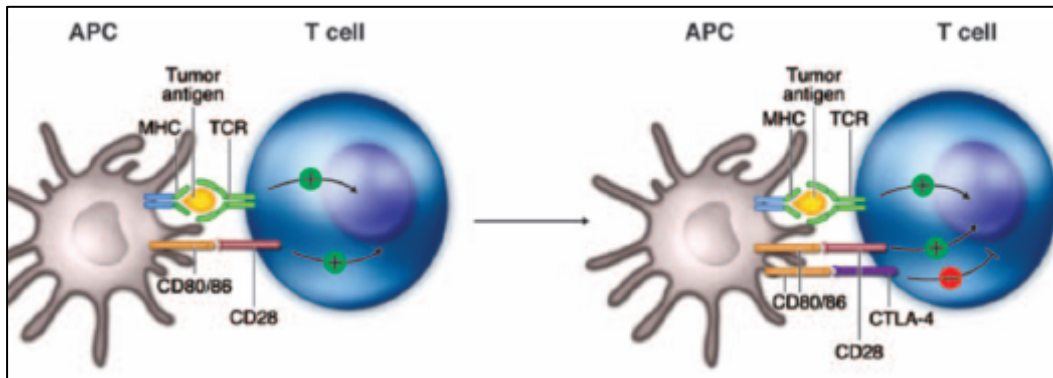
producción de diferentes moléculas. Los macrófagos asociados al tumor producen IL-10, TGF- β y otras moléculas que inhiben la respuesta inmune adaptativa.

Así mismo, las células tumorales y otras del microambiente tumoral, expresan la enzima inmunosupresora indolamina 2,3-dioxigenasa, que deplecciona los niveles de triptófano (esencial para el funcionamiento de las células T), incrementa las poblaciones de células T reguladoras y favorece la desactivación de células T específicas del tumor (84).

Incluso en el supuesto de que las células T fueran activadas nuevamente, los tumores pueden utilizar mecanismos regulatorios específicos o puntos de control (*immune checkpoints*) para favorecer la evasión del tumor a la respuesta inmunitaria. Se basan en puntos de coestimulación o inhibición consistentes en la unión de ligandos y receptores de multitud de células efectoras, de los que al menos se conocen 13 pares a día de hoy(80). Estos mecanismos permiten activar o inhibir la respuesta inmune, y son responsables del equilibrio que permite minimizar los daños colaterales a tejidos sanos derivados de la activación inmune. Así mismo, participan en los fenómenos de inmunotolerancia y evitan respuestas autoinmunes. Dos de los principales receptores de esos checkpoints son el CTLA-4 (cytotoxic T lymphocytes antigen-4) y el PD-1 (programme death-1 receptor) (85).

CTLA-4 se expresa en la superficie de las células T activadas, y comparte el mismo ligando (CD80/86 de las células presentadoras de antígenos) que el receptor co-estimulador CD28 de las células T, esencial para la activación de las mismas. Debido a su mayor afinidad por el ligando, compete con dicho receptor co-estimulador para producir una señal inhibitoria sobre la activación de células T (Figura 11). El cáncer de pulmón contiene gran cantidad de células T reguladoras que expresan constitutivamente CTLA-4 que inhiben directamente la proliferación de células T(86,87).

Figura 11. Vía del CTLA-4 (78).



* CTLA-4 se expresa en las células T tras su activación, y compete con el receptor coestimulador de las células T CD28 para la unión con CD80/86 expresado en las células presentadoras de antígenos, proporcionando una señal inhibitoria a la célula T.

1.10. DEFINICIÓN DE PD-1 Y PD-L1

PD-1 (programme-death 1) es una proteína de 288 aminoácidos miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas B7-CD28 (88), que se expresa en la superficie de células del sistema inmune, especialmente en células T activadas, aunque también en células T reguladoras, células B, células NK activadas, células dendríticas y monocitos activados (89). En el cáncer de pulmón se ha observado que las células T CD8+ infiltrantes de tumor expresan en mayor medida PD-1 (90). PD-1 actúa regulando negativamente la activación y proliferación de dichas células del sistema inmune, por lo tanto modulando negativamente la respuesta inmune excesiva o indeseada, especialmente en el contexto de una respuesta inflamatoria o autoinmunidad(91).

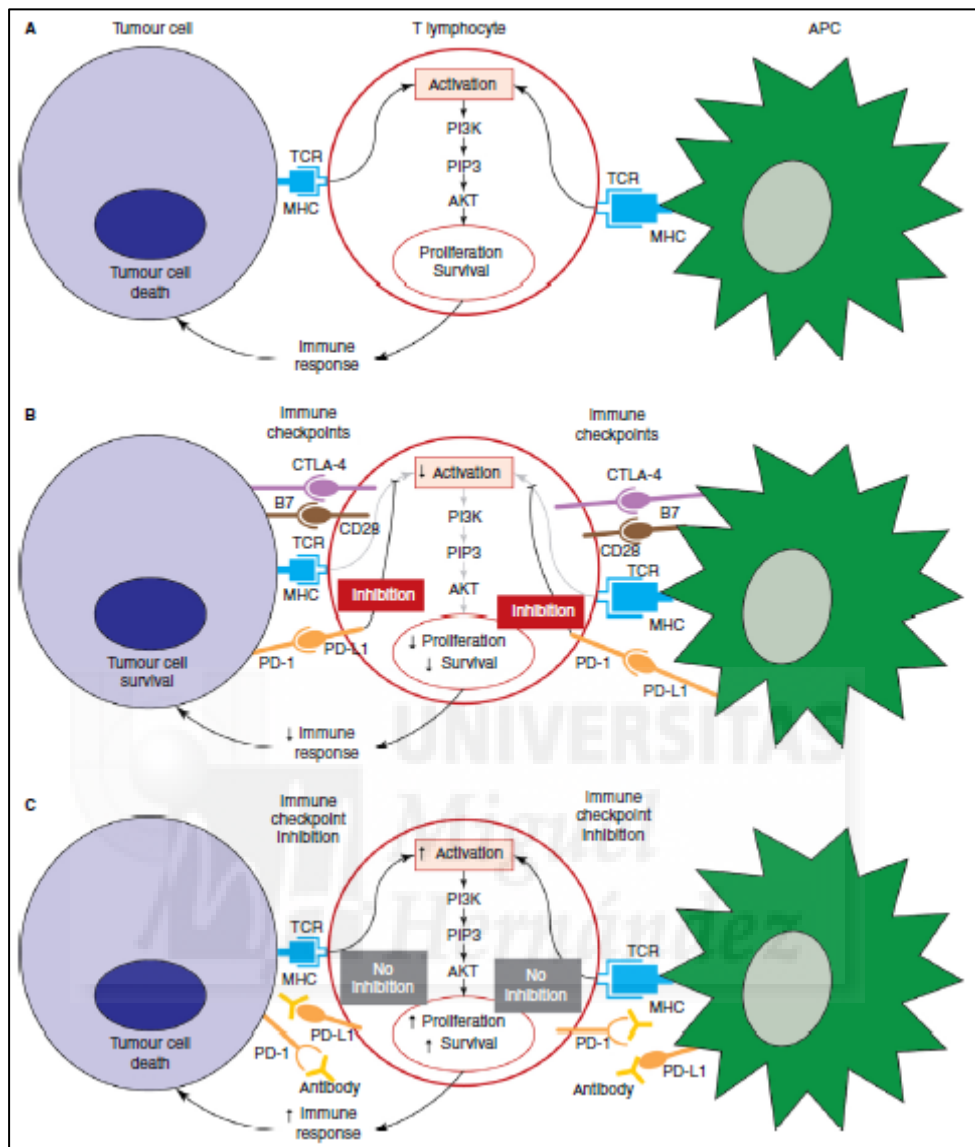
PD-1 presenta dos ligandos conocidos, denominados PD-L1 y PD-L2 (*programme-death ligand 1 y 2*), siendo PD-L1 su ligando principal y sobre el que existe más conocimiento. PD-L1 es una glicoproteína de superficie transmembrana de tipo I, constituida por 290 aminoácidos y que se halla codificada por el gen CD274 en el cromosoma 9 (también llamada B7-H1). Dicha proteína se expresa en bajos niveles en células del sistema inmune (células presentadoras de antígenos o CPA's, células B

y T activadas), así como en células endoteliales. Sin embargo se ha observado que se expresa en niveles altos en células tumorales de diversas localizaciones como el pulmón, páncreas, colon, estómago, mama, ovario, cérvix, melanoma y riñón, entre otras (92). La expresión de PD-L1 en células tumorales puede tener la finalidad de servir como estrategia de evasión inmune para el tumor (80), y está relacionada con expresión anormal de genes en las células tumorales, pero también puede estar inducida por el IFN- γ secretado por las células Th durante la respuesta inmune adaptativa.

La unión de PD-1 con su ligando PD-L1 tiene un efecto inhibitorio sobre la actividad antitumoral de las células T, produciendo inactivación (inhibe su actividad citolítica y la producción de citocinas) y apoptosis de las mismas, así como tolerancia de dichas células T al tumor. Por todo ello, se considera que la unión de PD-1 con PD-L1 en uno de los llamados puntos de control inmune (“immune checkpoints”) constituye un mecanismo de evasión del tumor a la actividad antitumoral del sistema inmune (Figura 12).



Figura 12. Papel de PD-1 en la inmunología del cáncer (92).



* Para la activación y transformación en células efectoras inmunes, las células T quiescentes requieren estimulación por las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las células presentadoras de antígeno (CPA's). Sin embargo, la estimulación descontrolada podría dar lugar a efectos adversos sobre las células huésped (por ejemplo manifestándose como reacciones de hipersensibilidad). Para controlar estos efectos, las células T se activan sólo en presencia de señalización adicional de interacciones 'co-estimuladoras', mientras que la activación es inhibida por interacciones 'coinhibitorias'. PD-1 es un ejemplo de un receptor co-inhibidor, que, cuando es activado por su ligando (PD-L1), bloquea la señalización intracelular a lo largo de la ruta fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) -Akt. Como resultado, se evita que la célula T prolifere o produzca citoquinas, con la consiguiente supresión de la respuesta inmune.

1.10.1. Expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón

La expresión de PD-L1 en el cáncer de pulmón ha sido analizada en numerosos estudios con la finalidad de establecer con qué frecuencia se expresa dicha proteína en las células tumorales, su relación con variables clínico-patológicas así como su valor pronóstico. Existe una gran variabilidad en los resultados sobre el porcentaje de células tumorales que expresan PD-L1, en gran parte debida a la heterogeneidad de las muestras y a la ausencia de un método estándar de evaluación de la expresión. Mientras algunos estudios hacen referencia al cáncer de pulmón sin diferenciación en subtipos (89,93–99), otros se centran en cohortes histológicas específicas de adenocarcinoma o carcinoma escamoso (100–106). Por otra parte, existen estudios que analizan la expresión de PD-L1 en determinados estadios tumorales (localizados, avanzados) mientras otros estudios incluyen todos los estadios, haciendo más difícil la comparación entre ellos. Algunos trabajos se centran en subtipos histológicos como el adenocarcinoma, que presentan mutaciones en oncogenes como EGFR, para tratar de relacionar la expresión de PD-L1 con dichas mutaciones conducidas por oncogenes (101–103,107,108).

Del mismo modo, se ha observado una variabilidad temporal en la expresión de PD-L1 en células tumorales, de tal forma que debido al efecto del tratamiento con quimioterapia, algunos agentes son capaces de reducir o incrementar su expresión (paclitaxel, etopósido), y además el efecto apoptótico sobre las células tumorales produce activación de la respuesta inflamatoria que puede inducir así mismo su expresión. Todo ello hace que un tumor inicialmente PD-L1 negativo, pueda ser positivo para la expresión del biomarcador después de la exposición a un determinado tratamiento antineoplásico (80).

Todo ello, unido al carácter relativamente reciente del descubrimiento de esta vía de evasión inmune tumoral, hace que las investigaciones sobre la expresión de PD-L1 en el cáncer de pulmón muestren aún hoy resultados muy variables.

1.10.1.1. Evaluación de la expresión de PD-L1

Existen diversos métodos para analizar la expresión de PD-L1 en células tumorales. El primero paso es el método de muestreo para obtener una muestra de tejido tumoral válida para el análisis. La expresión de PD-L1 se analiza en muestras

tumorales que pueden haber sido obtenidas mediante biopsias (fibrobroncoscopia, EBUS, PAAF o BAG guiada por TAC), como podría ser el caso de los cánceres de pulmón avanzados no quirúrgicos, o por cortes obtenidos de las piezas tumorales tras la cirugía. El origen de la muestra sobre la que se analiza la expresión de PD-L1 puede ser una fuente inicial de heterogeneidad. Como evidencia un trabajo de Ilie y cols. de 2016 (95), la expresión de PD-L1 en biopsias de 160 cánceres de pulmón intervenidos entre 2006 y 2015 era del 26%, mientras que el análisis de PD-L1 en las piezas quirúrgicas tras la cirugía era del 74%, con una tasa de discordancia en la expresión de PD-L1 en células tumorales de 19% (este estudio incluía el análisis de expresión de PD-L1 en células inmunes que era causa del 75% de la discordancia encontrada). En un estudio similar de Kitazono y cols. de 2015, se mostraba una tasa de concordancia entre biopsias y piezas quirúrgicas en una muestra de 79 casos de cáncer de pulmón del 92.4%, si bien emplearon otro anticuerpo (109). Aún no está consolidada la idoneidad de las muestras obtenidas por biopsia para el análisis de PD-L1.

En segundo lugar hay que recordar la heterogeneidad tumoral, puesto que una muestra obtenida por biopsia puede no ser representativa del tumor. Determinar el número de biopsias que serían necesarias para asumir la representatividad de las mismas es uno de los aspectos por aclarar. Por otro lado, es bien sabido la evolución tumoral durante el curso de la enfermedad y los tratamientos, por lo que es necesario clarificar así mismo si durante una progresión tumoral por ejemplo, la expresión de PD-L1 se mantiene o se ve alterada (92), y qué relación guarda su expresión en el tumor primario y en las metástasis. La duda surge sobre si el análisis de PD-L1 debe ser realizado durante el proceso diagnóstico inicial del tumor, o si bien debe realizarse una vez se plantea la necesidad de terapia con inhibidores de puntos de control inmunes (ICI's), e incluso si sería conveniente re-biopsiar en casos de progresión para tener mayor fiabilidad en el status de la expresión de PD-L1 en el momento de la decisión terapéutica, puesto que la expresión de PD-L1 se ve alterada por las terapias dirigidas y la quimioterapia. (80)

El procesamiento del tejido de las muestras obtenidas es relevante en su posterior análisis, dado que muestras almacenadas durante periodos prolongados pueden correr el riesgo de degradación y de no ser evaluables en términos de PD-L1 (exposición al ambiente, luz, temperatura, humedad). También se ha observado una

menor expresión en secciones congeladas obtenidas de cáncer renal en fresco (“frozen section”) comparado con muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina (37% vs. 24%), siendo este hecho probablemente secundario a la desnaturalización al fijar en formalina. (110)

El método más frecuentemente utilizado para el análisis de expresión de PD-L1 es la inmunohistoquímica (IHQ), mediante la utilización de anticuerpos monoclonales o policlonales de diversos orígenes (ratón, conejo) dirigidos contra PD-L1. PD-L1 tiene limitados los lugares de unión de anticuerpos para su detección, con tan sólo dos pequeñas regiones hidrofílicas(91). Existen diferentes kits comerciales, así como diferentes sistemas de análisis y plataformas de tinción automatizadas, por lo que es recomendable seguir las instrucciones del fabricante para su correcta utilización y evitar así falsos resultados. Al menos 5 clones de anticuerpos para la detección de PD-L1 se han usado en los principales trabajos: el clon E1L3N de Cell Signaling Technology, los clones 22C3 y 28-8 de Dako, y los clones SP142 y SP263 de Ventana, Roche. Los clones E1L3N y SP142 se unen al dominio citoplasmático de PD-L1, mientras 22C3, 28-8 y SP263 lo hacen al dominio extracelular(110), lo cual puede afectar a la sensibilidad de detección de PD-L1. En el año 2016 se puso en marcha el Proyecto Blueprint, aunando esfuerzos de la Asociación Americana de Investigación en Cáncer (AACR), la Asociación Internacional para el estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC), cuatro compañías farmacéuticas (Bristol-Myers Squibb, AstraZeneca, Genentech-Roche, Merck) y dos compañías diagnósticas (Dako y Ventana). El objetivo es evaluar sobre las mismas muestras de tejido tumoral, 4 diferentes anticuerpos y sus respectivas plataformas. Los resultados preliminares sobre 39 muestras demostraron una tinción similar para los clones 22C3, 28-8, SP263 (dominio extracelular) y menor para SP142 (dominio citoplasmático)(Tabla 4)(111).

Tabla 4. Principales anticuerpos para la detección de PD-L1 (92).

Kit de ensayo	Plataforma Automatizada	Inhibidor del checkpoint	Diana
Dako 22C3 pharmDx	Dako Autostainer Link 48	Pembrolizumab (MSD)	PD-1
Dako PD-L1 IHC 28-8 pharmDx	Dako Autostainer Link 48	Nivolumab (BMS)	PD-1
SP142: kit form TBC	Ventana TBC	Atezolizumab (Roche)	PD-L1
SP263: kit form TBC	Ventana plataformas Benchmark (GX, XT y Ultra)	Durvalumab (AstraZeneca/MedImmune)	PD-L1

* Kits y plataformas disponibles de PD-L1 para diferentes agentes anti PD-1 y anti PD-L1.

El hecho de requerir la adquisición del biomarcador junto con el kit y la plataforma automatizada de tinción, supone un encarecimiento del proceso para un laboratorio con medios propios, lo cual puede poner en riesgo su utilización y evitar su aplicación en un número importante de pacientes. (112). Para mantener el rigor científico, la aplicación de terapias anti PD-1 debe realizarse basándose en la metodología empleada en los ensayos que han servido de base para su indicación terapéutica. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de los test empleados en los principales trabajos, sería conveniente encontrar un método de estandarización de las diferentes metodologías para hacerlas comparables, lo cual requeriría de una estrecha colaboración entre la industria y los especialistas en anatomía patológica, así como estudios internacionales multicéntricos a día de hoy inexistentes.

Durante la interpretación de las muestras es esencial el entrenamiento con diferentes situaciones con la finalidad de ser capaz de reconocer resultados positivos y

negativos, recomendándose una concordancia interobservador de al menos el 95%. Se recomienda que la valoración de PD-L1 en muestras sea llevada a cabo por dos patólogos entrenados. Es importante incluir controles de resultados positivos y negativos en el estudio de los casos.

Uno de los factores más importantes en el análisis de la expresión de PD-L1 es establecer cómo se define un resultado positivo. Su definición debe tener en cuenta el porcentaje de células que tiñen para PD-L1, si se incluyen linfocitos infiltrantes de tumor (TIL's), y el grado de intensidad de la tinción. Si bien es necesario establecer puntos de corte para la determinación de resultados positivos, el punto de corte puede ser una de las fuentes de heterogeneidad en los resultados. Encontramos en la literatura diferentes puntos de corte en función del porcentaje de células tumorales que expresan PD-L1 (los más usados son el 1%, el 5% y el 50%), siendo el 5% el más empleado al considerar que por debajo de ese 5% se deja fuera el denominado "ruido" de la tinción PD-L1 de fondo. La utilización de puntos de corte bajos como 1% o 5% hace los resultados más inconsistentes por la dificultad de la evaluación, y además posibilita que pacientes con muy débil expresión de PD-L1 sean tratados con fármacos que pueden tener efectos deletéreos derivados de su efecto sobre la respuesta inmune y privar al paciente de otras terapias(110).

Otros muchos estudios construyen un sistema de puntuación (H-score), basado en la combinación del grado de intensidad de tinción (0 ninguna; 1 débil; 2 moderada; 3 fuerte) multiplicado por el porcentaje de células con expresión de PD-L1, obteniendo así escalas de puntuación diferentes, aunque la puntuación para considerar positivo un resultado varía en función del trabajo. En resumen, no existen estudios en los que los puntos de corte hayan sido validados para evaluar su reproducibilidad por parte de diferentes especialistas en anatomía patológica en diferentes laboratorios.

Teniendo en cuenta que la expresión de PD-L1 en células tumorales es una variable continua con valores en un rango desde 0, pasando por nivel bajo a nivel alto, al establecer puntos de corte para definir un resultado como positivo, creamos la falsa apariencia de ser una variable cualitativa. Ello se traduce en que un resultado inmediatamente por encima del punto de corte (resultado positivo) y uno inmediatamente por debajo (resultado negativo) se comportarán de modo similar (80).

La expresión de PD-L1 puede ser evaluada en células tumorales, en células inmunes o en ambas. El hecho de valorar sólo células tumorales resulta más recomendable dado que permite hacer aplicable su análisis a muestras de biopsias y de piezas quirúrgicas, mientras que la valoración de PD-L1 en células inmunes excluiría su utilidad en muestras de biopsias, muestras de ganglios linfáticos y muestras citológicas, no pudiendo determinar si las poblaciones linfoides visibles en la muestra son verdaderamente linfocitos infiltrantes del tumor o simplemente poblaciones linfoides presentes en el tejido en el momento del desarrollo tumoral(112). El valor de la expresión de PD-L1 en células inmunes como las células T CD8+ infiltrantes de tumor no es del todo conocido, pero parece que puede reflejar un microambiente tumoral favorable para la vía de PD-1/PD-L1.

Esta falta de estandarización respecto a la evaluación de la expresión del marcador destaca la necesidad de crear una metodología validada y generalizable que permita hacer comparables los resultados de los distintos estudios y así obtener conclusiones para su aplicación a la práctica clínica.

1.10.1.2. Situación actual de la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón

Existen 4 meta-análisis, todos ellos publicados en el año 2015, que tienen como objetivo analizar el valor pronóstico de PD-L1 en CPCNP y que nos informan sobre la frecuencia de expresión de PD-L1 en muestras tumorales.

En el meta-análisis de Zhou y cols. de 2015 (113), se analizan 5 publicaciones que incluyen 877 casos de todos los estadios tumorales con una expresión de PD-L1 entre el 24.8-57.5% de las muestras analizadas, mientras que en otro meta-análisis de Pan y cols. en 2015 (114), se analizaron 9 publicaciones con un total de 1550 casos en el que la expresión de PD-L1 se detectó en un 42.6% de las muestras, estando los trabajos del primer meta-análisis incluidos en el segundo. Entre los criterios de selección de los artículos incluidos en estos meta-análisis, se encuentran: análisis de la expresión de PD-L1 en células tumorales, análisis de supervivencia global (SG), pero algunos especificaban que el método de detección de PD-L1 debía ser la inmunohistoquímica (IHQ), otros que los artículos debían estar publicados en inglés, y alguno de ellos incluía sólo trabajos con al menos 100 pacientes.

Por otra parte dos meta-análisis de 2015 de Zhong (y cols.) y Wang (y cols.)(88,115) no muestran cifras globales de expresión de PD-L1 de sus estudios.

Existen otros trabajos que no han sido incluidos en los meta-análisis de 2015 que recogen datos sobre expresión de PD-L1 con resultados muy variables. Un trabajo de Cooper y cols. en 2015 (89) analiza 681 pacientes con cáncer de pulmón en estadio I-III, con expresión de PD-L1 en al menos 1% de las células tumorales en un 28.2%, cifra que desciende hasta 7.4% si consideramos positivos los casos con al menos un 50% de sus células tumorales expresando el biomarcador.

Un trabajo de Scheel y cols. en 2016 (99) encontró en 436 pacientes con cáncer de pulmón en estadios I-IV una expresión de PD-L1 en al menos 1% de las células tumorales de entre 34.4% y 33.9% (adenocarcinomas y carcinomas escamosos respectivamente).

Un trabajo de Mu y cols. en 2011 (97) sobre 109 casos de cáncer de pulmón en estadios I-III encontró una expresión del biomarcador de 53.2% (65.2% y 44.4% en adenocarcinomas y carcinomas escamosos respectivamente) utilizando como punto de corte la mediana de un score que tenía en cuenta la intensidad de tinción y el porcentaje de células que lo expresaban.

En otro trabajo de D'Incecco y cols. en 2015 sobre 124 pacientes con cáncer de pulmón en estadio avanzados (IV) (94), se describe expresión de PD-L1 moderada-fuerte en al menos el 5% de las células tumorales, en el 55.3% de las muestras.

El trabajo de Mao y cols. en 2015 (96) analizó 128 pacientes con cáncer de pulmón en estadios I-III, y utilizando como método de puntuación un score basado también en intensidad de tinción y porcentaje de células tumorales, demostraron una expresión del marcador en el 72.7% de las muestras.

Podemos observar la gran variabilidad de resultados, pero se puede inferir que incluso en los estudios con resultados más bajos, al menos entre 1 de cada 4 y 1 de cada 3 muestras de cáncer de pulmón presentan un resultado positivo para expresión de PD-L1, lo cual da idea de su frecuencia en este tipo de neoplasia.

1.10.1.3. Expresión de PD-L1 según subtipos histológicos

La mayoría de trabajos que analizan la expresión de PD-L1 en subtipos histológicos específicos de cáncer de pulmón se han centrado en el adenocarcinoma, por ser a día de hoy el subtipo más frecuente.

El trabajo de Zhang y cols. de 2014 (106), analizó la expresión de PD-L1 y PD-L2 en 143 adenocarcinomas en estadios I-III, encontrando una tasa de expresión del 49% cuando se toma como punto de corte la mediana de un score que contempla la intensidad de tinción e intervalos de porcentaje de células con expresión. Así mismo se observa que la expresión es más frecuente en adenocarcinomas no in situ, no mínimamente invasivo y en sólidos.

Por otro lado, otro trabajo de Yang y cols. en 2014 (104) encontró en 163 adenocarcinomas en estadio I una tasa de expresión de PD-L1 del 39.9%, cuando se consideraba como punto de corte el 5% de las células tumorales expresando la proteína.

Un trabajo de Ji y cols. de 2016 (102) analizó 100 adenocarcinomas en estadio I-III, obteniendo una tasa de expresión del 40% utilizando como punto de corte también el 5% de las células tumorales pero especificando un grado de intensidad moderado o fuerte (≥ 2).

Existen dos trabajos sobre adenocarcinomas en los que las tasas de expresión de PD-L1 son significativamente diferentes de las cifras arriba referidas: en un trabajo de Inamura y cols. en 2016(101) sobre 268 adenocarcinomas en estadio I-IV, utilizando también el 5% de células tumorales como punto de corte, se objetivó un 16% de expresión de PD-L1, mientras en otro del mismo año de Hung y cols. (100) se encontró una tasa del 88.4% de expresión de PD-L1 en 112 adenocarcinomas en estadio I-III, considerando resultado positivo cualquier tinción débil o fuerte sin tener en consideración el porcentaje de células tumorales con expresión del marcador. Este mismo estudio encuentra más frecuente la expresión en los subtipos acinares y menos en los papilares.

Respecto al carcinoma escamoso, destaca un estudio de Yang y cols. de 2016 (105), en el que se analizaron 105 casos en estadio I, con una tasa de expresión de PD-L1 del 56.2%.

El estudio de Scheel y cols. en 2016 (99) sobre 436 pacientes con cáncer de pulmón, usando como punto de corte para resultado positivo el 1% de las células tumorales, observó que el 34.4% de los adenocarcinomas y el 33.9% de los carcinomas escamosos expresaban PD-L1, sin apenas diferencias entre ellos. Por otro lado, un estudio de Mu y cols. de 2011 (97), encontró una tasa de expresión del 65.2%

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

en adenocarcinomas frente a un 44.4% en carcinomas escamosos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.032$).

Un resultado similar se observó en el trabajo de D'Incecco de 2015 (94), en el que el estado de PD-L1 se asoció significativamente con la histología adenocarcinoma ($p=0.005$).

Sin embargo otro estudio de Velcheti y cols. en 2014 (98) sobre 544 casos de cáncer de pulmón en dos cohortes en Estados Unidos y Grecia, observó en la cohorte americana una mayor expresión de PD-L1 en carcinomas escamosos que adenocarcinomas (56.7% vs. 27.5%), siendo esta diferencia estadísticamente relevante ($p=0.009$).

1.10.2. Relación de PD-L1 con variables clínico-patológicas en el cáncer de pulmón

Se han estudiado múltiples variables clínico-patológicas para ver si existe relación entre las mismas y la expresión de PD-L1, observando en los dos principales metaanálisis de Pan (y cols.) y Wang (y cols.) en 2015 (114,115) que tan sólo existe una mayor expresión de PD-L1 en los tumores pobremente diferenciados, siendo esta asociación estadísticamente significativa. A pesar de haberse encontrado asociaciones aisladas con variables como el menor tamaño, la edad, el sexo, el tabaquismo, el estadio TNM, la invasión vascular e incluso el Ki-67, los resultados son contradictorios y no concluyentes, por lo que requieren un análisis más profundo.

1.10.3. Relación de PD-L1 con mutaciones dirigidas por oncogenes en el cáncer de pulmón

Son numerosos los estudios que han tratado de buscar una relación entre la alteración de la vía inmune de PD-L1 y las mutaciones dirigidas por oncogenes como EGFR, KRAS, ALK como las más frecuentes de entre otras.

La relación entre la expresión de PD-L1 y la existencia de mutaciones en EGFR ha sido ampliamente estudiada. La mayor parte de los estudios apuntan a una asociación entre expresión de PD-L1 y mutaciones en EGFR.

Un trabajo de Azuma y cols. en 2014 encontró una relación significativa en el estudio de 164 pacientes con cáncer de pulmón entre una mayor expresión de PD-L1

y mutaciones en EGFR ($p < 0.001$). Este estudio encontró mayor expresión de PD-L1 en mujeres, en no fumadores y en subtipo adenocarcinoma, quienes a su vez constituyen la cohorte de pacientes que más frecuentemente presentan mutaciones en EGFR, si bien el efecto de las mutaciones en EGFR se asociaba significativamente con la expresión de PD-L1 en el análisis multivariante de manera independiente de otros factores (116).

Resultados superponibles encontró el trabajo de D'Incecco de 2015 sobre 125 pacientes con cáncer de pulmón en estadio IV, con una mayor expresión de PD-L1 en mujeres, nunca o exfumadoras, subtipo adenocarcinoma y también en tumores con EGFR mutado, existiendo asociación independiente entre expresión de PD-L1 y mutaciones en EGFR en el análisis multivariante ($=.002$). Así mismo demostraron que los casos con EGFR mutado y expresión de PD-L1 eran más sensibles al tratamiento con inhibidores de la tirosín kinasa (TKI's), por la regulación negativa inducida por ese grupo de fármacos sobre la vía de la expresión del PD-L1, presentando mayor supervivencia global y libre de enfermedad. Por ello se apunta en las conclusiones de este trabajo que el tratamiento combinado con TKI's y agentes anti-PD-L1 podría constituir una importante herramienta terapéutica en estos casos (94).

Akbay y cols. en 2013 ya habían demostrado en un estudio experimental, que la activación de la vía de EGFR incrementa la expresión de PD-L1, probablemente con la finalidad de evadir la respuesta inmune antitumoral; del mismo modo el bloqueo con agentes anti-EGFR como los TKI's produce una regulación negativa de la expresión de PD-L1, con una disminución del tamaño tumoral y un incremento en la supervivencia (107).

Un estudio de Tang y cols. en 2015 sobre 170 paciente con cáncer de pulmón en estadio avanzado con EGFR mutado y que habían recibido en algún momento tratamiento con TKI's, observó una asociación en los adenocarcinomas entre la expresión de PD-L1 y el estatus mutacional de EGFR ($=.067$). Así mismo, en los casos con EGFR mutado, la positividad de PD-L1 se asocia a una mayor supervivencia global y libre de enfermedad, mientras que en los casos de EGFR salvaje, la negatividad de PD-L1 se asocia a una mayor supervivencia global. Se apunta nuevamente a la combinación terapéutica de anti-EGFR (TKI's) con anti PD-L1 (108).

Un trabajo de Lin y cols. en 2015 estudió 56 casos de adenocarcinoma avanzado con EGFR mutado y que habían recibido terapia con TKI's. Encontró una mayor tasa de control de la enfermedad ($p=0.004$), mayor tasa de respuesta global ($p=0.073$), y una mayor supervivencia global en aquellos casos con positividad para expresión de PD-L1 ($p=.004$), siendo PD-L1 factor pronóstico de supervivencia global (HR 0.26; IC 0.11-0.62, $p=.002$) y libre de enfermedad (HR 0.46; IC 0.25-0.86, $p=.014$) en análisis multivariante (103).

Contrariamente a los estudios referidos, el estudio de Inamura y cols. de 2016 observó entre 268 adenocarcinomas, una mayor positividad de PD-L1 en los casos con EGFR tipo nativo, así como en los casos de fumadores y varones, variables que se han relacionado a su vez con el tipo nativo del EGFR (101). Existen otros estudios en los que no se ha encontrado asociación entre PD-L1 y mutaciones como en el trabajo de Zhang y cols. en 2014 sobre 143 adenocarcinomas en estadios I-III (106).

Los resultados en relación a otras mutaciones en oncogenes estudiadas, albergan resultados variados. En relación con KRAS, en el trabajo de Scheel y cols. en 2016 sobre 436 pacientes con cáncer de pulmón en todos los estadios, se observó una mayor frecuencia de resultados PD-L1 positivos en los adenocarcinomas con KRAS mutado (OR 2.5; IC 1.2-5.36, $p=.018$), así como en casos con TP53 mutado (OR 2.4; IC 1.1-5.2, $p=.029$), dos mutaciones frecuentes en adenocarcinomas y que se relacionan con carcinomas inducidos por el tabaco. Hipotetizan que quizás eso los hace más inmunogénicos y por ello se induce la activación de la vía de expresión del PD-L1 (99).

Por el contrario, en el trabajo de Ji y cols. de 2016 sobre 100 adenocarcinomas en estadio I-III, la mediana de expresión de PD-L1 era mayor en los casos con KRAS tipo nativo (102).

Otras mutaciones han sido analizadas de modo más puntual sin resultados concluyentes en la actualidad, y otros trabajos publicados no han encontrado asociación de la expresión del biomarcador PD-L1 con mutaciones en oncogenes.

1.10.4. *Relación de PD-L1 con la supervivencia en el cáncer de pulmón*

Una vez conocida la función de PD-1 y PD-L1 y el mecanismo a través del cual el cáncer de pulmón utiliza esta vía para evadir la respuesta inmune, es preciso preguntarse si existe correlación entre la expresión de PD-L1 y la supervivencia en estos tumores.

Los principales meta-análisis publicados que analizan la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón, la mayoría estudios de 2015, coinciden en correlacionar dicha expresión con peor pronóstico. El trabajo de Zhou y cols. de 2015 (113), que incluía 5 estudios con un total de 877 pacientes en todos los estadios, encontró una expresión de entre el 24.8 y 57.5% de PD-L1, y una correlación de ésta con peor pronóstico (HR 1.43, IC95% 1.24-1.63), tanto en la población asiática (HR 1.51) como en la no asiática (HR 1.35).

Un meta-análisis de Wang y cols. de 2015 (115), con 1157 pacientes en todos los estadios, observó también una correlación inversa entre la expresión de PD-L1 y la supervivencia global, con un HR de 1.75 (IC95% 1.4-2.2, $p < 0.001$), con mayores tasas de mortalidad en los pacientes con elevada expresión de PD-L1. El análisis de subgrupos entre población europea y asiática evidenció peor pronóstico en ambos (HR 1.54, IC95% 0.99-2.39, $p = 0.057$ en europeos; HR 1.83, IC95% 1.41-2.38, $p < 0.001$).

Uno de los meta-análisis de 2015, de Pan y cols. (114), con 1550 pacientes, observó una expresión de PD-L1 del 42.6%, así como una correlación entre la expresión de PD-L1 y peor pronóstico en términos de SG (HR 1.47, IC95% 1.19-1.83, $p = 0.0004$).

La mayor revisión sistemática de 2015, con 1653 pacientes de 12 estudios, llevada a cabo por Zhong y cols. (88), no encontró relación significativa entre la expresión de PD-L1 y la supervivencia global (HR 1.21, IC95% 0.85-1.71, $p = 0.29$), si bien esta correlación sí alcanzaba la significación estadística en población china (HR 1.55, IC95% 1.04-2.29, $p = 0.03$).

En la tabla 5, se muestra los principales estudios que ha correlacionado la expresión de PD-L1 con peor resultado en términos de supervivencia.

Tabla 5. Principales estudios que correlacionan negativamente la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón con la supervivencia.

Autor	Año	n	Tipo Histológico	Estadio	Resultados
Mu y cols.(97)	2011	109	CPCNP	I-III	PD-L1 53.2% ↓ SG 3 años en PD-L1 positivos (p=0.034)
Chen y cols.(93)	2012	120	CPCNP	I-III	PD-L1 57.5% ↓ SG 5 años en PD-L1 positivos (p<0.001)
Azuma y cols.(116)	2014	164	CPCNP	I-III	- ↓ SG en PD-L1 positivos (p=0.039)
Zhang y cols.(106)	2014	143	Adenocarcinomas	I-III	PD-L1 49% ↓ SG y SLE en PD-L1 positivos (p<0.001, p=0.002)
Mao y cols.(96)	2014	128	CPCNP	I-III	PD-L1 72.7% ↓ SG en PD-L1 positivos (p<0.01)
Ji y cols.(102)	2016	100	Adenocarcinomas	I-III	PD-L1 40% RR 2.205 en PD-L1 positivos (p=0.026)
Inamura y cols.(101)	2016	268	Adenocarcinomas	I-IV	PD-L1 16% ↓ SLE y SG en PD-L1 positivos (p=0.019, p=0.0014)

* SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad, RR: riesgo relativo

Por otro lado, existen estudios que han observado una correlación directa entre la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón y la supervivencia (a mayor expresión, mayor supervivencia), a pesar de que no se conoce el mecanismo por el que la mayor activación de esta vía de evasión de la respuesta inmune puede asociarse a mejor pronóstico sin haber administrado terapias anti-PD1 o anti-PDL1. La tabla 6 muestra los resultados de los principales estudios en los que se ha observado una correlación directa entre expresión de PD-L1 y supervivencia.

Tabla 6. Principales estudios que correlacionan directamente la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón con la supervivencia.

Autor	Año	n	Tipo Histológico	Estadio	Resultados
Yan y cols.(104)	2014	163	Adenocarcinomas	I	PD-L1 39.9% ↑ SLE (p=0.027)
Velcheti y cols.(98)	2014	340 (Coh. 1) 204 (Coh. 2)	CPCNP	I-IV	PD-L1 25% ↑ SG (p=0.028 en cohorte 1; p=0.037 en cohorte 2)
Cooper y cols.(89)	2015	681	CPCNP	I-III	PD-L1 (>50%) 7.4% ↑ SG en PD-L1 positivos (HR 0.65, p<0.05)
Hung y cols.(100)	2016	112	Adenocarcinomas	IA-III A	PD-L1 88.4% ↑ SG (RR 0.175, p=0.023)
Yang y cols.(105)	2016	105	Escamosos	I	PD-L1 56.2% ↑ SLE (HR 0.446, p=0.008) y ↑ SG (HR 0.282, p<0.001)

* SG: supervivencia global; SLE: supervivencia libre de enfermedad, RR: riesgo relativo

Estos datos muestran nuevamente la controversia aún existente sobre el valor pronóstico de la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón, y la heterogeneidad de los estudios en relación a los tipos histológicos, estadio incluidos, así como valoración de la expresión de PD-L1.

1.10.5. Relevancia terapéutica de la terapia anti PD-1 y anti PD-L1 en el cáncer de pulmón

En los últimos años se han desarrollado moléculas dirigidas a bloquear la unión de PD-1 con su ligando PD-L1 en diferentes tipos de tumores (inhibidores de los checkpoint inmunes, ICI's), y en el caso del cáncer de pulmón se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) y anti PD-L1 (Atezolizumab y Durvalumab) entre otros. La Food and Drug Administration de Estados Unidos (FDA), ha aprobado el uso de moléculas anti-PD1 en melanoma metastásico, cáncer de pulmón, cáncer de colon y carcinoma de células renales. Nivolumab (BMC, Ono Pharmaceutical) ha sido aprobado en el tratamiento de cáncer de pulmón en EEUU, Japón y Europa, mientras que Pembrolizumab (Merck & Co.) ha sido aprobado en EEUU y Europa para cáncer de pulmón PD-L1 positivo.(91). El objetivo es mejorar la respuesta inmune anti-tumoral o bloquear el eje PD-1/PD-L1 para evitar la supresión de la misma.

En una revisión sistemática y meta-análisis de Gandini y cols. en 2016, se analizan 8 trabajos en CPCNP que evalúen terapias anti-PD1 con relación a sus resultados clínicos (4 en fase I, 2 en fase II, 2 en fase III), cinco de los cuales evalúan Nivolumab, un trabajo evalúa Pembrolizumab y otros dos trabajos evalúan en general dichas terapias, todos ellos como segunda línea de tratamiento. Globalmente se aprecia una mayor tasa de respuesta objetiva en los pacientes tratados tanto en el subgrupo histológico de escamosos (26% vs. 15% en PD-L1 positivos y negativos respectivamente; OR 1.49 [0.48-4.64]) como en los no escamosos (29% vs. 11% en PD-L1 positivos y negativos respectivamente; OR 3.78 [1.54-9.24]) (117), si bien se observa que en el subgrupo de escamosos existe también respuesta en los pacientes PD-L1 negativos. Se desconoce si la respuesta en pacientes PD-L1 negativos puede relacionarse con la heterogeneidad intratumoral en el muestreo o la expresión de PD-L1, o incluso con la variabilidad dinámica en su expresión.

La mayoría de estudios han comparado el tratamiento con estas nuevas moléculas con el estándar de tratamiento (Docetaxel) en cáncer de pulmón avanzado y previamente tratado, obteniendo tasas de respuesta global de entre 20-25%. (80). Mayoritariamente se ha observado una tasa de respuesta mayor en aquellos casos considerados positivos para la expresión de PD-L1, si bien los criterios para definir un resultado positivo como hemos visto anteriormente son heterogéneos. A pesar de ello, los resultados de las cohorte PD-L1 “negativas” han sido en la mayor parte de casos superiores a los obtenidos con Docetaxel.

En el caso de Nivolumab, destacan 2 trabajos, uno en carcinoma escamoso y otro en no escamoso. En el Checkmate 017 (fase 3), se compara la terapia con Nivolumab vs. Docetaxel en carcinoma escamoso previamente tratado, observando mayor SG (9.2 vs 6.0 meses mediana; HR 0.59 IC 0.44-0.79, <.001), mayor SLE (3.5 vs 2.8 meses mediana; HR 0.62 IC 0.47-0.81, <.001) y mayor tasa de respuesta (20% vs. 9%; <0.008) a favor de Nivolumab, si bien la tasa de respuesta, la SG y la SLE fueron independientes de la expresión de PD-L1 valorada mediante el clon 28-8 de Dako (118). En el Checkmate 057 (fase 3), se compara la terapia con Nivolumab vs. Docetaxel en carcinoma no escamoso previamente tratado, observando mayor SG (12.2 vs 9.4 meses mediana; HR 0.73 IC 0.59-0.89, =.002), y mayor tasa de respuesta (19% vs. 12%; =0.02) a favor de Nivolumab, si bien la SLE no favoreció a Nivolumab respecto a Docetaxel (2.3 vs. 4.2 meses). En este caso, el tratamiento con Docetaxel se relacionó con mayor tasa de respuesta, SG y SLE con niveles de expresión de PD-L1 de al menos 1%, al menos 5% y al menos 10%(119).

En relación con Pembrolizumab, se han llevado a cabo diversos estudios. En el estudio KEYNOTE 001 (fase 1), se analizaban 3 pautas de terapia con Pembrolizumab en cáncer de pulmón en cualquier línea de tratamiento, obteniendo una tasa de respuesta de 19.4%, una SLE de 3.7 meses y una SG de 12 meses. Definiendo una expresión positiva de PD-L1 en al menos el 50% de células tumorales, la tasa de respuesta fue del 45.2%, la SLE 6.3 meses y la SG no fue alcanzada durante el estudio (26 meses), por lo que en base a estos resultados se aprobó su indicación en cáncer de pulmón avanzado con progresión tras otras terapias con expresión en al menos el 50% de células tumorales de PD-L1 al utilizar el clon 22C3 de Dako para su análisis IHQ(120). En el estudio KEYNOTE 010 (fase 3), se analizaban 2 pautas de Pembrolizumab vs. Docetaxel en cáncer de pulmón en segunda línea tras tratamiento

con dobletes basados en platino, con expresión de PD-L1 positiva (>1% céls. tumorales) usando el clon 22C3 de Dako. Se obtuvo una SG significativamente mayor con Pembrolizumab (posología 1 y 2) al comparar con Docetaxel (mediana 10.4 vs. 12.7 vs. 8.5 meses; para 2 mg/kg vs. docetaxel, HR 0.71, 95% IC: 0.58–0.88, $p=.0008$; para 10 mg/kg vs. docetaxel, HR 0.61, 95% IC: 0.49–0.75, $p<.0001$). Así mismo se observó una mayor tasa de respuesta (18% versus 18% versus 9%; $p=.0005$ para 2 mg/kg vs. docetaxel; $p=.0002$ para 10 mg/kg vs. docetaxel), aunque la diferencia en SLE no fue significativa (mediana 3.9 vs. 4.0 vs. 4.0 meses; para 2 mg/kg vs. docetaxel, HR 0.88, 95% IC 0.74–1.05, $p=.07$; para 10 mg/kg vs. docetaxel, HR 0.79, 95% IC: 0.66–0.94, $p=.004$)(121).

Respecto a Atezolizumab, la expresión de PD-L1 se ha analizado mediante el clon SP142 por separado en células tumorales (CT's) y en células inmunes (CI's) en un estudio en fase 1. La asociación entre respuesta al fármaco y expresión de PD-L1 en células inmunes alcanzó la significación estadística ($p=.015$), no así en células tumorales ($p=.920$). Al modificar las categorías de expresión en células tumorales e inmunes (TC3/IC3) del 10% al 50% de las células totales, la tasa de respuesta a atezolizumab fué del 48% para ambas (122). En el estudio aleatorizado POPLAR (fase 2) (123), comparando tratamiento frente a Docetaxel en pacientes con cáncer de pulmón en 2ª línea, Atezolizumab mostró una mayor SG (12.6 vs. 9.7 meses mediana, HR 0.73 IC 0.53-0.99, $p=.04$) sin diferencias significativas en SLE ni en tasa de respuestas (SLE 2.7 vs. 3 meses; Tasa respuesta 15% vs. 15%). Se observó que una mayor expresión de PD-L1 en células tumorales y células inmunes se asociaba a una mejor SG, SLE y tasa de respuestas, siendo ambas CT's y CI's factores predictores de mejor SG. En el estudio en fase 2 FIR (124) de cáncer de pulmón localmente avanzado o metastásico, se dividió en 3 cohortes: pacientes sin metástasis cerebrales con Atezolizumab como 1ª línea, pacientes sin metástasis cerebrales con Atezolizumab como 2ª línea o posterior, y pacientes con metástasis cerebrales con Atezolizumab como 2ª línea o posterior. Una elevada expresión de PD-L1 en CT's y en CI's se asoció a una mayor tasa de respuesta, mejor SG y SLE. En el trabajo BIRCH sobre Atezolizumab en cáncer de pulmón localmente avanzado o metastásico, también se dividió a los pacientes en 3 cohortes (Atezolizumab como 1ª línea, como 2ª línea, como 3ª línea o posterior), objetivando una mayor tasa de respuesta en los pacientes con elevada expresión de PD-L1 en todas las cohortes, y una mayor SLE en

las cohortes de 2ª y de más de 3 líneas de tratamiento (125). Un resultado parecido a los previos se ha observado en un estudio de 2015, con mejor HR para supervivencia global con la expresión creciente de PD-L1 (126).

En el caso de Avelumab, se obtuvieron en un estudio en fase 1b una tasa de respuesta de 13.6%, una SLE mediana de 11.6 semanas y una SG de 8.4 meses. Los tumores con más del 1% de CT's con expresión de PD-L1 (resultados positivos) mostraron una mayor tasa de respuesta, SLE y SG (127).

Con Durvalumab, en un estudio en fase I-II se observó una tasa de respuesta del 16%, siendo mayor en los tumores con $\geq 25\%$ de CT's con expresión de PD-L1 analizada mediante el clon SP263 (resultados positivos) (128).

1.10.6. PD-L1 como biomarcador de respuesta a terapias dirigidas en el cáncer de pulmón

La aprobación por parte de la FDA y EMA (European Medicines Agency) de Nivolumab y Pembrolizumab ha acelerado el interés por encontrar un biomarcador que pueda predecir qué pacientes se beneficiarán más de estos tratamientos y evitar la exposición innecesaria a otros pacientes y sus posibles efectos secundarios. La aprobación de Pembrolizumab se ha realizado mediante un “companion diagnostic”, que es un ensayo diseñado por una compañía diagnóstica e investigado conjuntamente con una compañía farmacológica en forma de ensayo clínico, y divide los casos en biomarcador “positivos” o “negativos”, administrando el fármaco sólo a los biomarcador “positivo”. En este caso se ha llevado a cabo con el clon 22C3 de Dako. Nivolumab en cambio ha sido aprobado con un “complementary diagnostic”, que es un ensayo que tiene la intención de servir de guía para el tratamiento pero en el que no se evalúa el tratamiento con ningún fármaco. En este caso se ha llevado a cabo con el clon 28-8 de Dako. (110)

Frecuentemente se ha utilizado como biomarcador predictivo de respuesta la expresión de PD-L1, bien en células tumorales o bien en células inmunes efectoras (112), habiéndose encontrado correlación con la respuesta clínica tanto en cáncer de pulmón (29% vs. 11%) como en melanoma metastásico (45% vs. 27%). Resulta complicado atribuir hoy en día el papel de biomarcador predictivo a PD-L1, debido al uso de diferentes plataformas inmunohistoquímicas, anticuerpos, sistemas de

puntuación, puntos de corte y diferentes agentes terapéuticos (110), además de que los resultados obtenidos en el análisis del biomarcador en una muestra no son fiel reflejo del estado real de la expresión de PD-L1 por los motivos explicados anteriormente, y el hecho de que se observe respuesta en algunas cohortes negativas para PD-L1. Así mismo desconocemos si el grado de expresión del mismo se correlaciona con la tasa de respuesta y la supervivencia.(117). De hecho se observa que utilizando el punto de corte de expresión de PD-L1 en 5% (el más usado) y en 1%, no hay variación significativa en la OR en los pacientes tratados, pero sí tendencia a una mayor respuesta cuanto mayor expresión de PD-L1.





2. JUSTIFICACIÓN

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

El cáncer de pulmón constituye un problema de salud epidémico a nivel mundial, dado que continúa siendo la neoplasia maligna con mayor incidencia, y la que presenta una mayor mortalidad(2). Esta enfermedad supone un auténtico desafío por el enorme impacto que presenta en la salud poblacional, su amplia distribución geográfica y sus elevados costes directos e indirectos derivados de su asistencia.

En las últimas décadas se han alcanzado grandes logros en la lucha contra el cáncer, y existen ejemplos de neoplasias en las que se han conseguido importantes avances en la detección precoz mediante programas de cribado con impacto sobre la supervivencia; tal es el caso del cáncer colorrectal y el cáncer de mama.

Así mismo, se han añadido nuevos descriptores a los clásicos del sistema de estadificación TNM, como factores morfológicos tumorales, índices de proliferación y marcadores moleculares, que han permitido clasificar de modo más preciso el global de la enfermedad en subgrupos o categorías según su pronóstico, y consecuentemente una mayor individualización en la aproximación terapéutica (129,130).

En el cáncer de pulmón se han mantenido los descriptores clásicos en la estadificación, si bien han sufrido sucesivas modificaciones para tratar de calificar mejor el pronóstico de los pacientes. Por ejemplo, el tamaño tumoral tiene un papel muy relevante en la estratificación de los pacientes, así como la correcta y apurada estadificación ganglionar mediastínica (33). Disponemos de descriptores con valor pronóstico adicionales a los clásicos (invasión linfática, venosa o perineural, tumor residual o grado de diferenciación), que ya se están incorporando progresivamente a los algoritmos de decisión terapéutica, además de otros factores aún en estudio que también parecen tener valor pronóstico o predictor de respuesta.

Así, la nueva clasificación del adenocarcinoma del año 2011 (30), que ya se incorporó a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2015 de "Tumores de Pulmón, Pleura, Timo y Corazón", ha permitido definir los grados histológicos del adenocarcinoma en función del subtipo histológico y correlacionar un peor pronóstico en grados mayores. Por otro lado, la expresión de determinadas mutaciones codificadas por oncogenes han mostrado tener un importante valor predictivo de respuesta al tratamiento con inhibidores de la tirosín kinasa (TKI's, por

sus siglas en inglés), de modo que el estudio de mutaciones en el EGFR, KRAS, reordenamiento ALK e incluso ROS1 se han incorporado a la práctica clínica habitual para la selección de la mejor opción terapéutica(37).

En los últimos años se ha intensificado el estudio sobre el papel que juega el sistema inmune en la vigilancia antitumoral, así como la interrelación entre el mismo y el cáncer de pulmón. Se han descubierto varias vías de control inmune (*immune checkpoints*), mediante las cuales el cáncer de pulmón trata de burlar la vigilancia de nuestro sistema inmune, como son la vía del CTLA-4 y la del PD-1/PD-L1. A pesar del carácter reciente de los estudios sobre PD-L1 en cáncer de pulmón (principalmente entre 2014 y 2017), la evidencia acumulada apunta que una sobreexpresión de PD-L1 en las células tumorales se correlaciona con peor pronóstico. La explicación radicaría en que esta sobreexpresión sería una estrategia de las células neoplásicas para inactivar la respuesta inmune antitumoral. Así mismo, el desarrollo de moléculas que bloquean este PD-L1 o su receptor en las células T inmunes (PD-1) ha conseguido demostrar mejores resultados que el tratamiento estándar en cáncer de pulmón avanzado, motivo por el cual la FDA ha aprobado el uso de dos de estas moléculas en el tratamiento del CPCNP avanzado: Pembrolizumab y Nivolumab(118–120).

El índice de proliferación Ki-67 se había estudiado en numerosas neoplasias malignas, correlacionándose con peor pronóstico una mayor actividad proliferativa. En CPCNP, los principales estudios apuntan a un peor pronóstico en los subtipos adenocarcinoma, especialmente en estadios iniciales, asociado a peores tasas de supervivencia global y libre de enfermedad(67–69).

Todos estos hallazgos nos muestran como la investigación y el conocimiento sobre la génesis y el desarrollo del cáncer de pulmón son esenciales para determinar nuevos marcadores pronósticos, que nos permitan estratificar de un modo más preciso a los pacientes, así como determinar nuevos marcadores predictivos de respuesta, que permitan al paciente acceder a nuevas terapias dirigidas tales como los TKI's o los ICI's (inhibidores de puntos de control inmunes, por sus siglas en inglés).

Esto resulta especialmente relevante en el cáncer de pulmón debido a su enorme impacto en la salud poblacional y los elevados costes derivados del diagnóstico y tratamiento; más aún cuando, a diferencia de otras neoplasias malignas, la comunidad

médica no ha conseguido grandes mejoras en la supervivencia por esta enfermedad en las últimas décadas.





3. HIPÓTESIS

A continuación se exponen las principales hipótesis que corresponden a las preguntas de investigación implícitas en los objetivos de este estudio:

1. En estadios iniciales de cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) sin afectación ganglionar (N0), sometidos a resección quirúrgica con intención curativa sin tratamiento neoadyuvante, un índice proliferativo alto medido mediante Ki-67 no se correlaciona con un peor pronóstico evaluado mediante la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global.
2. En estadios iniciales de cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) sin afectación ganglionar (N0), sometidos a resección quirúrgica con intención curativa sin tratamiento neoadyuvante, la sobreexpresión de PD-L1 en las células tumorales no se correlaciona con un peor pronóstico evaluado mediante la supervivencia libre de y la supervivencia global.
3. No existe asociación entre la expresión del índice de proliferación Ki-67 y otras variables clínicas y patológicas.
4. No existe asociación entre la expresión de PD-L1 en células tumorales y otras variables clínicas y patológicas.



4. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es analizar retrospectivamente una cohorte de pacientes con CPCNP en estadio inicial (I-II), sin afectación ganglionar (N0), intervenidos entre 2003 y 2011 con intención curativa, y sin tratamiento neoadyuvante previo, para determinar si existen categorías pronósticas en función de parámetros no incluidos en el sistema de estadificación TNM para cáncer de pulmón.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- 1.1. Determinar si el índice proliferativo Ki-67 se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y global.
- 1.2. Determinar si la sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y global.
- 1.3. Analizar la relación entre el índice proliferativo Ki-67 con variables clínicas y anatomopatológicas.
- 1.4. Analizar la relación entre la expresión de PD-L1 con variables clínicas y anatomopatológicas.



5. METODOLOGÍA

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

5.1.1. Tipo de estudio

Para el desarrollo de los objetivos se ha realizado un estudio unicéntrico observacional retrospectivo.

5.1.2. Ámbito de estudio

El Servicio de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Alicante (HGUA) ha sido tradicionalmente el servicio de referencia de la provincia de Alicante para la patología relativa a dicha especialidad, la cual incluye el tratamiento quirúrgico del cáncer de pulmón. Durante la mayor parte de los años en los que se intervino a los pacientes de este estudio, prestó servicio a todos los Departamentos de Salud de la provincia. Desde los años 2006 a 2010 (inauguración de los hospitales bajo el modelo de concesión administrativa), continúa siendo referente y atendiendo a los pacientes de los Departamentos de Alcoy (15), Marina Baixa (16), Alicante - Sant Joan (17), Elda (18), Alicante - Hospital General (19), Elche – Hospital General (20) y Orihuela (21). La población adscrita al Hospital General Universitario de Alicante según datos del SIP de 2012 es de 268.343 personas, si bien a esta población habría que añadir los pacientes referidos por otros departamentos de la provincia al ser referencia provincial, con lo que el número alcanzaría los 1.943.910 potenciales pacientes. El servicio está formado en la actualidad por 6 cirujanos torácicos de plantilla a tiempo completo (1 jefe de servicio, 1 jefe de sección, 4 facultativos especialistas) y 2 médicos internos residentes (MIR), si bien la plantilla del mismo ha oscilado entre 3 y 5 cirujanos torácicos durante los años en los que se intervino a los pacientes incluidos en este proyecto. Dispone de 29 camas de hospitalización, así como de una Unidad de Cuidados Intermedios con 6 camas, y una Unidad de Reanimación con 12 camas para los pacientes intervenidos hospitalizados.

5.1.3. Población de estudio

La población de este estudio la constituyen los pacientes atendidos de forma consecutiva en el citado servicio de Cirugía Torácica del Hospital General Universitario de Alicante que cumplieran los siguientes criterios de inclusión y ninguno de exclusión:

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

5.1.3.1. Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de carcinoma pulmonar primario confirmado histológicamente tras intervención quirúrgica, en estadio inicial (I-II), sin afectación ganglionar clínica en estudio preoperatorio ni patológica postoperatoria (cN0, pN0), ni afectación metastásica a distancia (cM0, pM0) según la 7ª Edición del TNM de la IASLC (32), vigente durante el periodo de intervención de los pacientes.
- Pacientes intervenidos en el HGUA entre enero de 2003 y diciembre de 2011 mediante resección pulmonar anatómica (lobectomía, bilobectomía, neumonectomía, segmentectomía anatómica) o resección no anatómica en cuña en casos de intolerancia funcional a cirugía de resección anatómica. Los casos se acompañaron de muestreo ganglionar / disección ganglionar reglada hiliomediastínica según recomendaciones de la IASLC/UICC (32).
- Disponibilidad de tejido parafinado necesario para el análisis procedente de la intervención quirúrgica (se solicitó informe de disponibilidad de muestras al Biobanco del HGUA).
- Los tipos histológicos incluidos siguiendo la clasificación de la OMS de 2004 (131), son:
 - Adenocarcinoma
 - Carcinoma Escamoso
 - Carcinoma de célula grande
 - Carcinoma adenoescamoso
- Tiempo de seguimiento postoperatorio superior a 24 meses salvo fallecimiento previo a esta fecha.

5.1.3.2. Criterios de exclusión:

- Pacientes menores de 18 años de edad.

- Tratamiento oncológico no quirúrgico neoadyuvante preoperatorio o adyuvante postoperatorio (quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, terapias biológicas).
- Carcinoma pulmonar tipificado como otros subtipo histológico diferente a los referidos durante el estudio patológico.
- Fallecimiento en los 30 días posteriores a la intervención por complicaciones postoperatorias.
- Imposibilidad de obtener datos en las revisiones postoperatorias en Consultas Externas.

5.1.4. Fuentes de datos

Los datos de la cohorte del estudio se obtuvieron tras solicitar el permiso pertinente a través del registro anual en papel de pacientes atendidos (intervenidos y no intervenidos) en el Servicio de Cirugía Torácica del HGUA, disponible en el Archivo General del centro, en el que figuran todos los informes de alta. Una vez identificados todos los pacientes intervenidos durante los años incluidos en el estudio, se comprobó que los pacientes cumplieran todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión mediante la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del HGUA (PatWin®), a través del número de historia clínica hospitalario de los pacientes (NHC). En dicha base se recogían datos básicos de filiación, algunas variables clínicas y datos relativos a parámetros del estudio patológico de las muestras. Dichos datos fueron incorporados a una base de datos en formato Microsoft Access® propia para este estudio, en la que se asignó un número de filiación para cada caso con la finalidad de poder eliminar datos identificativos de los pacientes y realizar el estudio de manera anonimizada.

A continuación se completaron los datos relativos a las variables clínicas mediante la revisión de la Historia Clínica de los pacientes a través de los sistemas informáticos disponibles en el HGUA (sistema de información ambulatoria- SIA.REAL.exe 2.0; Alta Hospitalaria- MIZAR v.julio 2015; ORION.Clinic v.noviembre 2016), así como la historia clínica en formato papel de cada paciente. El proceso de revisión de las variables clínicas se ha llevado a cabo sistemáticamente desde el inicio del estudio 1 vez al año, hasta finalizar el 31 de Julio de 2016 para disminuir la posibilidad de errores y

actualizar los datos. A través de dichas variables clínicas se obtuvieron los datos relativos a las variables de resultado (supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad).

Cada paciente ha sido incluido una sola vez, aunque existiera una biopsia anterior o posterior con diagnóstico de carcinoma pulmonar, bien sea por un segundo tumor primario o una recaída del previo.

La fecha de la última revisión de la historia clínica de los pacientes ha sido el 31 de Julio de 2016, salvo en los casos en los que se produjo previamente el fallecimiento posterior a los 30 días de la intervención, o la pérdida de seguimiento pasados los 24 meses mínimos.

5.1.5. Tamaño muestral y tipo de muestreo

En relación a la selección de la muestra, se incluyeron todos aquellos pacientes que cumplieron todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, de forma consecutiva, no aleatoria, en base a la fecha de cirugía, sin aplicar ningún procedimiento de muestreo. El reclutamiento de los pacientes se llevó a cabo entre Abril de 2013 y Julio de 2016. El inicio del periodo de estudio se remonta a 2003 debido a que es el primer año a partir del cual se dispone de un archivo fidedigno con toda la información clínica relevante en el Servicio de Cirugía Torácica del HGUA. El fin del periodo es 2011 debido a la voluntad de disponer de al menos 5 años de seguimiento desde la última fecha de intervención. Con ello, la muestra definitiva está constituida por 170 pacientes que fueron los que cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión durante el periodo entre enero de 2003 y diciembre de 2011, periodo objeto del estudio.

5.2. VARIABLES A ESTUDIO

Las siguientes variables por categorías fueron recogidas en los pacientes del estudio:

5.2.1. Variables de identificación y clínicas (se han definido en base a las especificaciones del protocolo de recogida de datos para la inclusión de pacientes en la base de datos de la STS, "STS General Thoracic Surgery Database Data

Specifications Version 2.3”(132).

- *Número de filiación*: Número único consecutivo cronológico (de 1 a 170) asignado a cada paciente, siendo el sujeto 1 el primer paciente intervenido durante el período del estudio, y el sujeto 170 el último paciente intervenido durante dicho período. Estos códigos permanecen anonimizados con el fin de no poder identificar a ningún paciente del estudio.
- *Edad en el momento de la intervención*: indica la edad del paciente expresada en años en el momento de la intervención, calculada desde su fecha de nacimiento hasta la fecha de la cirugía.
- *Sexo*: indica el sexo del paciente al nacimiento, hombre o mujer.
- *Intensidad de hábito tabáquico*: indica la exposición de primera mano al tabaco, expresada en años/paquete (Se calcula multiplicando el número de paquetes de cigarrillos fumados al día por el número de años en que la persona ha fumado)(133). Posteriormente para el análisis de datos se categorizó el hábito tabáquico en tres categorías: nunca fumador o fumador leve (entre 0 y 15 años/paquete), fumador moderado (entre 16 y 30 años/paquete) y fumador severo (por encima de 30 años/paquete).
- *Fecha de la cirugía*: Indica la fecha de la cirugía de resección pulmonar, expresada como día/mes/año.
- *Tipo de cirugía*: expresa el tipo de resección quirúrgica realizada (lobectomía, bilobectomía, segmentectomía anatómica, neumonectomía o resección no anatómica en cuña).
- *Lado*: Indica cuál de los dos pulmones ha sido sometido a la cirugía (derecho, izquierdo).
- *Lóbulo*: Indica la localización anatómica del tumor según lóbulos pulmonares (lóbulo superior derecho, lóbulo medio, lóbulo inferior derecho, lóbulo superior izquierdo, lóbulo inferior izquierdo).

- *Fecha de último seguimiento*: Indica la fecha de la última revisión realizada al paciente expresada como día/mes/año, y es equivalente a la de fallecimiento en caso de que éste se haya producido.

5.2.2. Variables morfológicas clásicas

- *Tamaño tumoral*: indica el tamaño del componente invasivo expresado en centímetros valorado mediante microscopía óptica.
- *Tipo histológico*: Indica el tipo histológico según la clasificación de la OMS de 2015 (29). Para ello se recuperaron las preparaciones teñidas con H&E correspondientes a cada caso procedentes de la pieza quirúrgica, y se seleccionaron aquellos con presencia de tumor. De cada caso se revisaron 4 preparaciones histológicas por dos patólogos de manera independiente, mediante microscopía óptica. En caso de discordancia con el diagnóstico previo, se recuperaron la totalidad de las preparaciones y se realizó una nueva revisión del mismo. Las categorías fueron: adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma de célula grande y carcinoma adenoescamoso.
- *Invasión pleural*: Indica la afectación o no de la pleura visceral mediante valoración con H&E. En casos dudosos, se emplearon técnicas histoquímicas (orceína de Van Gieson).
- *Grado nuclear*: evaluación del tamaño y forma del núcleo en las células tumorales, y se categoriza en grado bajo, intermedio o alto (Tabla 7).
- *Grado histológico*: indica el grado de diferenciación de los subtipos con componente adenocarcinoma, basado en características arquitecturales (Tabla 8).

Tabla 7. Clasificación según el grado nuclear.

Grado	Características nucleares
1 (Bajo)	Núcleos con tamaño uniforme, con nucleolos uniformes y baja actividad mitótica
2 (Intermedio)	Mayor pleomorfismo nuclear y anisonucleosis
3 (Alto)	Gran pleomorfismo nuclear y nucléolos gigantes

Tabla 8. Clasificación de los adenocarcinomas según grado de diferenciación por tipos histológicos (30).

Grado	Diferenciación	Patrón de crecimiento
1	Bien diferenciado	ACA in-situ(*), mínimamente invasivo (*) o predominantemente lepidico.
2	Moderadamente diferenciado	Acinar o papilar.
3	Mal diferenciado	Sólido o micropapilar.

(*) Excluidos del estudio; ACA: adenocarcinoma

- *Número total de ganglios*: indica el número de ganglios resecados durante el muestreo ganglionar / disección ganglionar reglada hiliomediastínica.
- *Estadio patológico*: indica la estadificación patológica postoperatoria de cada uno de los pacientes de acuerdo con los criterios de la 7ª edición TNM(32). Se incluyeron los estadios desde IA hasta IIB, para su posterior categorización de cara al análisis.(Tabla 9)

Tabla 9: Estadio patológico según la 7ª Edición TNM(32).

Estadio	T	N	M
IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0

5.2.3. Variables inmunohistoquímicas

- *PD-L1 (programmed death-ligand 1)*: indica el porcentaje de células tumorales de las muestras parafinadas del cáncer de pulmón con expresión de la proteína PD-L1 evaluada mediante el kit PD-L1 IHC22C3 pharmDx que incluye el

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

anticuerpo monoclonal murino anti PD-L1 22C3 (Dako-Agilent) (Tabla 10).

- *Actividad proliferativa (Ki-67)*: indica la actividad proliferativa valorada con técnicas de IHQ cuantificando el porcentaje de células tumorales no quiescentes de las muestras parafinadas del cáncer de pulmón con expresión de Ki-67 valorada mediante el anticuerpo monoclonal MIB1. (Tabla 10)

Tabla 10: Anticuerpos utilizados para técnicas de IHQ.

Anticuerpo	Clon	Fabricante	Dilución
Anti PD-L1	22C3 Monoclonal murino	Dako-Agilent	Prediluido
Ki-67	MIB1 Monoclonal murino	Dako	1:50

5.2.4. Variables de resultado

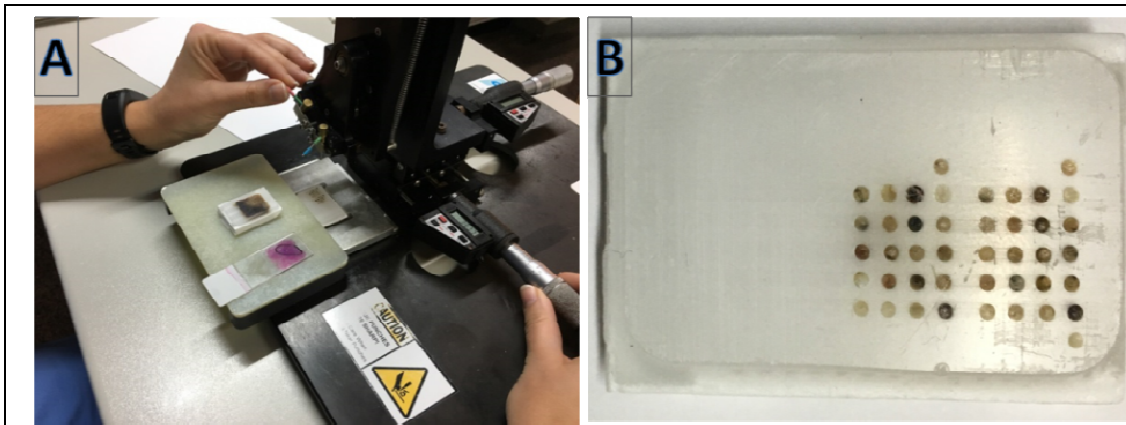
- *Tiempo de seguimiento*: indica el número de meses transcurridos entre la cirugía y la última revisión (en los casos de no fallecimiento ni pérdida de seguimiento), entre la cirugía y el fallecimiento (en los casos de fallecimiento), o entre la cirugía y la última fecha con seguimiento (en los casos de pérdida de seguimiento superior a 24 meses sin fallecimiento). Se calcula mediante métodos estadísticos.
- *Recaída*: Indica si ha existido recaída del carcinoma pulmonar intervenido, bien sea local, ganglionar, pleural, a distancia o alguna combinación de las mismas (sí, no). Se determina en la fecha del último seguimiento para conocer el status del paciente.

- *Fecha de la recaída*: en los casos de recaída, indica la fecha de la misma expresada como día/mes/año.
- *Tipo de recaída*: especificando por categorías la localización de la misma (local, ganglionar, pleural, a distancia o alguna combinación de las mismas).
- *Exitus*: Indica si ha existido fallecimiento posterior a la cirugía durante el periodo de seguimiento, y se valora en la fecha del último seguimiento (vivo, exitus). Dado que se ha realizado estricto análisis del seguimiento de los pacientes, mediante la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global pueden estimarse también los exitus por la enfermedad, y aquellos por otras causas. Se determina en la fecha del último seguimiento para conocer el status del paciente.
- *Fecha exitus*: fecha de fallecimiento del paciente expresada como día/mes/ año.
- *Supervivencia libre de enfermedad (SLE)*: Indica el tiempo expresado en meses que transcurre desde el tratamiento quirúrgico del cáncer hasta la recaída en los casos de recaída positiva, o bien el tiempo expresado en meses desde la cirugía hasta la fecha del último seguimiento o éxitus por cualquier causa en los casos de recaída negativa.
- *Supervivencia global (SG)*: Indica el tiempo expresado en meses que transcurre desde el tratamiento quirúrgico del cáncer hasta la fecha del exitus en los casos de fallecimiento, o hasta la fecha del último seguimiento en los casos de no fallecimiento.

5.3. CONSTRUCCIÓN DE LAS MATRICES DE TEJIDO (TMA'S)

Una vez realizada la valoración y clasificación morfológica de los casos del estudio, un patólogo identificó sobre las preparaciones teñidas con H&E un área con representatividad tumoral. Posteriormente, cada zona seleccionada se identificó en el bloque de parafina correspondiente y entonces se construyeron las matrices de tejido (TMAs, por sus siglas en inglés, *Tissue Microarrays*) (Figura 13).

Figura 13. Construcción de TMA's.



Construcción de TMAs. Tras la selección de un área representativa en H&E, se procede a extraer dos cilindros de tejido parafinado (**A**) y construir los TMA, cada uno con 20 casos más dos controles (**B**). Cada TMA será luego teñido con los diferentes anticuerpos.

Se elaboró una tabla de datos Microsoft Excel® para cada TMA con el número identificativo de cada caso para la anotación del resultado de cada anticuerpo en cada caso.

Para la construcción de los TMA's, se tomaron dos cilindros de tejido parafinado de cada tumor, de 1 mm de diámetro cada uno, que fueron llevados a un bloque receptor utilizando un equipo de construcción de matrices de tejido (Beecher instruments). Cada bloque incluyó un total de 20 casos (2 cilindros por caso) más 2 controles. Se construyeron un total de 8 bloques de matrices.

Posteriormente se realizaron secciones de 4 micrometros de espesor a cada bloque de TMA que fueron teñidas en el plazo de 24 - 48 horas para evitar pérdidas de inmunoreactividad.

La principal ventaja que aportan los TMA's es que permiten analizar de manera simultánea aproximadamente 40 casos (2 cilindros por cada caso más controles), minimizando el número de secciones y los costes derivados del uso de reactivos, por lo que además proporcionan una reacción inmunohistoquímica uniforme para todos los casos incluidos.

5.4. TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

5.4.1. Aplicación de la IHQ

La aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas se llevó a cabo sobre los cortes de los TMA's elaborados previamente, de forma automatizada con equipo Autostainer Link48 (Dako), con sistema de visualización de alta sensibilidad Envision® (Dako). Se utilizó el panel de anticuerpos mencionado en la tabla 8 (apartado 1.2.3. Variables inmunohistoquímicas). Para la correcta optimización de los anticuerpos se utilizaron controles positivos y negativos según bases de datos de expresión tisular.

Los cortes de tejido fueron sometidos a proceso de desparafinación mediante incubación en xilol y rehidratación mediante soluciones descendentes de etanol y agua. La recuperación antigénica se realizó con el equipo PT-Link tratando las secciones con "target retrieval solution Envisión Flex", con pH alto (9,0). Los anticuerpos primarios fueron incubados en el Autostainer durante tiempos que oscilaron entre 20 y 30 minutos, dependiendo del ajuste de los anticuerpos.

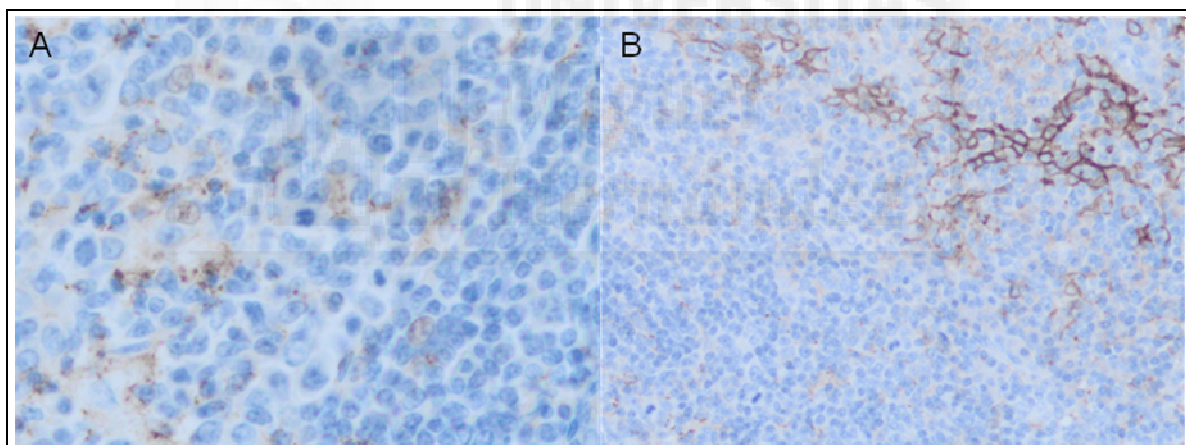
5.4.2. Valoración de las técnicas de IHQ

La valoración de los anticuerpos empleados en las técnicas de IHQ se realizó por dos observadores de forma independiente en microscopio óptico de multiobservación, cuantificando la totalidad de las células incluidas en la sección del cilindro (superficie 0,785 mm² por sección).

También se incluyeron cortes de tejido según instrucciones del fabricante y literatura, como controles positivos para cada anticuerpo (Tabla 11).

Tabla 11: Controles positivos anticuerpos IHQ.

Anticuerpo	Tejido control	Patrón de expresión
Ki-67	Amígdala	Tinción nuclear especialmente en centros germinales y capa basal del epitelio
PD-L1	Amígdala	Tinción importante en epitelio de la cripta y débil-moderada en los macrófagos foliculares de los centros germinales (Figura 14)

Figura 14. Control expresión PD-L1 en amígdala.


A: Tinción débil con patrón granular en células inmunes en la amígdala. B: Tinción importante en el epitelio de las criptas de la amígdala.

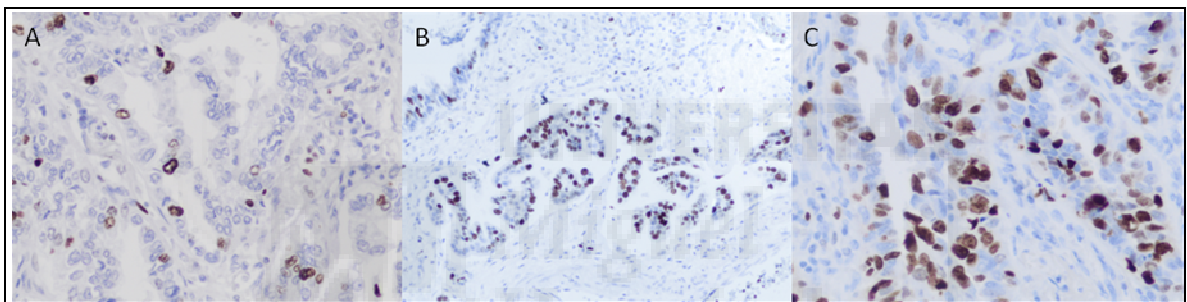
5.4.2.1. Valoración de marcadores de proliferación celular

La valoración del marcador de proliferación celular Ki 67 se realizó en TMA's en al menos 400 núcleos (cada cilindro de TMA tiene unas 300 a 1000 células), evitando

analizar exclusivamente áreas de elevada concentración de células positivas.

Como ya se ha señalado en la introducción, los principales puntos de corte para determinar un resultado como positivo oscilan entre 25 y 30%, con variaciones en la literatura (66). Algunos trabajos utilizan la mediana como valor discriminatorio. Ante la falta de consenso sobre un punto de corte óptimo de Ki67 para la valoración de CPCNP, se determinó la mediana (mediana 30), por lo que se consideró positivo cualquier resultado por encima de la misma para el análisis estadístico, si bien se utilizaron otros puntos de corte basados en la literatura como 5%, 10%, 20%, 25% y 40% para determinar aquellos que presentaron una mayor capacidad discriminatoria. La Figura 15 muestra diferentes grados de expresión de Ki-67.

Figura 15. Ejemplos de tinción de Ki-67.



A: Adenocarcinoma con baja expresión de Ki-67. B: Adenocarcinoma con expresión intermedia de Ki-67. C: Adenocarcinoma con expresión alta de Ki-67.

5.4.2.2. Valoración de expresión de PD-L1

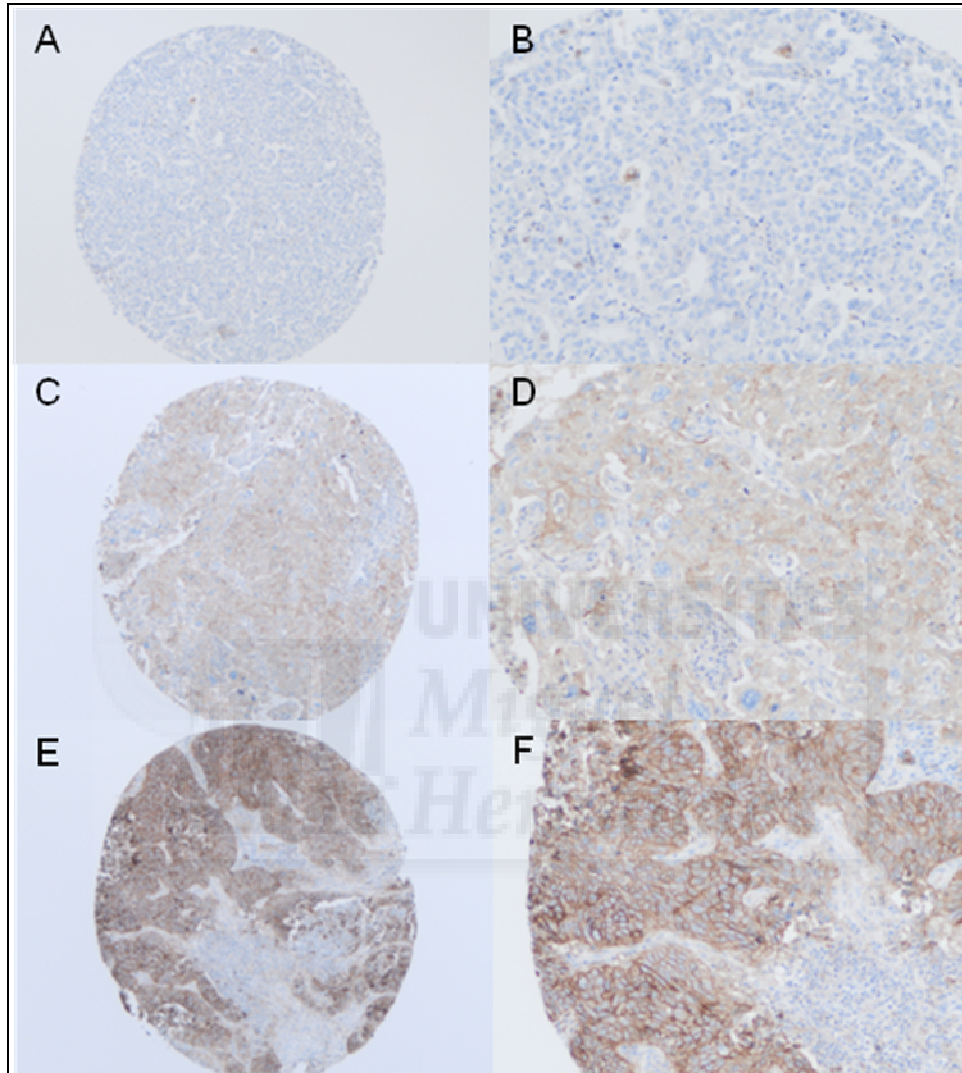
La valoración de la expresión de PD-L1 se realizó en TMAs seleccionando áreas con representatividad tumoral y empleando el anticuerpo monoclonal murino clon 22C3 de Dako, valorando tinción de membrana en células tumorales.

Se evaluaron las secciones teñidas con H&E para determinar la presencia de al menos 100 células tumorales viables. La tinción de membrana celular se clasificó en grados (Figura 16): ausente (0), débil (1+), moderada (2+), y fuerte (3+).

Se utilizaron controles positivos ($\geq 70\%$ de células con tinción moderada-fuerte) y

negativos (mayoría de células con tinción ausente).

Figura 16. Ejemplos de tinción de PD-L1.



A y B: Muestra con tinción negativa para PD-L1 en células tumorales, con expresión aislada en algunas células inmunes (macrófagos). C y D: Muestra con tinción moderada (2+) en un porcentaje alto de las células tumorales. E y F: Muestra con tinción fuerte (3+) en la práctica totalidad del tumor, que respeta el estroma.

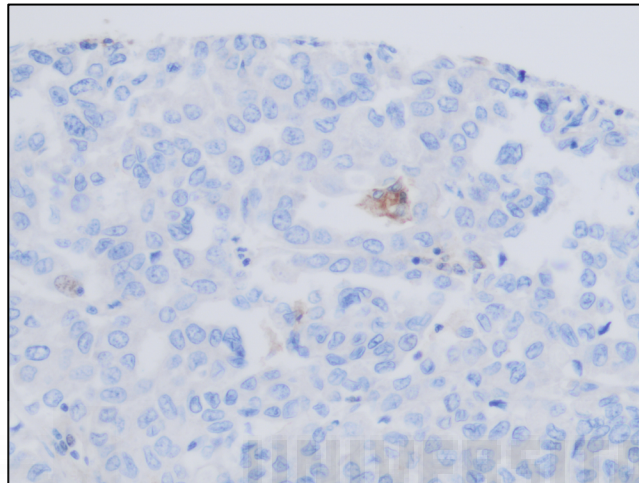
La evaluación la realizaron dos patólogos, utilizando planillas con celdas numeradas que representaban la estructura de cada TMA con dos muestras para cada tumor, anotando en cada celda el porcentaje de células tumorales con expresión de

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

membrana de PD-L1 así como el grado de intensidad. Es esencial evitar la confusión con la tinción de PD-L1 en otras células inmunes o macrófagos, así como la tinción citoplásmica (Figura 17).

Figura 17. Tinción de PD-L1 en células inmunes (macrófagos).



* Tinción de PD-L1 en célula inmune (macrófago) en ausencia de tinción en células tumorales y del estroma.

Según las instrucciones del fabricante, se clasificó las tinciones como:

- No expresión de PD-L1: TPS (“tumor proportion score”) <1%. Esto significa que menos del 1% de las células tumorales expresa PD-L1 con cualquier intensidad determinado por su tinción en membrana celular.
- Baja expresión de PD-L1: TPS (“tumor proportion score”) 1-49%. Esto significa que entre el 1-49% de las células tumorales expresa PD-L1 con cualquier intensidad determinado por su tinción en membrana celular.
- Alta expresión de PD-L1: TPS (“tumor proportion score”) ≥50%. Esto significa que al menos el 50% de las células tumorales expresa PD-L1 con cualquier intensidad determinado por su tinción en membrana celular.

Estas instrucciones del fabricante están basadas en los estudios que avalan el

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

tratamiento con Keytruda (Pembrolizumab) en los casos con TPS $\geq 50\%$. Dado que este estudio no tiene la finalidad de determinar aquellos casos subsidiarios de recibir tratamiento con ningún agente anti PD-L1, y basándonos en la literatura en la que se han establecido numerosos puntos de corte de expresión de PD-L1, utilizamos tres puntos de corte para el análisis estadístico y determinar la mejor capacidad discriminatoria:

- TPS 1%: al menos $\geq 1\%$ de las células tumorales expresa PD-L1 determinado por su tinción en membrana celular. Este punto de corte pretende considerar todos aquellos casos con tinción por débil que sea en un porcentaje superior al 1% para evitar el denominado “ruido” de la posible tinción de células inmunes o tinción citoplásmica.
- TPS 5%: al menos $\geq 5\%$ de las células tumorales expresa PD-L1 determinado por su tinción en membrana celular. Este punto de corte es uno de los más empleados en la literatura cuando se evalúa la expresión de PD-L1 en cáncer de pulmón.
- TPS 50%: al menos $\geq 50\%$ de las células tumorales expresa PD-L1 determinado por su tinción en membrana celular. Este punto de corte pretende determinar aquellos casos con expresión de membrana clara potencialmente subsidiarios de terapias anti PD-L1.

5.5. ANÁLISIS DE DATOS

5.5.1. Estudio descriptivo

Primero se han descrito los pacientes incluidos en el estudio. La evaluación de la distribución de datos se realizó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, de modo que para las variables cuantitativas con distribución normal se empleó la media y desviación estándar, mientras que para las que no presentaron distribución normal se empleó la mediana y los percentiles 25 y 75 (P25 – P75). Para las variables cualitativas se utilizó la frecuencia absoluta y relativa en porcentajes.

5.5.2. Estudio de asociación

A continuación se ha estudiado la existencia de asociación entre las variables clínico-patológicas y las variables inmunohistoquímicas a estudio (PD-L1 y Ki-67). En el caso de la correlación entre variables cualitativas se midió la asociación mediante la prueba del Chi cuadrado (para variables cualitativas con número de categorías diferentes) o la prueba exacta de Fisher en caso de datos reducidos en las Tablas de contingencia (para variables cualitativas categóricas 2x2). Para cuantificar la magnitud de la asociación se ha calculado la Odds Ratio (OR) con sus intervalos de confianza al 95% (IC95%). En el caso de las correlaciones entre variables cualitativas y cuantitativas se midió la asociación mediante la prueba T-Student o de la U de Mann-Whitney según si la variable ha seguido una distribución paramétrica o no, y la prueba ANOVA o H de Kruskal-Wallis si la variable cualitativa tenía más de dos categorías para pruebas paramétricas o no paramétricas respectivamente. En el caso de la correlación entre variables cuantitativas se utilizó la correlación bivariada de Pearson si las variables presentaran una distribución normal o paramétrica, y el contraste Rho de Spearman si la distribución fuera no paramétrica y/o las variables estudiadas son ordinales.

5.5.3. Estudio de supervivencia

Para el análisis univariante de supervivencia se aplicó el método Kaplan-Meier. El cociente de riesgos instantáneos ("Hazard ratio") y el intervalo de confianza (95%) se obtuvo mediante el análisis de regresión de Cox. Las curvas de supervivencia se compararon con la prueba de rangos logarítmicos (Log rank). Para el análisis multivariante se aplicó el modelo de regresión de Cox con las variables que presentaron en el análisis univariante una $p < 0,2$.

Para el contraste de las hipótesis descritas anteriormente se utilizó como valor de significación una $p < 0,05$.

El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico IBM-SPSS para Windows v23.

5.6. MEDIOS Y FINANCIACIÓN

El grupo de estudio de tumores pulmonares del HGUA forma parte del Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL) y ha recibido financiación de la Fundación para la Investigación Biomédica del HGUA (posteriormente adscrita a Fisabio y actualmente parte de ISABIAL) dentro del proyecto UGP-14-301 “Uso de fosfohistona H3 como marcador específico de mitosis en cáncer de pulmón” (Tabla 10). Los casos analizados en este estudio constituyen parte de la colección de tumores pulmonares del grupo de estudio de cáncer de pulmón del HGUA.

Este trabajo ha sido en parte financiado por el proyecto UGP-14-301. La determinación incluida específicamente para esta tesis doctoral (PD-L1) requirió un corte de tejido parafinado de los TMAs disponibles del proyecto previo. El coste de la realización de esta tinción inmunohistoquímica ha sido financiado por la Bolsa de Anatomía Patológica, así como los gastos de gestión del Biobanco (Tabla 12).

Tabla 12. Gastos asociados al proyecto.

<i>Descripción del gasto</i>	Importe bruto
Gastos derivados del proyecto UGP-14-301 “Uso de fosfohistona H3 como marcador específico de mitosis en cáncer de pulmón”	1235,41 €
Prestación de Servicios de Anatomía Patológica para tinción inmunohistoquímica de PD-L1 de 9 TMAs	236,78 €
Material fungible:	
Anticuerpos (22C3 Dako)	Donación
Sistema de detección (EnVision Flex, Dako)	Donación
Gastos gestión Biobanco (9 cortes 5 micras)	27 €
Gastos por análisis estadístico	190€
Total	1689,19 €

*TEAP: Técnico de Anatomía Patológica; TMA's: Tissue microarrays

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

El análisis inmunohistoquímico se realizó en el seno del Servicio de Patología del HGUA, que dispone del equipamiento e infraestructura necesaria: *Tissue microarray*, microtomos, inmunoteñidores automáticos, equipos de microscopía multiobservación y digitalización de imagen.

5.7. ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto de investigación ha sido valorado y autorizado por el Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL) en el Hospital General Universitario de Alicante. La investigación se ha llevado a cabo bajo el compromiso del cumplimiento de las normas éticas de investigación y de los requerimientos legales imprescindibles para poder realizar este tipo de estudios. Asimismo se ha respetado en todo momento la normativa vigente que garantiza la confidencialidad de los datos de carácter personal y su tratamiento automatizado de acuerdo a la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/99, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal), el Real Decreto 944/1999, de 11 de junio, por el que se aprueba el Reglamento de medidas de seguridad de los ficheros automatizados que contengan datos de carácter personal, así como toda la normativa aplicable a esta materia. Se ha tenido especial cuidado en el cumplimiento de los siguientes aspectos éticos: confidencialidad de los datos obtenidos en el estudio; almacenaje y mantenimiento de los datos recogidos, debidamente disociados, en lugar seguro impidiendo que ninguna otra persona vinculada a la investigación pueda hacer uso de los mismos e inocuidad de los resultados del estudio para todos los pacientes incluidos en la investigación.

Además, cabe resaltar que se trata de un estudio observacional retrospectivo en el que no se ha llevado a cabo ninguna intervención sobre los pacientes, habiéndose empleado muestras de los tumores conservadas en el Biobanco del Hospital General Universitario de Alicante.



6. RESULTADOS

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

6.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

6.1.1. Variables clínico-patológicas

La tabla 13 muestra las principales características clínico-patológicas de los 170 pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 13. Características clínico-patológicas de los 170 pacientes incluidos en el estudio.

Variable	Descripción
Edad (años); mediana (P25-P75)	66.5 (60.75-73.25)
<65 (N,%)	67 (39.5)
65-74 (N,%)	64 (37.6)
≥75 (N,%)	39 (22.9)
Sexo; N(%)	
Hombre	135 (70.4)
Mujer	35 (20.6)
Tabaquismo; N(%)	150 (88.2)
Hábito tabáquico (a/paq); mediana (P25-P75)	49 (35 – 60)
5-15 a/paq; N(%)	10 (5.8)
16-30 a/paq; N(%)	21 (12.4)
>30 a/paq; N(%)	119 (70)
Lado; N(%)	
Derecho	81 (47.6)
Izquierdo	89 (52.4)
Lóbulo; N(%)	
LSD	52 (30.6)
LM	11 (6.5)
LID	20 (11.8)
LSI	54 (31.8)
LII	33 (19.4)
Tipo de resección; N(%)	
Lobectomía	138 (81.2)

Bilobectomía	7 (4.1)
Segmentectomía anatómica	6 (3.5)
Neumonectomía	11 (6.5)
Resección en cuña (wedge)	8 (4.7)
Tipo histológico; N(%)	
Adenocarcinoma	96 (56.5)
Carcinoma escamoso	58 (34.1)
Carcinoma de célula grande	12 (7.1)
Adenoescamoso	4 (2.4)
Tamaño (cm); mediana (P25 – P75)	3.05 (2.00 – 4.72)
Grado nuclear; N(%)	
1 - bajo	28 (16.5)
2 - intermedio	78 (45.9)
3 - alto	64 (37.6)
Grado histológico; N(%) (adenocarcinoma)	
1 - lepidico	18 (10.6)
2 - acinar, papilar	43 (25.3)
3 – sólido, micropapilar	35 (20.6)
Invasión pleura visceral; N(%)	30 (17.6)
Ganglios totales (n); mediana (P25-P75)	8 (5 - 13)
Estadio TNM; N(%)	
IA	86 (50.6)
IB	53 (31.2)
IIA	30 (17.6)
IIB	1 (0.6)
Tiempo de seguimiento (meses); mediana [rango]	64.2 [0.8-163.4]

P25: percentil 25; P75: percentil 75; a/paq: años/paquete; LSD: lóbulo superior derecho; LM: lóbulo medio; LID: lóbulo inferior derecho; LSI: lóbulo superior izquierdo; LII: lóbulo inferior izquierdo.

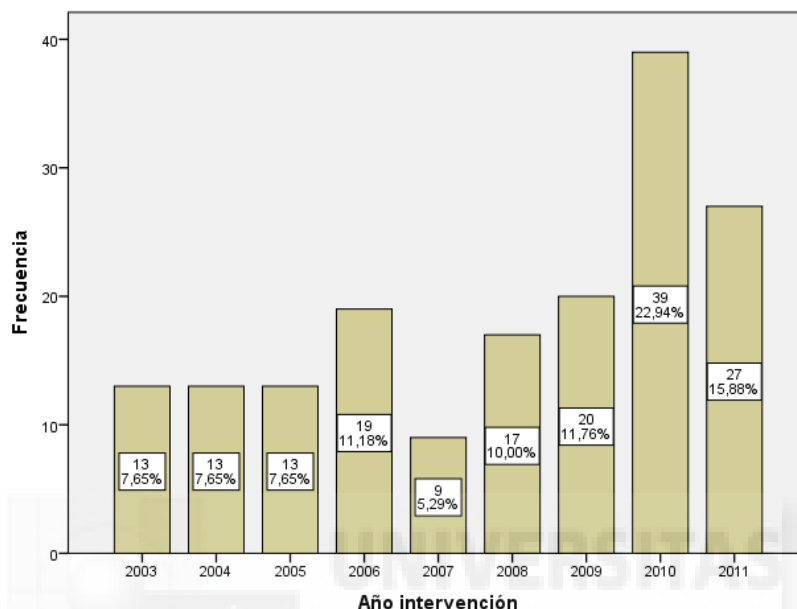
Se incluyeron pacientes intervenidos desde el 1 de enero de 2003 hasta el 31 de diciembre de 2011, con una media de 18.9 casos por año (IC95% 11.81 – 25.95), y un

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

mínimo de 9 casos en 2007 y un máximo de 39 casos en 2010, con una tendencia creciente en el número anual de casos (Figura 18).

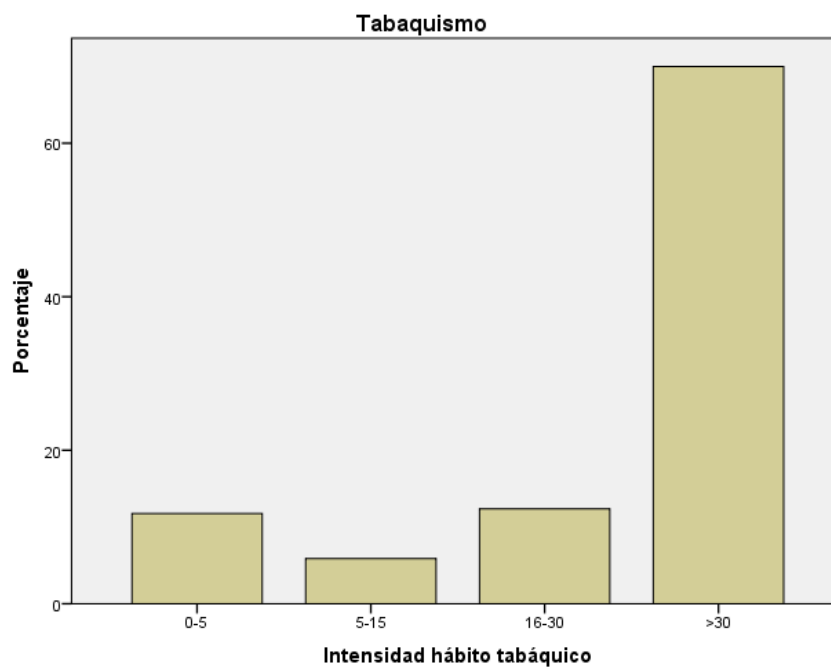
Figura 18. Distribución de los casos por año de la intervención.



La mediana de edad ha sido de 66 años, con una edad mínima de 44 años y una edad máxima de 85 años. El 39.4% de los pacientes fueron menores de 65 años, el 37.6% tenían una edad entre 65 y 74 años, y el 22.9% tenían 75 o más años. El 70.4% de los pacientes eran de sexo masculino (Tabla 13).

En relación al hábito tabáquico, 150 pacientes presentaban antecedente tabáquico (88.2%), siendo un 70% de los pacientes de la muestra fumador severo (>30 años/paquete), un 12.4% fumadores moderados (15-30 años/paquete) y un 5.9% fumadores leves (5-15 años/paquete)(Figura 19). La mediana de intensidad del hábito tabáquico de los fumadores o exfumadores fue de 49 años/paquete (P25-P75: 35-60 años/paquete)(Tabla 13).

Figura 19. Intensidad del hábito tabáquico.



El 52.4% de los casos estaban localizados en el pulmón izquierdo. Se observó predominio de ambos lóbulos superiores (LSD 30.6% y LSI 31.8%)(Figura 20).

El tipo de resección predominante fue la lobectomía en el 81.2% de los casos, con un 4.1% de bilobectomías, 3.5% de segmentectomías anatómicas, 6.5% de neumonectomías y un 4.7% de resecciones en cuña (wedge) (Figura 21).

Figura 20. Distribución de los casos por lóbulo donde se localizaba el tumor.

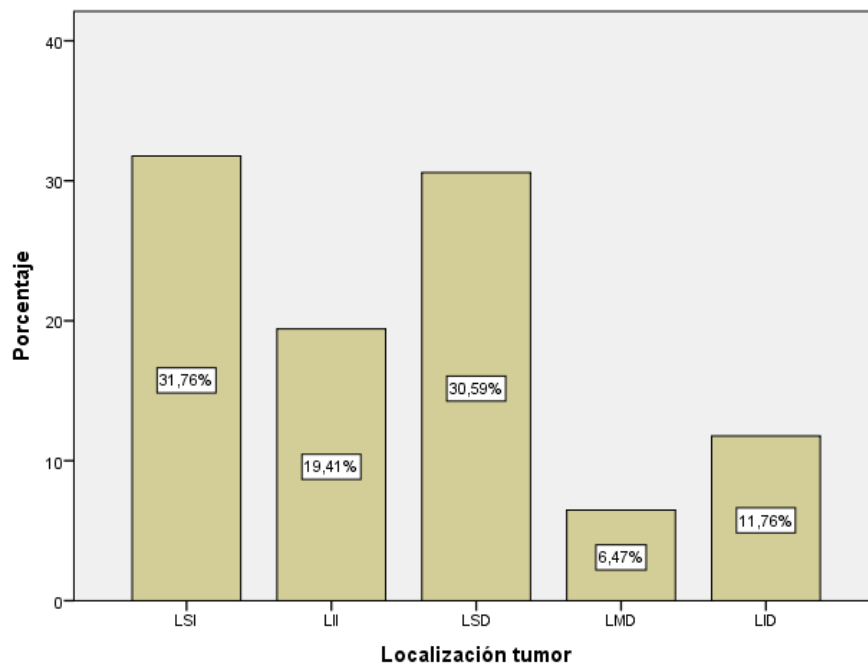
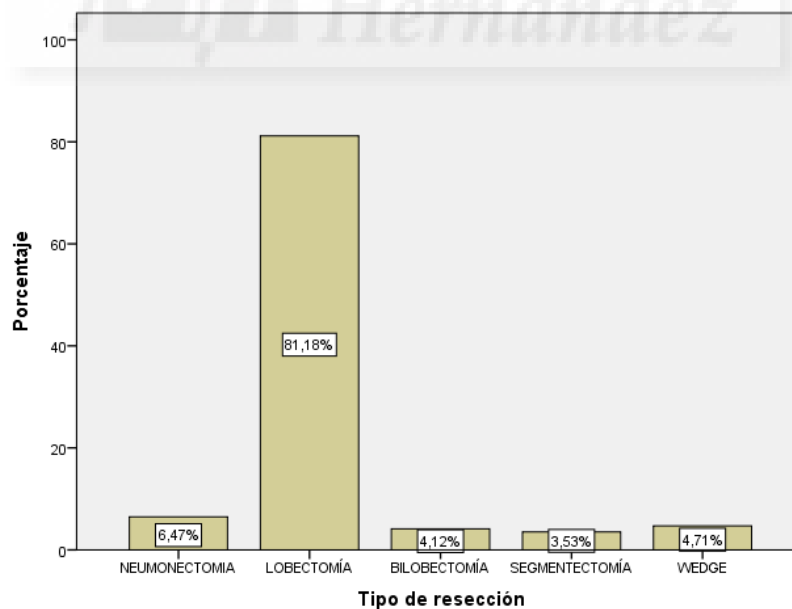


Figura 21. Tipo de resección realizada.

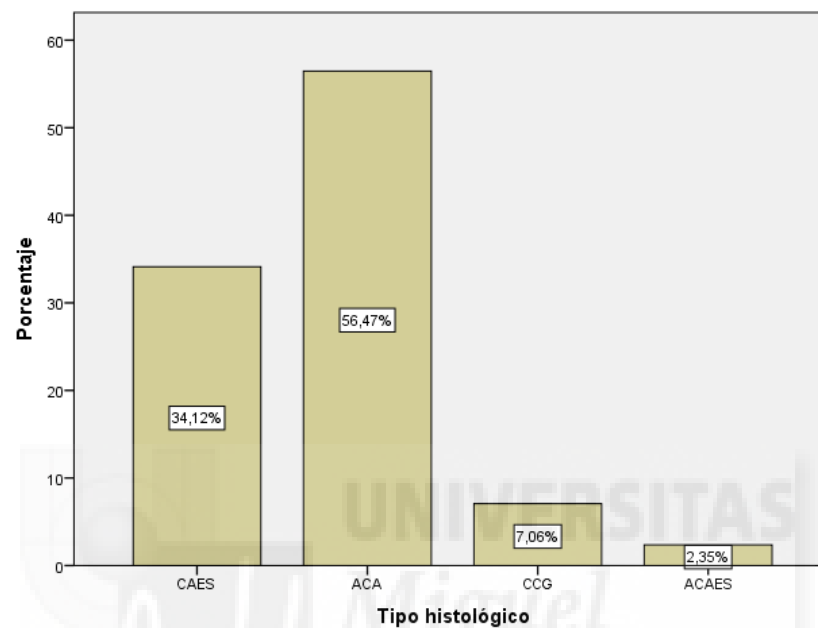


ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

El tipo histológico más frecuente ha sido el adenocarcinoma con 96 casos (56.5%), seguido del carcinoma escamoso con 58 casos (34.1%), carcinoma de célula grande con 12 casos (7.1%) y carcinoma adenoescamoso con 4 casos (2.4%) (Figura 22).

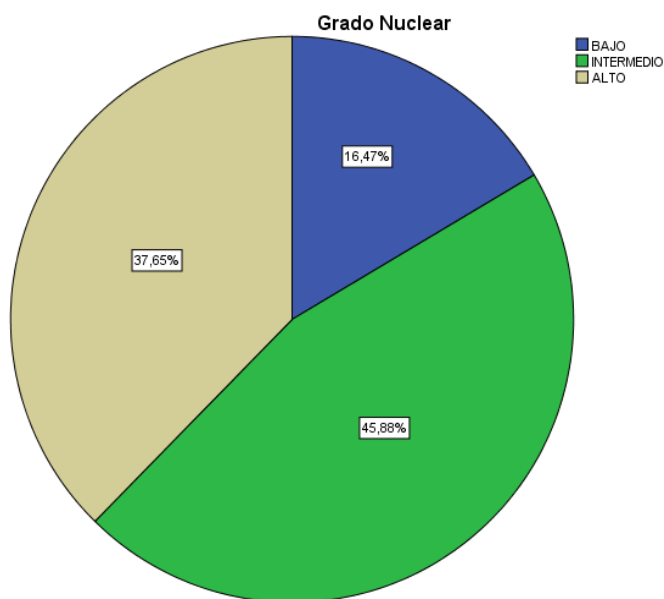
Figura 22. Distribución por tipo histológico.



La mediana de tamaño tumoral fue de 3.05 cm (P25-P75: 2.00 – 4.72), con un tamaño mínimo de 0.9 cm y un tamaño máximo de 10 cm (Tabla 13).

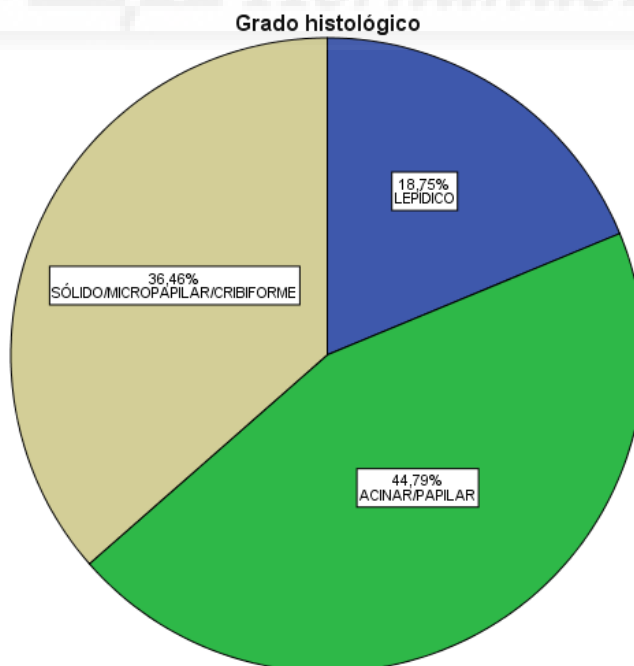
Existió predominancia de grados nucleares intermedios (78 casos, 45.9%) y altos (64 casos, 37.6%) sobre los grados nucleares bajos (28 casos, 16.5%)(Figura 23).

Figura 23. Distribución por grado nuclear.



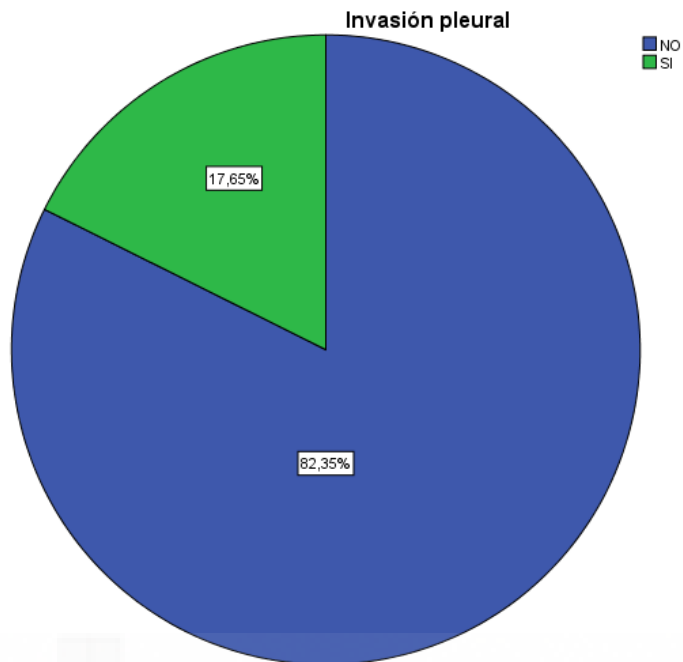
El grado histológico predominante de entre los tipos adenocarcinoma fue el grado 2 (acinar, papilar) y el grado 3 (sólido, micropapilar) con 43 casos (44.8%) y 35 casos (33.5%) respectivamente (Figura 24).

Figura 24. Distribución de los casos de adenocarcinoma por grado histológico.



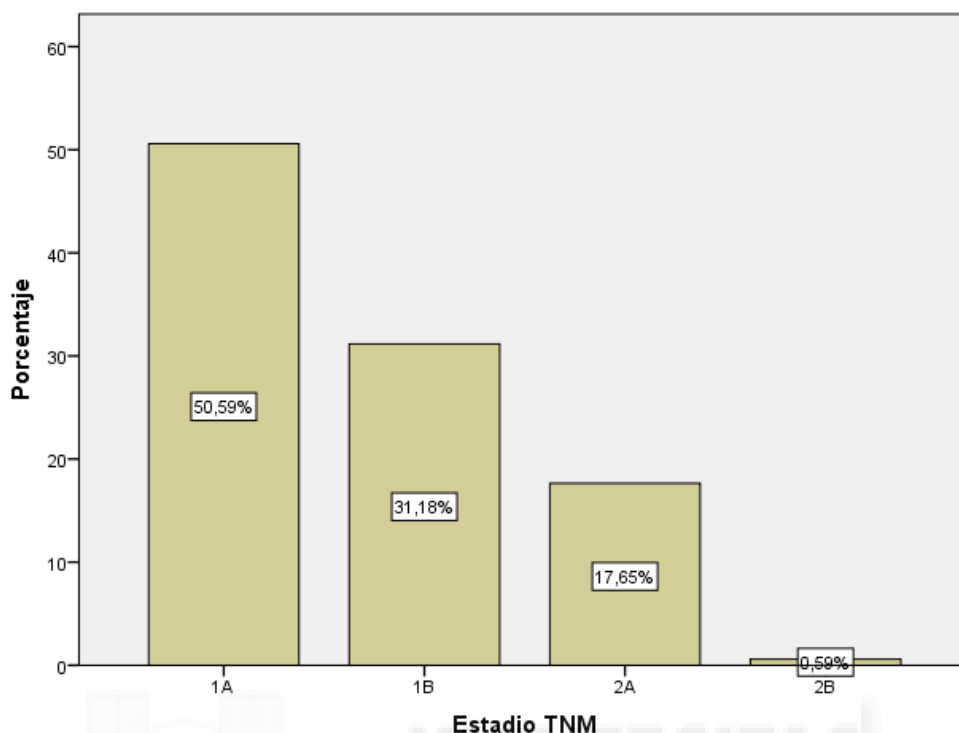
Treinta casos presentaron invasión de pleura visceral (17.6%)(Figura 25).

Figura 25. Distribución de los casos por invasión pleural.



Existió un predominio de estadios I (IA 50.6%, IB 31.2%) respecto a los estadios II (IIA 17.6%, IIB 0.6%) (Figura 26).

Figura 26. Distribución por estadios TNM.



La mediana de ganglios resecaos durante la linfadenectomía fue de 8 (P25-P75: 5-13)(Tabla 13).

6.1.2. Variables inmunohistoquímicas

La actividad proliferativa medida según Ki67 pudo ser evaluada en 149 casos de los 170 pacientes del estudio (87.6%), con un valor mediana del 30% (P25-P75 16-38). Los 21 casos no valorables fueron debidos a la pérdida de inmunorreactividad en los casos más antiguos debido a una peor preservación temporal antigénica del tejido incluido en parafina para este marcador. En la tabla 14 se describe la distribución de casos positivos y negativos en función de los distintos puntos de corte empleados.

Tabla 14. Actividad proliferativa medida según Ki67.

Variable	N (%)
Ki-67; N(%)	
No valorables	21 (12.4)
Valorables	149 (87.6)
Ki67(%); mediana (P25-P75)	30 (16 - 38)
Ki67 ≥5% N(%)	141 (82.9)
Ki67 ≥10% N(%)	127 (74.7)
Ki67 ≥20% N(%)	103 (60.6)
Ki67 ≥25% N(%)	88 (51.8)
Ki67 ≥30% N(%)	76 (44.7)
Ki67 ≥40% N(%)	32 (18.8)

P25: percentil 25; P75: percentil 75.

En relación a la valoración de la expresión de PD-L1 en células tumorales, ésta pudo ser evaluada en 165 casos (97.1%), de los cuales 49 expresaron PD-L1 (28.8%), con un valor mediana de 30% (P25-P75 6.75-72.5). Si consideramos positivo cualquier resultado con al menos el 1% de las células tumorales expresando el marcador, obtenemos un 26.5% de resultados positivos. Si el punto de corte es al menos el 5% de las células tumorales, un 24.7% serían resultados positivos, mientras que si el punto de corte lo elevamos al 50% de las células tumorales para discriminar aquellos tumores con elevada expresión de PD-L1, obtendríamos un 11.8% de resultados positivos. En la tabla 15 se detalla la distribución de los pacientes en función de los puntos de corte.

De entre los adenocarcinomas, 19 casos expresaron PD-L1 (19.8%), con un valor medio de $46.18 \pm 32.94\%$ de las células tumorales. Entre los carcinomas escamosos, 24 casos expresaron PD-L1 (41.3%), con un valor medio de $28.94 \pm 31.90\%$ de las células tumorales.

Tabla 15. Expresión de PD-L1 en células tumorales.

Variable	N (%)
PD-L1; N(%)	
No valorables	5 (2.9)
Expresión negativa	116 (68.2)
Expresión positiva	49 (28.8)
PD-L1 (%); mediana (P25-P75)	30 (6.75 – 72.5)
Adenocarcinomas	
N(%)	19 (19.8)
Media (desviación estándar)(%)	46.18 (32.94)
Carcinomas escamosos	
N(%)	24 (41.3)
Media (desviación estándar)(%)	28.94 (31.90)
PD-L1 cualquier % N(%)	49 (28.8)
PD-L1 $\geq 1\%$ N(%)	45 (26.5)
PD-L1 $\geq 5\%$ N(%)	42 (24.7)
PD-L1 $\geq 50\%$ N(%)	20 (11.8)

P25: percentil 25; P75: percentil 75.

6.1.3. Variables de resultado

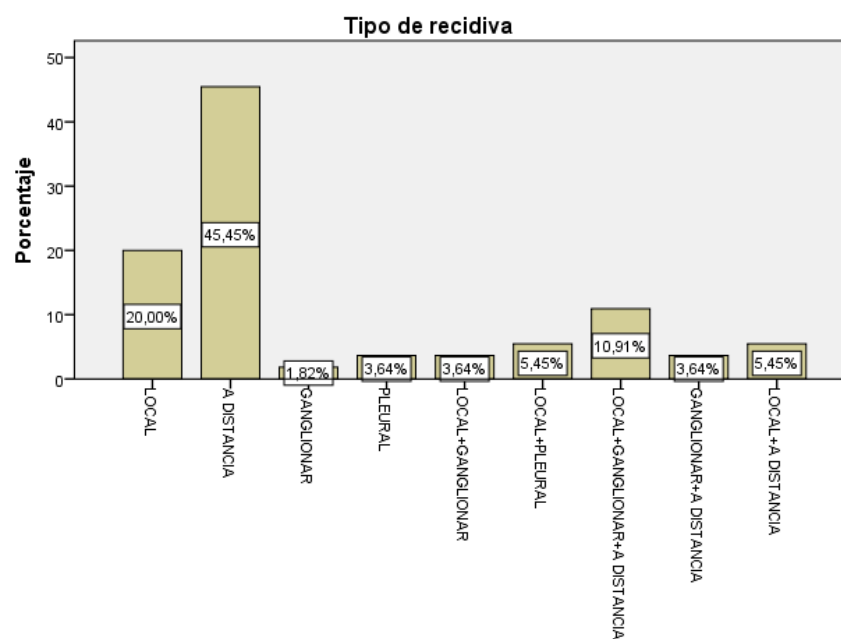
La mediana de seguimiento de los pacientes fue de 64.2 meses, siendo el seguimiento mínimo de 1 mes y el seguimiento máximo de 163.4 meses.

En relación a las variables de resultado, un 32.4% de los pacientes de la muestra presentaron recaída dentro del periodo de seguimiento, siendo el patrón más frecuente la recaída a distancia aislada en 25 casos (45.5% de los casos con recaída), seguido de la recaída local aislada en 11 casos (20% de los casos con recaída) (Tabla 16, Figura 27).

Tabla 16. Descripción de las variables de resultado en los 170 pacientes del estudio.

Variable	N (%)
Recaída; N(%)	55 (32.4)
Tipo de recaída; N(%)	
Local	11 (20)
A distancia	25 (45.5)
Ganglionar	1 (1.8)
Pleural	2 (3.6)
Local + ganglionar	2 (3.6)
Local + pleural	3 (5.5)
Local + a distancia	3 (5.5)
Local + ganglionar + a distancia	6 (10.9)
Ganglionar + a distancia	2 (3.6)

Figura 27. Patrones de recaída.



ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

La Tabla 17 muestra los datos relativos a la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG).

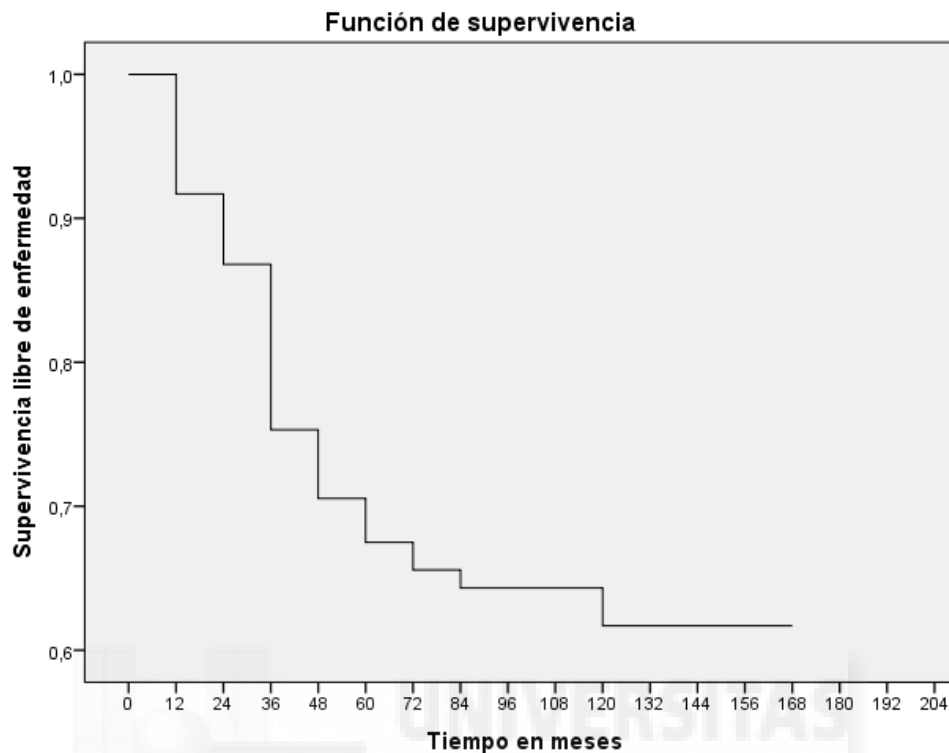
Tabla 17. Datos relativos a supervivencia libre de enfermedad y global.

Variable	N (%)
Tiempo de seguimiento (meses); mediana (rango)	64.2 (1 – 163.4)
Exitus; N(%)	75 (44.1)
Supervivencia libre de enfermedad (meses); mediana (P25-P75)	59.6 (27.03 – 85.38)
SLE a 2 años; N(%)	139 (87)
SLE a 5 años; N(%)	82 (67)
Supervivencia global (meses); mediana (P25-P75)	64.2 (39.96 – 94.96)
SG a 2 años; N(%)	146 (86)
SG a 5 años; N(%)	98 (67)

P25: percentil 25; P75: percentil 75; SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global.

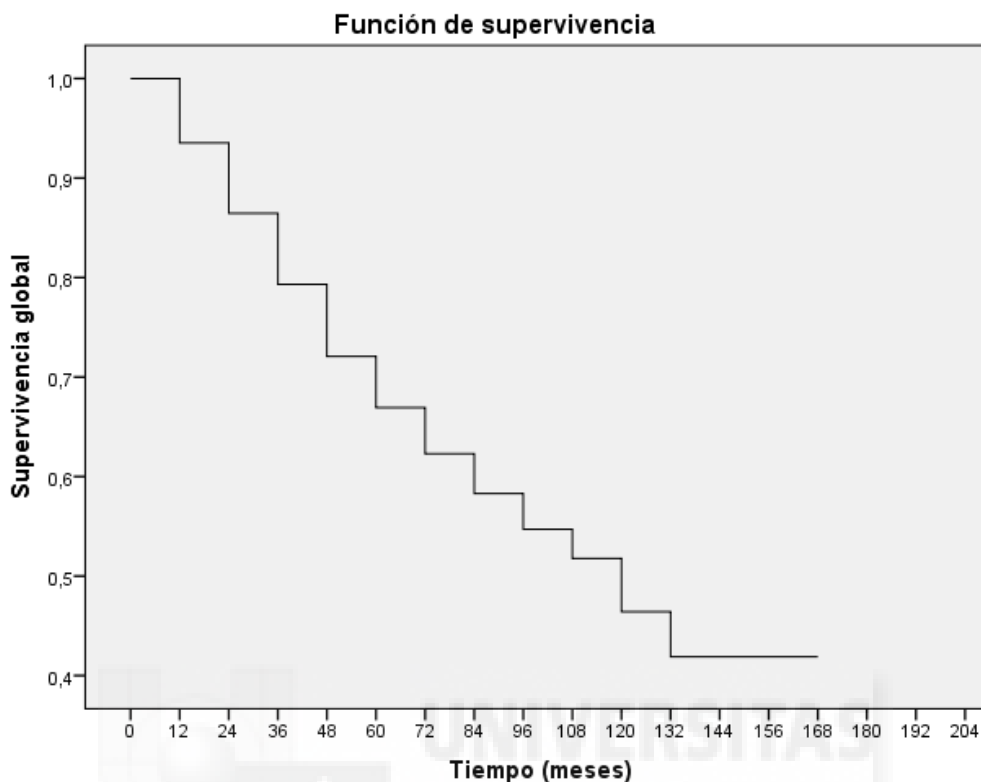
La SLE mediana fue de 59.6 meses (P25-P75: 27.03-85.38), con una SLE del 87% y del 67% a 2 y 5 años respectivamente (Figura 28). La SLE de los estadios IA a 2 y 5 años fue del 92% y 68% respectivamente. La SLE de los estadios IB a 2 y 5 años fue del 81% y 64% respectivamente. La SLE de los estadios IIA a 2 y 5 años fue del 86% y 78% respectivamente. Tan sólo hubo un caso en estadio IIB que presentó recidiva a los 14 meses.

Figura 28. Curva Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad.



Al finalizar el periodo de seguimiento del estudio, un 44.1% de los pacientes habían fallecido, con una SG mediana de 64.2 meses (P25-P75: 39.9 – 94.9). La SG fue del 86% y del 67% a 2 y 5 años respectivamente (Figura 29). La SG a 2 y 5 años de los estadios IA fue de 93% y 70% respectivamente. La SG a 2 y 5 años de los estadios IB fue de 85% y 65% respectivamente. La SG a 2 y 5 años de los estadios IIA fue de 73% y 63% respectivamente. Tan sólo hubo un caso en estadio IIB que falleció antes de los 2 años.

Figura 29. Curva Kaplan-Meier de supervivencia global.



6.2. RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

6.2.1. Relación de Ki-67 con variables clínico-patológicas

Se ha llevado a cabo el estudio de asociación entre las variables clínico-patológicas y la variable inmunohistoquímica Ki-67 utilizando las pruebas estadísticas referidas en la metodología.

Los hombres han presentado niveles mayores de expresión de Ki-67 que las mujeres (31.60 ± 18.09 vs. 20.73 ± 12.35) alcanzando la significación estadística ($p=0.001$), con un tamaño del efecto de $r=0.26$.

Los fumadores han presentado mayor expresión de Ki-67 (31.29 ± 17.32 vs. 14.84 ± 11.53), con un tamaño del efecto de $r=0.31$ y alcanzando también la

significación estadística ($p=0.000$). Agrupando el tabaquismo en categorías (no fumador, leves 5-15 años/paq, moderados 16-30 años/paq, severos >30 años/paq) observamos una media de Ki-67 que se incrementa progresivamente con el incremento en el hábito tabáquico (Tabla 18), siendo las únicas comparaciones que no alcanzan la significación entre los no fumadores y fumadores leves ($p=1.00$), y entre fumadores leves y moderados ($p=0.86$).

Tabla 18. Expresión de Ki-67 según categoría de hábito tabáquico.

Tabaquismo	N	Media	Desviación estándar
No fumador	19	14,84	11,534
5-15 años/paq	12	19,08	9,774
16-30 años/paq	46	26,65	15,584
>30 años/paq	72	36,29	17,660
Total	149	29,19	17,549

El tipo histológico también se ha asociado a diferencias en la expresión de Ki-67 con un tamaño del efecto de $r=0.248$, observando que los adenocarcinomas presentan una expresión menor de Ki-67 que los carcinomas escamosos y los de célula grande (21.35 ± 15.09 adenocarcinomas vs. 39.35 ± 15.22 carcinoma escamoso, $p=0.000$; 21.35 ± 15.09 adenocarcinomas vs. 38.17 ± 14.35 carcinoma célula grande, $p=0.003$). (Tabla 19).

Tabla 19. Expresión de Ki-67 según tipo histológico.

Tipo Histológico	N	Media	Desviación estándar
Carcinoma escamoso	52	39,35	15,224
Adenocarcinoma	81	21,35	15,097
Carcinoma célula grande	12	38,17	14,352
Adenoescamoso	4	29,25	25,474
Total	149	29,19	17,549

En relación al grado nuclear, se ha observado diferencias en la expresión de Ki-67 entre los grados bajos y los moderados (11.25 ± 9.79 vs. 29.90 ± 16.08 , $p=0.000$), y entre

los grados bajos y altos (11.25 ± 9.79 vs 35.91 ± 16.74 , $p=0.000$), con un tamaño del efecto de $r=0.227$.

El grado histológico en los adenocarcinomas también ha mostrado diferencias entre las distintas categorías, con una mayor expresión de Ki-67 que se incrementa progresivamente con el incremento del grado histológico, alcanzando todas las comparaciones entre grupos la significación estadística. (Tabla 20).

Tabla 20. Expresión de Ki-67 según grado histológico en los adenocarcinomas.

Grado Histológico	N	Media	Desviación estándar
LEPÍDICO	15	8,20	5,882
ACINAR/PAPILAR	37	18,41	12,148
SÓLIDO/MICROPAPILAR/CRIBIFORME	28	31,79	15,259
Total	80	21,18	15,114

En otras variables como la edad ($p=0.190$), el estadio TNM ($p=0.071$), la invasión pleural ($p=0.501$) o la expresión de PD-L1 ($p=0.955$) no se ha observado correlación estadísticamente significativa con la expresión de Ki-67.

6.2.2. Relación de PD-L1 con variables clínico-patológicas

Se ha llevado a cabo el estudio de asociación entre las variables clínico-patológicas y la variable inmunohistoquímica PD-L1 utilizando las pruebas estadísticas referidas en la metodología.

Se ha observado una correlación inversa con la edad, con menor expresión de PD-L1 a mayor edad ($p=0.033$).

En relación al hábito tabáquico, no se ha observado correlación estadísticamente significativa entre fumar y la expresión de PD-L1 (no fumador 20 ± 30.31 vs. fumador 42 ± 34.39 ; $p=0.286$), si bien se ha podido observar una tendencia a menor expresión de PD-L1 cuanto mayor hábito tabáquico, sin alcanzar tampoco esta tendencia la significación estadística ($p=0.186$)(Tabla 21).

Tabla 21. Expresión de PD-L1 según categoría de hábito tabáquico.

Tabaquismo	N	Media	Desviación estándar
5-15 años/paq	3	78,333	29,2973
16-30 años/paq	5	42,100	42,6855
>30 años/paq	38	39,118	32,8581
Total	46	42,000	34,3925

El tipo histológico se ha asociado a diferencias en la expresión de PD-L1, observando que los adenoescamosos presentan una mayor expresión de PD-L1, seguidos de los carcinomas de célula grande, seguidos de los adenocarcinomas, y finalmente los carcinomas escamosos que presentaron menor expresión de PD-L1 (Tabla 22), alcanzando estas diferencias la significación estadística ($p=0.029$).

Tabla 22. Expresión de PD-L1 según tipo histológico.

Tipo histológico	N	Media	Desviación estándar
CAES	24	28,938	31,9008
ACA	19	46,184	32,9390
CCG	5	64,000	29,0259
ACAES	1	100,000	
Total	49	40,653	34,2870

CAES: carcinoma escamoso; ACA: adenocarcinoma; CCG: carcinoma célula grande; ACAES: carcinoma adenoescamoso

Si se divide el tipo histológico en dos categorías (carcinomas escamosos y carcinomas no escamosos), también se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0.017$), con una menor expresión de PD-L1 en los carcinomas escamosos (28.93 ± 31.90) que en los carcinomas no escamosos (51.90 ± 33.27), con un tamaño del efecto de $r=0.34$.

No se ha observado correlación entre la expresión de PD-L1 y otras variables como el sexo ($p=0.078$), el estadio TNM ($p=0.851$, Tabla 23), la invasión pleural ($p=0.381$), el grado nuclear ($p=0.457$, Tabla 24), el grado histológico en los adenocarcinomas ($p=0.291$, Tabla 25) o la expresión de Ki-67 ($p=0.955$).

Tabla 23. Expresión de PD-L1 según estadio TNM.

Estadio TNM	N	Media	Desviación estándar
1A	26	39,904	34,7802
1B	15	36,900	34,2601
2A	7	50,857	38,2554
2B	1	45,000	
Total	49	40,653	34,2870

Tabla 24. Expresión de PD-L1 según grado nuclear.

Grado Nuclear	N	Media	Desviación estándar
BAJO	3	21,667	20,2073
INTERMEDIO	20	37,325	32,0757
ALTO	26	45,404	36,9724
Total	49	40,653	34,2870

Tabla 25. Expresión de PD-L1 en adenocarcinoma según grado histológico.

Grado Histológico	N	Media	Desviación estándar
LEPÍDICO	1	55,000	
ACINAR/PAPILAR	6	28,333	36,3547
SÓLIDO/MICROPAPILAR/CRIBIFORME	12	54,375	30,3413
Total	19	46,184	32,9390

6.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

6.3.1. Análisis univariante de supervivencia

Se ha llevado a cabo un análisis univariante de supervivencia (libre de enfermedad y global) mediante el método Kaplan-Meier para determinar qué variables se correlacionaron con el pronóstico (Tabla 26 y 27).

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

De entre las variables clínicas y morfológicas clásicas, el estadio patológico TNM fue la única con valor pronóstico estadísticamente significativo en el análisis univariante tanto para SLE como para SG. En términos de SLE, los estadios 1A (116.43 ± 7.26 meses) y 2A (121.1 ± 10.1 meses) mostraron mejores resultados que los 1B (99.11 ± 9.11 meses) y los 2B (14.06 ± 0.00 meses), siendo esta diferencia a nivel global estadísticamente significativa ($p=0.021$), si bien tan sólo la comparación del estadio 2B respecto al control (1A) alcanzó la significación estadística ($p=0.025$) (Figura 30). En términos de SG, se observó una relación inversamente proporcional entre estadio TNM patológico y supervivencia global (1A 105.67 ± 7.1 ; 1B 95.03 ± 8.14 ; 2A 93.7 ± 11.6 ; 2B 19.15 ± 0.00 ; $p=0.041$), siendo esta relación estadísticamente significativa, si bien tan sólo la comparación del estadio 2B respecto al control (1A) alcanzó la significación ($p=0.021$) (Figura 31). Realizando un análisis por categorías entre los tumores T1 y los T2, se observó una tendencia a una mayor SLE y SG en los T1 (116.43 vs. 107.08 meses; 105.68 vs. 94.18 meses, respectivamente), si bien esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0.791$ y 0.445 respectivamente).

Entre las variables que se correlacionaron con la SLE aunque sin alcanzar la significación estadística, destacan el sexo (112.23 meses en hombres vs. 103.43 meses en mujeres, $p=0.342$), tabaquismo (113.36 meses en fumadores vs. 86.63 meses en no fumadores, $p=0.062$), tipo de resección (116.43 meses en no-neumonectomía vs. 83.79 meses en neumonectomías, $p=0.266$), invasión pleural (115.12 meses en ausencia de invasión pleural vs. 102.99 meses en presencia de invasión pleural, $p=0.770$), tipo histológico (116.84 meses en escamosos vs. 111.04 en no escamosos, $p=0.314$) y grado nuclear (119.55 meses en GN 2 vs. 103.93 meses en GN 3 vs. 72.19 meses en GN 1, $p=0.472$). De entre los adenocarcinomas, los grados histológicos 2 (acinar/papilar) se correlacionaron con una mejor SLE (117.07 meses, vs. 97.24 meses en sólidos/micropapilares, y 74.29 meses en lepidicos, $p=0.697$). Si agrupamos los grados histológicos de los casos de adenocarcinoma, en grados 1 y 2 por un lado (lepidicos/acinares/papilares), y grados 3 por otro (sólidos/micropapilares), se observó una mejor SLE en los grados iniciales (113.74 meses vs. 96.07 meses), aunque esta diferencia no alcanzó la significación estadística ($p=0.407$) (Tabla 26).

En el caso de la SG, las variables que correlacionaron con el pronóstico aunque sin alcanzar la significación estadística, destacan el sexo (115.55 meses en mujeres vs. 96.24 meses en hombres, $p=0.323$), tabaquismo (119.56 meses en no fumadores

vs. 96.73 meses en fumadores, $p=0.286$), tipo de resección (102.32 meses en no neumonectomía vs. 73.91 meses en neumonectomías, $p=0.585$), tipo histológico (102.59 meses en no escamosos vs. 100.04 meses en escamosos, $p=0.903$) y grado nuclear (105.88 meses en GN 2 vs. 97.53 meses en GN 3 vs. 78.89 meses en GN 1, $p=0.594$). De entre los adenocarcinomas, los grados histológicos 2 (acinar/papilar) se correlacionaron con una mejor SLE (112.22 meses, vs. 97.78 meses en lepidicos, y 82.94 meses en sólidos/micropapilares, $p=0.145$). Si agrupamos los grados histológicos de los casos de adenocarcinoma, en grados 1 y 2 por un lado (lepidicos/acinares/papilares), y grados 3 por otro (sólidos/micropapilares), se observó una mejor SG en los grados iniciales (112.33 meses vs. 84.31 meses), siendo esta diferencia muy cercana a la significación estadística ($p=0.068$)(Tabla 27).

Tabla 26: Análisis univariante supervivencia libre de enfermedad.

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
Sexo			0.902		0.342
Mujer	35	1		1	
Hombre	135	0.746		0.406-1.369	
Tabaquismo			3.492		0.062
No fumador	20	1		1	
Fumador	150	0.537		0.277-1.042	
Tabaquismo (a/paq)			1.506		0.471
5-15	10	1		1	
16-30	21	1.016		0.186-5.551	0.986
>30	119	1.722		0.415-7.146	0.454
Tipo de resección *			1.236		0.266
No neumonectomía	159	1		1	
Neumonectomía	11	1.680		0.666-4.233	
Invasión pleural			0.085		0.770
No	140	1		1	
Si	30	1.104		0.569-2.142	

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

Tipo histológico				2.372		0.499
Escamoso	58	1		1		
Adenocarcinoma	96	1.377		0.759-2.496		0.292
CCG	12	0.881		0.257-3.025		0.841
Adenoescamoso	4	2.387		0.548-10.398		0.246
Grado nuclear				1.501		0.472
Bajo	28	1		1		
Intermedio	78	0.661		0.320-1.366		0.264
Alto	64	0.867		0.419-1.794		0.700
Grado histológico				0.722		0.697
1	18	1		1		
2	43	0.820		0.331-2.033		0.668
3	35	1.134		0.452-2.843		0.789
TNM (7ª Ed.)				9.765		0.021
1A	86	1		1		
1B	53	1.309		0.737-2.324		0.359
2A	30	0.674		0.279-1.630		0.381
2B	1	10.357		1.350-79.424		0.025

SLE: supervivencia libre de enfermedad; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%; a/paq: años/paquete; CCG: carcinoma célula grande.

Figura 30: Supervivencia libre de enfermedad por estadios.

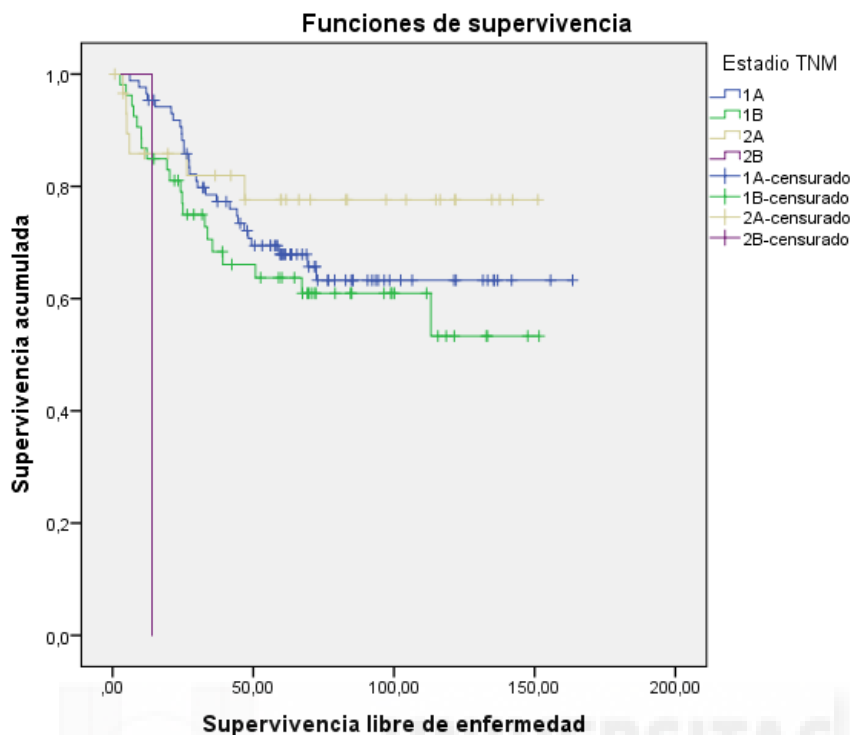
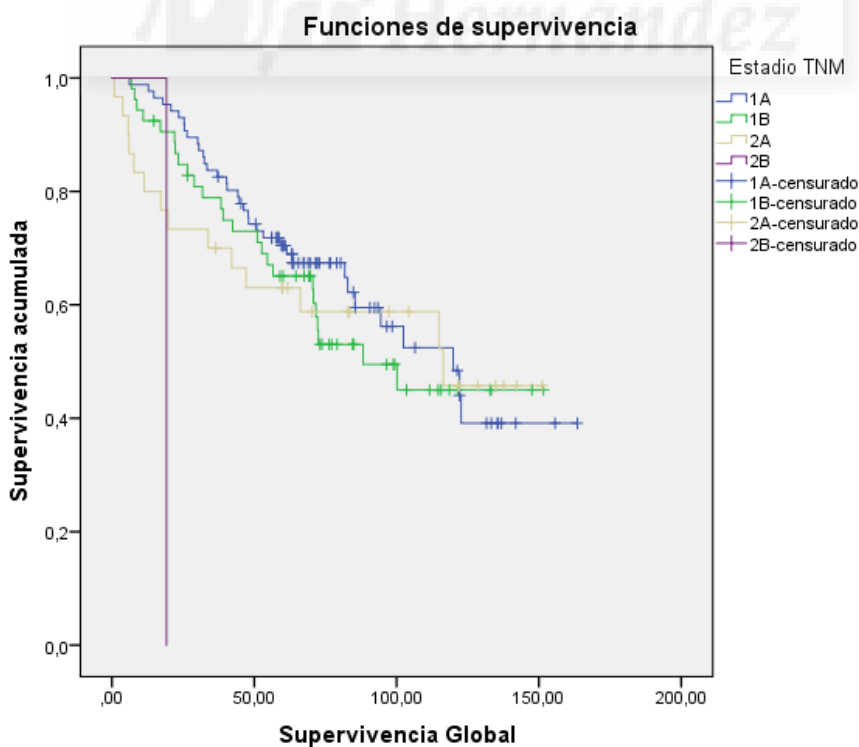


Figura 31: Supervivencia global por estadios.



ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

Tabla 27: Análisis univariante supervivencia global.

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
Sexo			0.978		0.323
Mujer	35	1		1	
Hombre	135	1.364		0.735-2.531	
Tabaquismo			1.138		0.286
No fumador	20	1		1	
Fumador	150	1.524		0.699-3.324	
Tabaquismo (a/paq)			2.665		0.264
5-15	10	1		1	
16-30	21	1.349		0.272-6.702	0.714
>30	119	2.255		0.549-9.260	0.259
Tipo de resección *			0.298		0.585
No neumonectomía	159	1		1	
Neumonectomía	11	1.263		0.546-2.922	
Invasión pleural			0.126		0.723
No	140	1		1	
Si	30	0.899		0.499-1.619	
Tipo histológico			0.737		0.864
Escamoso	58	1		1	
Adenocarcinoma	96	1.024		0.629-1.667	0.924
CCG	12	0.922		0.355-2.396	0.868
Adenoescamoso	4	1.814		0.429-7.671	0.418
Grado nuclear			1.041		0.594
Bajo	28	1		1	
Intermedio	78	0.727		0.387-1.366	0.322
Alto	64	0.757		0.398-1.442	0.397
Grado histológico			3.857		0.145
1	18	1		1	

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

2	43	0.997	0.387-2.571	0.996
3	34	1.831	0.734-4.567	0.195
TNM (7ª Ed.)			8.247	0.041
1A	86	1	1	
1B	53	1.208	0.722-2.020	0.471
2A	30	1.174	0.630-2.190	0.613
2B	1	10.970	1.435-83.879	0.021

SG: supervivencia global; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%; a/paq: años/paquete; CCG: carcinoma célula grande.

En relación a las variables inmunohistoquímicas a estudio, no se observó relación entre la actividad proliferativa medida a través de la expresión de Ki-67 y la supervivencia (Tablas 28 y 29). Se obtuvieron resultados contradictorios empleando los distintos puntos de corte, pero sin alcanzar la significación estadística.



Tabla 28. Análisis univariante de SLE para Ki-67 con diferentes puntos de corte (n=149).

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
Ki-67 >5%			1.444		0.229
No	8	1		1	
Si	141	0.539		0.193-1.502	
Ki-67 >10%			2.050		0.152
No	22	1		1	
Si	127	0.603		0.300-1.214	
Ki-67 >20%*			0.184		0.668
No	46	1		1	
Si	103	0.877		0.481-1.600	
Ki-67 >25%			0.119		0.730
No	61	1		1	
Si	88	0.904		0.510-1.602	
Ki-67 >30%*			0.327		0.568
No	73	1		1	
Si	76	0.847		0.480-1.496	
Ki-67 >40%			0.014		0.905
No	117	1		1	
Si	32	1.042		0.531-2.045	

SLE: supervivencia libre de enfermedad; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%.

Tabla 29. Análisis univariante de SG para Ki-67 con diferentes puntos de corte (n=149).

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
Ki-67 >5%			0.019		0.889
No	8	1		1	
Si	141	0.921		0.287-2.953	
Ki-67 >10%			0.289		0.591
No	22	1		1	
Si	127	0.822		0.401-1.684	
Ki-67 >20%*			0.184		0.668
No	46	1		1	
Si	103	1.130		0.646-1.978	
Ki-67 >25%			0.988		0.320
No	61	1		1	
Si	88	1.307		0.770-2.218	
Ki-67 >30%*			0.122		0.727
No	73	1		1	
Si	76	0.914		0.553-1.512	
Ki-67 >40%			0.233		0.629
No	117	1		1	
Si	32	0.860		0.465-1.589	

SG: supervivencia global; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%.

En el caso de los adenocarcinomas, dado que en la literatura se ha descrito el valor pronóstico de Ki-67 en este tipo histológico con diversos puntos de corte, se ha realizado un subanálisis sin observar relación entre la actividad proliferativa medida a través de Ki-67 y la supervivencia para ninguno de los puntos de corte estudiados (5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%)(Tablas 30 y 31). Utilizando el 25% como punto de corte, se observó una tendencia a una mayor SG en los que presentaban una actividad

<25% respecto a los que superaban el punto de corte (103.46 meses vs. 94.07 meses) aunque sin alcanzar tampoco significación estadística ($p=0.66$).

Tabla 30. Análisis univariante de SLE para Ki-67 con diferentes puntos de corte en adenocarcinomas (n=81).

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
Ki-67 >5%			1.620		0.203
No	7	1		1	
Si	74	0.511		0.178-1.466	
Ki-67 >10%			1.756		0.185
No	20	1		1	
Si	61	0.601		0.280-1.287	
Ki-67 >20%*			0.024		0.878
No	42	1		1	
Si	39	0.945		0.461-1.939	
Ki-67 >25%			0.081		0.776
No	51	1		1	
Si	30	0.896		0.419-1.916	
Ki-67 >30%*			0.460		0.497
No	58	1		1	
Si	23	0.747		0.320-1.743	
Ki-67 >40%			2.963		0.085
No	76	1		1	
Si	5	0.043		0.000-10.876	

SLE: supervivencia libre de enfermedad; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%.

Tabla 31 Análisis univariante de SG para Ki-67 con diferentes puntos de corte en adenocarcinomas (n=81).

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
Ki-67 >5%			0.087		0.769
No	7	1		1	
Si	74	0.836		0.254-2.754	
Ki-67 >10%			0.640		0.424
No	20	1		1	
Si	61	0.729		0.334-1.588	
Ki-67 >20%*			0.006		0.938
No	42	1		1	
Si	39	1.027		0.523-2.017	
Ki-67 >25%			0.194		0.660
No	51	1		1	
Si	30	1.166		0.587-2.317	
Ki-67 >30%*			0.971		0.324
No	58	1		1	
Si	23	0.670		0.301-1.492	
Ki-67 >40%			2.081		0.149
No	76	1		1	
Si	5	0.254		0.034-1.887	

SLE: supervivencia libre de enfermedad; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%.

En los carcinomas escamosos, no hubo asociación estadísticamente significativa entre Ki-67 con el punto de corte en 25% y la supervivencia. Se ha observado una mayor SLE en aquellos que expresan >25% (118.46 meses; IC95% 100.56 – 136.37) que en los que expresan menor Ki-67 (106.16 meses; IC95% 77.96 – 134.36), si bien esta diferencia no ha alcanzado la significación estadística (p=0.603). En el caso de la SG, se observó un mejor pronóstico en los casos con baja expresión que en los casos

con expresión >25% (106.90 vs. 103.04 meses, $p=0.388$) pero sin alcanzar la significación estadística.

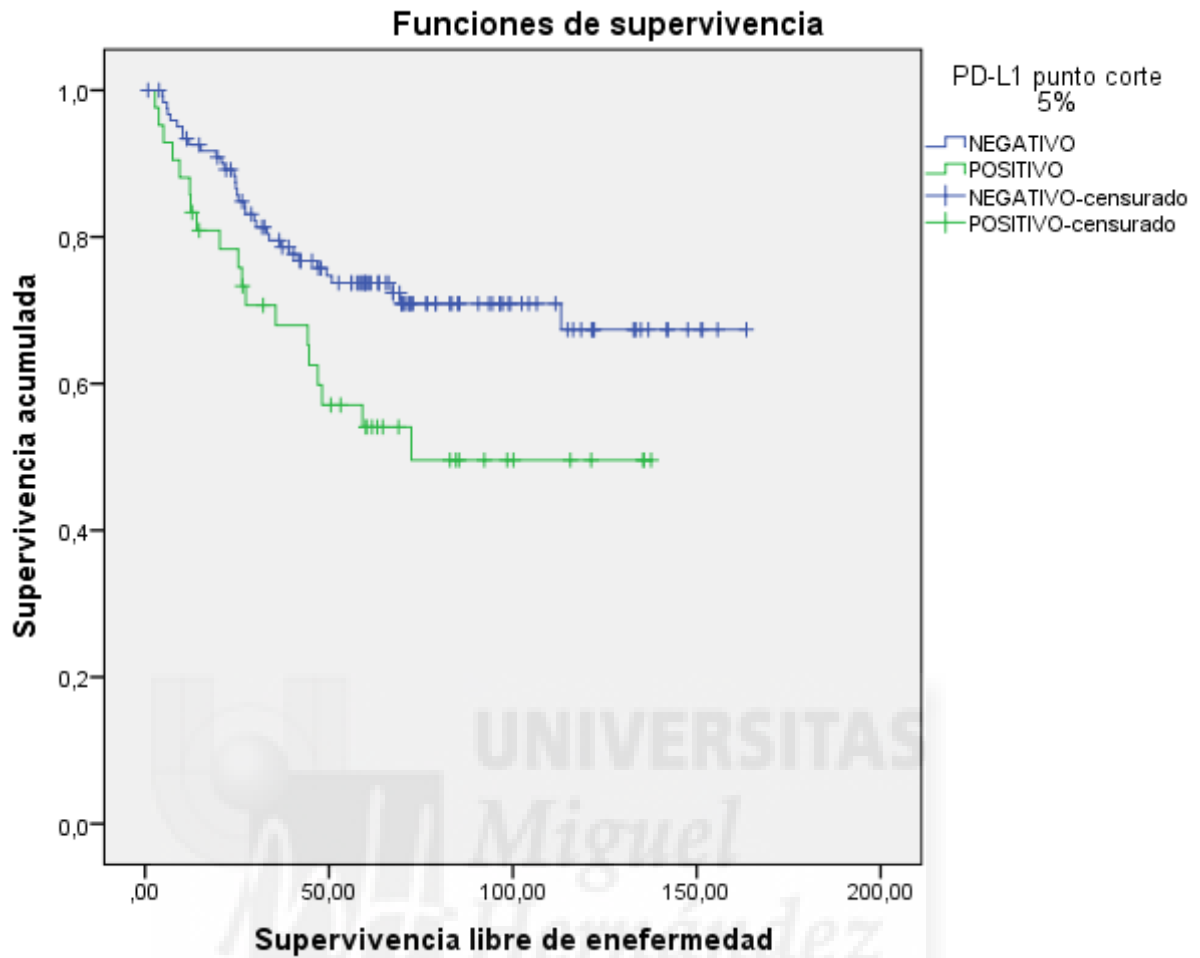
En el análisis univariante se observó una asociación entre la positividad para PD-L1 con los 3 puntos de corte empleados y una menor SLE (Tabla 32, Figura 32, Figura 33, Figura 34), pero no mostró asociación estadísticamente significativa entre los distintos puntos de corte para positividad de PD-L1 y la SG (Tabla 33, Figura 35, Figura 36, Figura 37). En el caso del 5% como punto de corte para expresión positiva de PD-L1, la SLE para aquellos con expresión positiva fue de 83.36 meses, frente a 122.54 meses en los pacientes con un resultado negativo ($p=0.024$). Utilizando 50% como punto de corte, la SLE para aquellos con expresión positiva fue de 63.16 meses frente a 121.73 meses en los pacientes con un resultado negativo ($p=0.001$). Finalmente, utilizando la categorización entre los casos con menos del 1% de células tumorales con expresión de PD-L1, casos con entre 1-49%, y casos por encima o igual al 50% de células tumorales PD-L1 positivas, se observó una SLE de 122.76 meses, 100.04 meses y 63.16 meses respectivamente ($p=0.004$).

Tabla 32. Análisis univariante de SLE para PD-L1 con diferentes puntos de corte (n=165).

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
PD-L1 >5%			5.111		0.024
No	123	1		1	
Si	42	1.897		1.079-3.338	
PD-L1 >50%			11.056		0.001
No	145	1		1	
Si	20	2.855		1.495-5.453	
PD-L1			11.264		0.004
No (<1%)	120	1		1	
Baja (1-49%)	25	1.216		0.560-2.640	0.621
Alta ($\geq 50\%$)	20	2.960		1.522-5.758	0.001

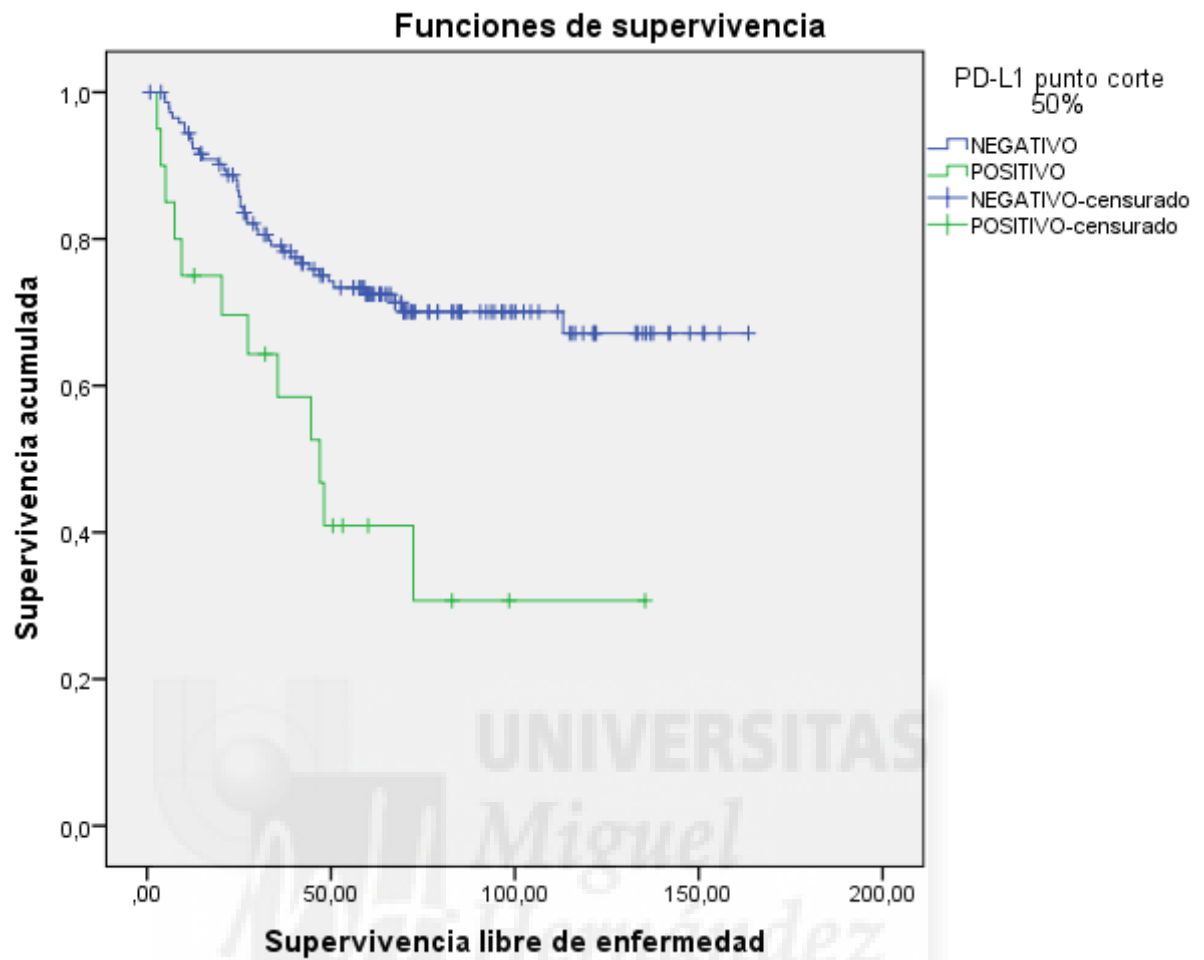
SLE: supervivencia libre de enfermedad; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%.

Figura 32: Supervivencia libre de enfermedad según PD-L1 (punto de corte 5%).



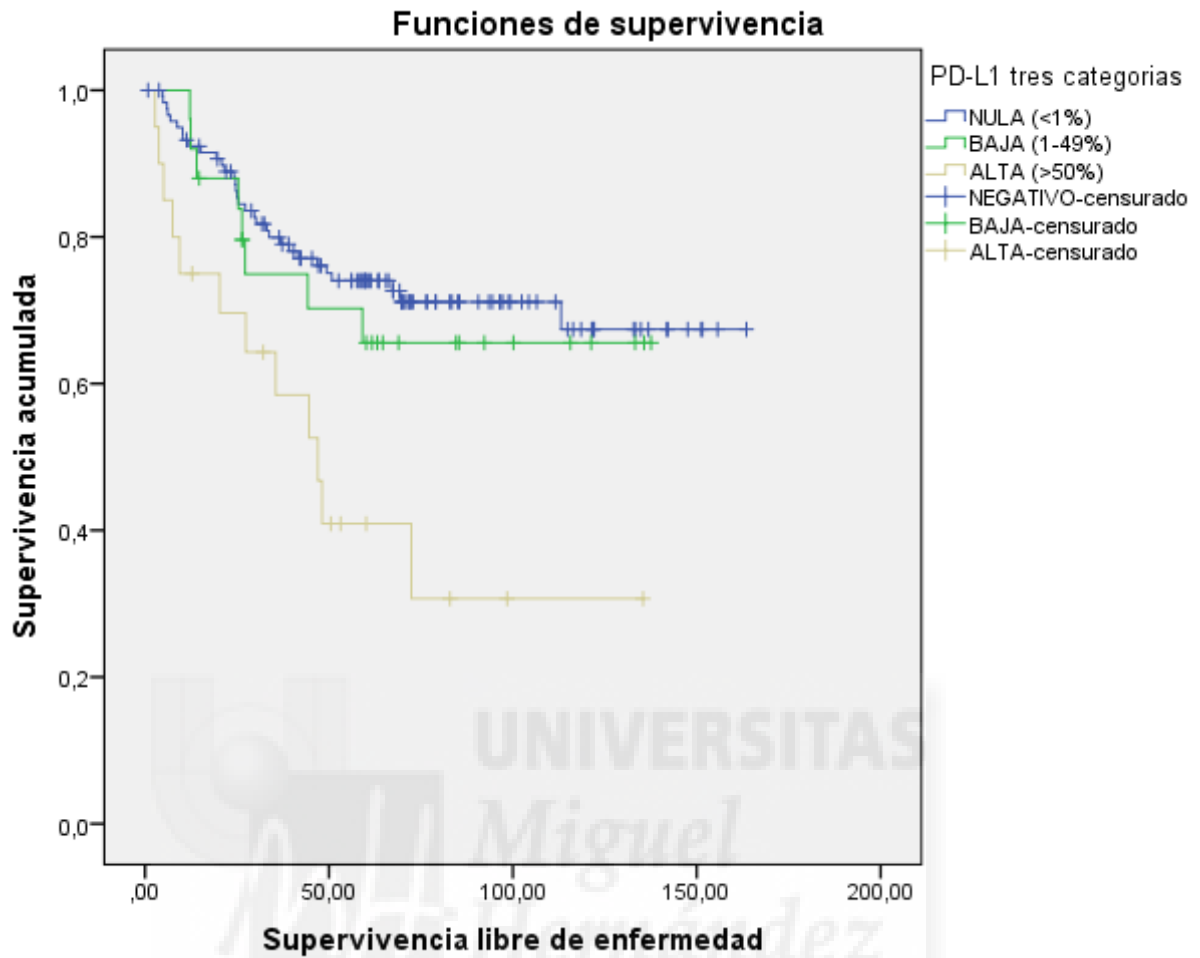
*SLE PD-L1 < 5% 122.54 meses (IC95% 110.67-134.40 meses); PD-L1 ≥5% 83.36 meses (IC 95% 65.51-101.21 meses); p=0.024

Figura 33: Supervivencia libre de enfermedad según PD-L1 (punto de corte 50%).



*SLE PD-L1 < 50% 121.72 meses (IC95% 110.80-132.65 meses); PD-L1 ≥50% 63.16 meses (IC 95% 38.40-87.92 meses); p=0.001

Figura 34: Supervivencia libre de enfermedad según PD-L1 (expresión nula, baja, alta).



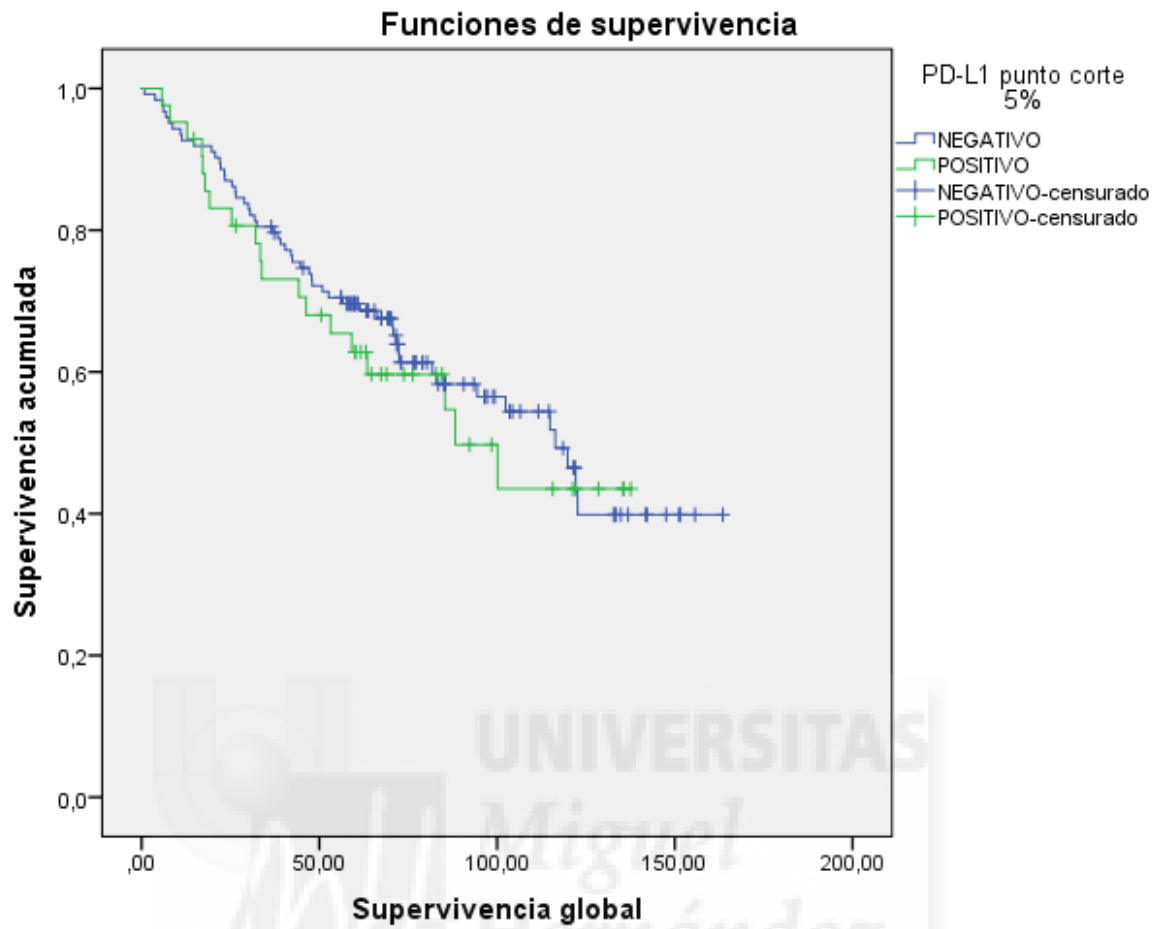
*SLE PD-L1 < 1% 122.76 meses (IC95% 110.76-134.77 meses); PD-L1 1-49% 100.04 meses (IC 95% 78.63-121.45 meses); PD-L1 \geq 50% 63.16 meses (IC 95% 38.40-87.92 meses); p=0.004

Tabla 33. Análisis univariante de SG para PD-L1 con diferentes puntos de corte (n=165).

Variable	n	HR	χ^2	IC 95%	p
PD-L1 >5%			0.210		0.646
No	123	1		1	
Si	42	1.130		0.669-1.910	
PD-L1 >50%			0.526		0.468
No	145	1		1	
Si	20	1.280		0.656-2.497	
PD-L1			0.553		0.758
No (<1%)	120	1		1	
Baja (1-49%)	25	0.944		0.480-1.857	0.867
Alta (≥ 50%)	20	1.268		0.644-2.495	0.492

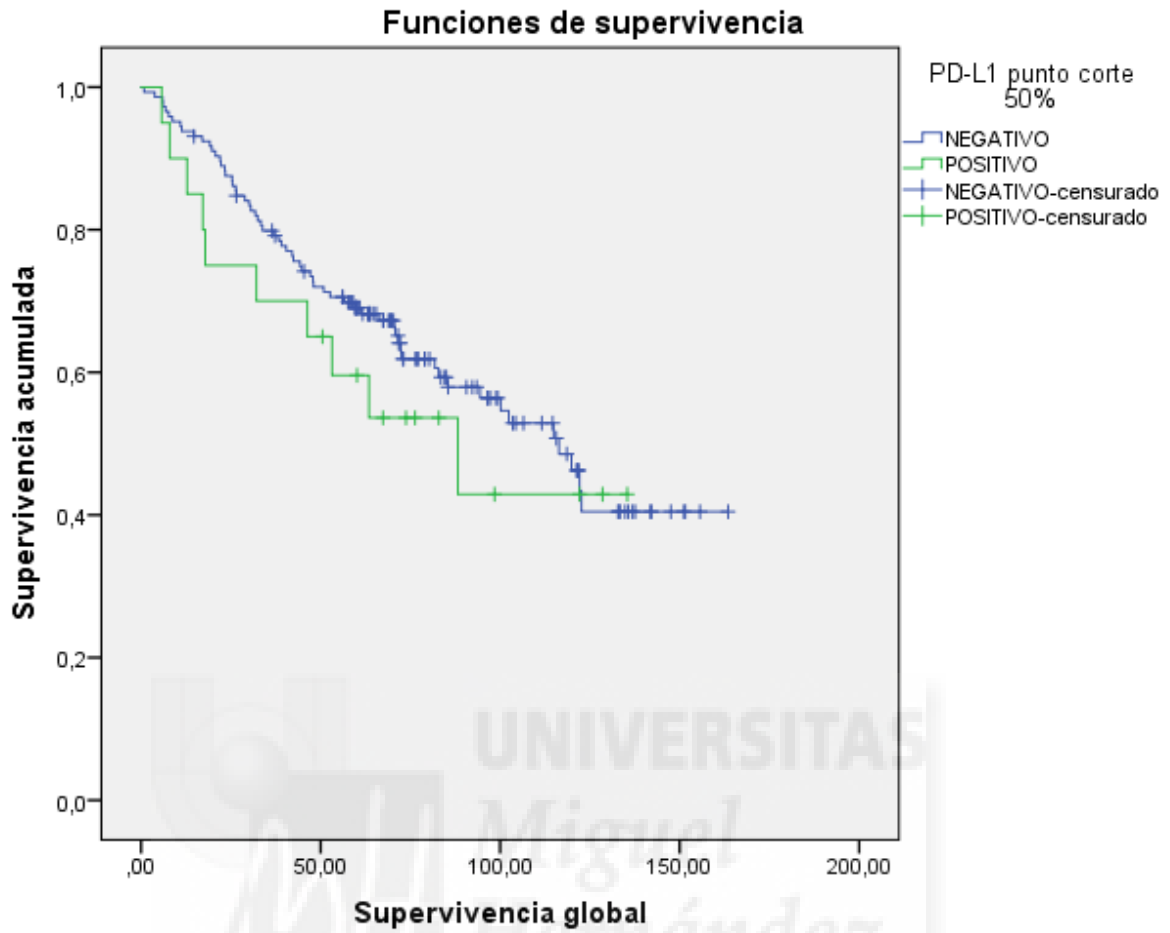
SG: supervivencia global; HR: hazard ratio; χ^2 : chi-cuadrado; IC 95%: intervalo confianza al 95%.

Figura 35: Supervivencia global según PD-L1 (punto de corte 5%).



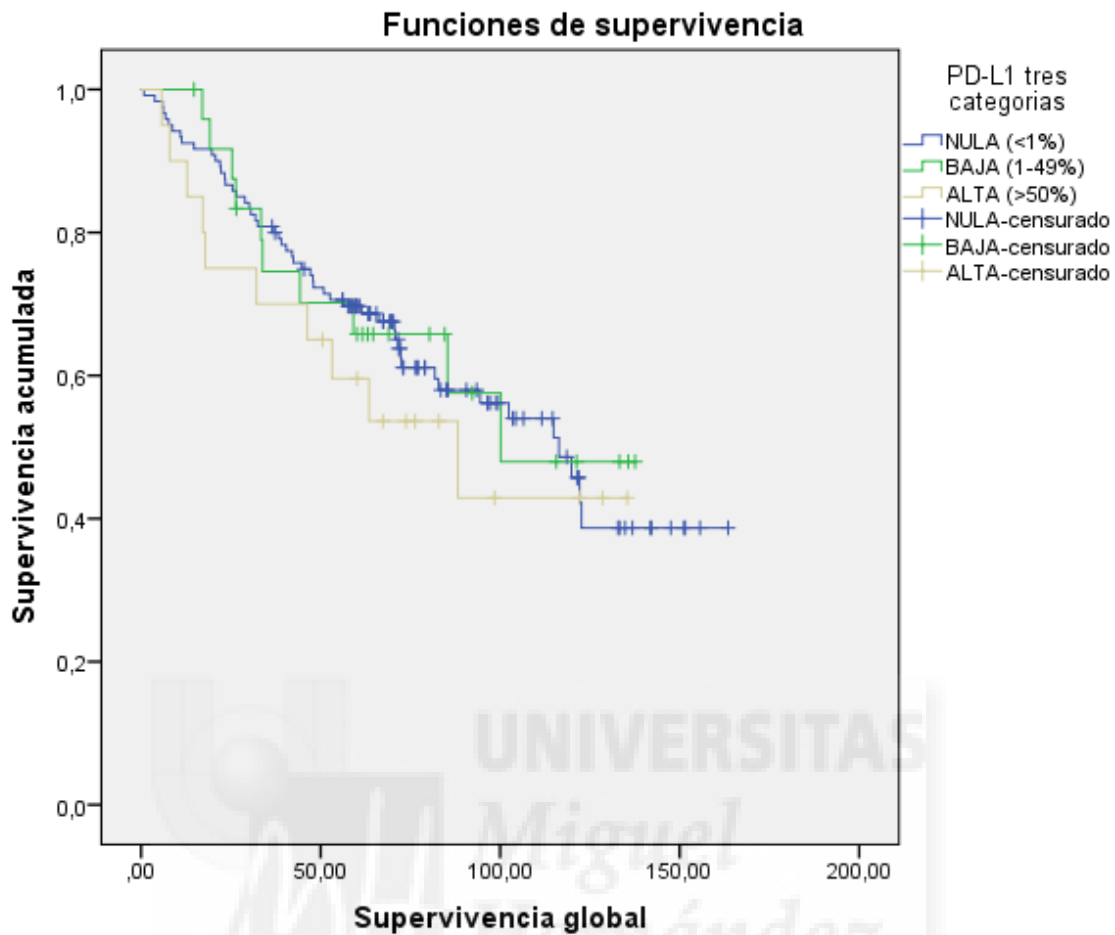
*SG PD-L1 < 5% 103.16 meses (IC95% 91.44-114.88 meses); PD-L1 \geq 5% 87.42 meses (IC 95% 71.05-103.79 meses); p=0.646

Figura 36: Supervivencia global según PD-L1 (punto de corte 50%).



*SG PD-L1 < 50% 103.24 meses (IC95% 92.41-114.08 meses); PD-L1 ≥50% 81.20 meses (IC 95% 57.29-105.11 meses); p=0.468

Figura 37: Supervivencia global según PD-L1 (expresión nula, baja, alta).



*SG PD-L1 < 1% 102.54 meses (IC95% 90.66-114.41 meses); PD-L1 1-49% 93.78 meses (IC 95% 73.31-114.24 meses); PD-L1 \geq 50% 102.18 meses (IC 95% 91.95-112.41 meses); p=0.758

6.3.2. Análisis multivariante de supervivencia

Se ha llevado a cabo un análisis multivariante de supervivencia (libre de enfermedad y global) mediante el método de regresión de Cox para determinar el efecto real de las variables que presentaron durante el análisis univariante una significación inferior a p=0.2.

Las variables consideradas en el análisis multivariante para SG fueron estadio TNM y grado histológico.

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

Los pacientes con estadio IIB mostraron una peor supervivencia global en el estudio multivariante (2.485, IC95% 1.455-98.942; $p=0.021$) si bien la n era inferior a 10 (Tabla 34). El grado histológico no alcanzó significación estadística durante el análisis multivariante.

Tabla 34. Análisis multivariante para supervivencia global.

Variable	Nivel de significación (p)
Estadio TNM	0.143
Grado Histológico	0.152

Las variables consideradas en el análisis multivariante para SLE fueron estadio TNM, tabaquismo, status para Ki-67 >10%, status para PD-L1 >5%, status para PD-L1 >50% y status para PD-L1 en tres categorías (<1%, 1-49%, ≥50%).

De las variables que se correlacionaron con menor SLE en el análisis univariante, ninguna mostró significación estadística en el análisis multivariante (Tabla 35).

Tabla 35. Análisis multivariante para supervivencia libre de enfermedad.

Variable	HR	Nivel de significación (p)	Intervalos de confianza 95%	
Estadio TNM		0.066		
Tabaquismo	0.587	0.205	0.258	1.338
Ki-67 >10%	0.553	0.183	0.231	1.323
PD-L1 >5%	1.337	0.804	0.134	13.314
PD-L1 >50%	2.528	0.445	0.234	27.303
PD-L1 (<1%, 1-49%, ≥50%)		0.879		



7. DISCUSIÓN

7.1. DISCUSIÓN DE LA METODOLOGÍA

Los resultados de un proyecto de investigación científico deben ser interpretados no sólo en relación a la literatura y la evidencia existente, sino también en relación a la metodología empleada, de la cual es importante resaltar sus fortalezas pero también sus limitaciones. En este apartado se discutirá la metodología empleada y posteriormente se discutirán los resultados.

El tipo de estudio empleado ha sido observacional retrospectivo y con carácter unicéntrico. Entre las ventajas de este tipo de estudio resaltan la posibilidad de medir frecuencias (incidencia) de las distintas variables a estudio y la fuerza de asociación entre las variables, así como la rapidez en su realización. Del mismo modo, permite extrapolar los resultados a poblaciones muy definidas que cumplan los criterios de la muestra analizada en este estudio. Las principales limitaciones son el escaso control del investigador, que lo hace difícilmente reproducible por otro investigador, y la alta probabilidad de sesgos en relación a la recogida de la información (al llevarse a cabo de modo retrospectivo sobre fuentes de información no creadas específicamente para el estudio). Del mismo modo, la muestra de pacientes que lo constituyen podría no ser representativa de la población afecta por cáncer de pulmón en estadio inicial sin afectación ganglionar y estar sujeta a sesgos de selección derivados del proceso diagnóstico-terapéutico al que fueron sometidos desde el año 2003 al 2011, así como el carácter unicéntrico que limita la representatividad de la muestra.

En relación al ámbito de estudio, los pacientes incluidos en el estudio proceden de un área poblacional amplia que incluye numerosos departamentos de salud de toda la provincia de Alicante, por lo que a pesar de ser unicéntrico, incluye pacientes provenientes de al menos 10 centros distintos, si bien durante el periodo de estudio se produjo la exclusión de determinados departamentos de salud al derivarse los pacientes de dichos departamentos a nuevos servicios de Cirugía Torácica en la provincia de Alicante, como el departamento de Elche-Crevillent, Torrevieja y Dénia. Todo ello limita la representatividad de la muestra y la extrapolación de los resultados.

En cuanto a la selección de la muestra no se ha aplicado ningún método de muestreo, sino que se han seleccionado los casos que cumplían los criterios de inclusión y ninguno de exclusión, de manera consecutiva, no aleatoria, durante el

periodo de estudio. Esos pacientes se intervinieron siguiendo los criterios clínicos estandarizados para la indicación quirúrgica (32) de modo que no ha habido intervención alguna en la selección muestral. Se decidió acotar la selección de pacientes intervenidos hasta 2011 para poder conseguir al menos 5 años de seguimiento, que es el criterio empleado en el Servicio de Cirugía Torácica del HGUA previo al alta del seguimiento, y tener tiempo suficiente para el análisis de supervivencia, sumado a que por encima de los 5 años se habría dificultado la recogida de datos incrementando las posibilidades de pérdidas.

El tamaño muestral final ($n=170$), que no había sido previamente calculado, constituye una limitación en el poder estadístico del estudio, si bien no ha sido posible obtener un mayor tamaño muestral en el ámbito de este estudio que cumpliera los criterios de inclusión establecidos y los periodos de seguimiento mínimo deseados, y a pesar de ello se han obtenido diferencias significativas en algunas variables a estudio. El tamaño muestral es limitado debido a limitaciones relacionadas con el tamaño de la población del área de referencia, y a los criterios de selección aplicados. Así mismo, al incluir una cohorte histórica desde el año 2003, muchos pacientes se excluyeron al no cumplir los criterios de inclusión dado que la proporción de estadios iniciales que se diagnosticaba en esos años era inferior a la de los últimos 5 años, por lo que durante el proceso de inclusión de pacientes en el estudio se observó una tendencia creciente en el número de casos incluidos en los últimos años del estudio (2010 y 2011 con 39 y 27 casos respectivamente).

El estudio se ha centrado en el cáncer de pulmón de célula no pequeña intervenido mediante resección anatómica salvo en casos de intolerancia funcional, sin afectación ganglionar hiliomediastínica ni a distancia, clínica ni patológica (cN0, pN0; cM0, pM0). Se ha decidido acotar a estadios iniciales debido a varios motivos: en primer lugar, el autor de esta investigación es cirujano torácico, cuyo principal campo de actuación en cáncer de pulmón se centra en dichos estadios sometidos a resección quirúrgica; en segundo lugar, existen pocos estudios que evalúen la expresión de PD-L1 (104,105) y de Ki-67 (134–137) específicamente en estadios iniciales para buscar correlaciones pronósticas, por lo que es un campo con muchas lagunas de conocimiento; en tercer lugar, es conocido que a pesar de la agrupación en estadios iniciales basada en la 7ª edición del sistema de estadificación TNM (32), existe heterogeneidad en la supervivencia de esos pacientes por lo que deben existir otras

variables con valor pronóstico, y dados los resultados satisfactorios observados en el tratamiento de estadios avanzados con fármacos que actúan en la vía de PD-1/PD-L1 se puede hipotetizar si estos fármacos podrían tener efecto en la supervivencia de estadios iniciales con o sin expresión de PD-L1 en células tumorales; en cuarto lugar, se ha querido excluir aquellos casos con afectación ganglionar o a distancia, del mismo modo que se han excluido los pacientes que habían recibido tratamiento neoadyuvante o adyuvante, debido a que son factores pronósticos ya establecidos que podrían haber confundido el efecto de las variables histopatológicas a estudio.

En relación al tiempo de seguimiento, se decidió excluir los casos que cumplían menos de 24 meses salvo fallecimiento debido a que la mayoría de guías clínicas apuntan a una mayor tasa de recidiva durante los 2 primeros años (36,38,138), y se excluyeron los pacientes fallecidos en los 30 primeros días postoperatorios por el efecto de las complicaciones de la intervención quirúrgica ya que podrían interferir en el análisis de supervivencia en relación a la enfermedad.

Las fuentes de datos de los casos del estudio han provenido de numerosos sistemas tanto en formato papel como electrónico, lo cual incrementa la posibilidad de pérdidas en la recogida de datos o errores, y fue especialmente dificultoso en los pacientes de los primeros años del estudio 2003-2008, debido a que en esos años no existían los programas informáticos hospitalarios que sirven de soporte para la historia clínica de los pacientes en la actualidad (Abucasis, Mizar, Orion Clinic), por lo que las historias debían ser revisadas en formato papel con la dificultad derivada de la potencial pérdida de documentos. No obstante, el autor, como encargado de la recogida de datos del estudio, ha llevado a cabo un proceso minucioso y exhaustivo para la búsqueda de la información necesaria, y en los casos en los que existiera duda sobre variables anatomopatológicas se han revisado las muestras de las piezas quirúrgicas para su aclaración. Con el fin de completar el seguimiento actualizado de los pacientes, en los casos en los que fue necesario, se llevó a cabo contacto telefónico para tratar de determinar la situación real del paciente.

Entre las variables descriptivas (clínicas y morfológicas) se han incluido aquellas con valor pronóstico establecido además de las variables a estudio, para poder así realizar análisis multivariante de supervivencia aislando el efecto de otras variables distintas de las de estudio, y para poder establecer correlación entre las variables a estudio y otras ya establecidas: variables clínicas (tabaquismo, tipo de resección),

morfológicas clásicas (tamaño, tipo histológico, grado nuclear, grado histológico, invasión pleural, estadio TNM). Se decidió utilizar la 7ª edición de la clasificación TNM (32) del cáncer del pulmón por ser la vigente durante el periodo de realización del estudio y haber sido empleados sus criterios en la evaluación clínica y patológica de los casos.

Las variables resultado evaluadas han sido la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global. A pesar de que únicamente los estadios iniciales han sido objeto de este estudio, sabemos que hasta un 19 y un 30% de estadios IA y IB, respectivamente, presentan recidiva de la enfermedad a 5 años (41), y que la supervivencia global a 5 años es de un 60-80% en los estadios I, y tan sólo el 30-50% en los estadios II en grandes series (40). Ello indica la importancia de buscar otros factores pronósticos para categorizar mejor estos estadios iniciales en subgrupos de riesgo. La supervivencia libre de enfermedad ha sido evaluada como el tiempo transcurrido en meses entre la cirugía y la recidiva (en casos de recidiva positiva), o entre la cirugía y la última fecha de seguimiento o la fecha de exitus (en casos sin recidiva). De este modo en los casos sin recidiva, dicha supervivencia es superponible a la supervivencia global, y en los casos recidivados sin exitus será inferior a aquella. La supervivencia global ha sido evaluada como el tiempo en meses desde la cirugía hasta el fallecimiento, o en caso de que el paciente continuara vivo hasta la fecha de último seguimiento. No se ha analizado de forma separada la mortalidad por cáncer de la mortalidad por otras causas, lo cual constituye una limitación al estudio dada la edad media de la muestra en la que la probabilidad de un evento no es despreciable. No obstante, teniendo en cuenta que se ha llevado a cabo una investigación exhaustiva y unido a los controles reglados, podría inferirse la mortalidad por cáncer de los datos de recidiva (supervivencia libre de enfermedad) y exitus (supervivencia global).

En relación al estudio de las variables inmunohistoquímicas PD-L1 y Ki-67, se han empleado técnicas ya ampliamente reconocidas en otros estudios. En el caso de PD-L1, se ha empleado el anticuerpo monoclonal murino clon 22C3 de Dako, que es uno de los que ha sido incluido en el proyecto Blueprint (139) que pretende evaluar sobre las mismas muestras de tejido tumoral 4 diferentes anticuerpos y sus respectivas plataformas, y cuyos resultados preliminares sobre 39 muestras demostraron una tinción similar para los clones 22C3, 28-8, SP263 y menor para SP142 (92). Dicho anticuerpo ha podido ser evaluado en 165 de 170 casos, con un resultado satisfactorio

de la técnica habiendo podido tipificar casos sin expresión del marcador, y casos con expresión débil, moderada o intensa. Existieron 5 casos en los que durante la construcción del TMA no se obtuvo área representativa tumoral o ésta no era valorable por la técnica. En el caso de Ki-67, se ha empleado el anticuerpo monoclonal murino MIB1 que se utiliza ampliamente para la evaluación de este marcador (67), habiendo sido evaluable en 149 de 170 casos (21 casos con pérdida de inmunoreactividad con el paso de los años), con un amplio rango de porcentaje de expresión de Ki-67 de entre el 2 y el 80%.

La creación de los TMA's se ha realizado siguiendo los estándares y se han aplicado las técnicas inmunohistoquímicas siguiendo la metodología especificada para cada anticuerpo y cada equipo. Las técnicas inmunohistoquímicas empleadas se han llevado a cabo sobre muestras almacenadas y conservadas entre 5 y 13 años, por lo que se limita el número de casos valorables (149 casos para Ki-67, y 165 casos para PD-L1).

En cuanto a la valoración de los resultados de la expresión de Ki-67 como marcador de proliferación celular, al no existir consenso en relación al punto de corte que determina un resultado positivo, se ha utilizado inicialmente la mediana de expresión de Ki-67 de los 149 casos valorables (mediana=30%) como punto discriminatorio, si bien se ha realizado un análisis utilizando otros puntos de corte descritos en la literatura (5%, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%) para analizar si existía una mejor correlación de alguno de ellos con las variables resultado.

La valoración de los resultados de la expresión de PD-L1 presenta el mismo problema al no existir consenso sobre el punto de corte para determinar un resultado positivo. Siguiendo las instrucciones del fabricante se ha llevado a cabo un análisis en tres categorías en función de ausencia de expresión (<1%), expresión baja (1-49%) y expresión alta (>50%). No obstante también se ha realizado un análisis utilizando el punto de corte para un resultado positivo en 5% y otro análisis empleando el punto de corte en 50%. El objetivo era determinar si alguno de los puntos de cortes es más sensible para detectar casos con peor pronóstico en términos de SLE y SG.

La valoración de ambas técnicas inmunohistoquímicas la han llevado a cabo dos patólogos con experiencia de modo independiente, pudiendo existir subjetividad en la

misma, que se ha tratado de limitar mediante la utilización de controles positivos y negativos y siguiendo las instrucciones y los ejemplos del fabricante.

7.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de esta tesis doctoral reflejan de modo general que nuestra muestra poblacional de cáncer de pulmón en estadio inicial sin afectación ganglionar ha presentado una supervivencia libre de enfermedad (87% a 2 años; 67% a 5 años) y global (86% a 2 años; 67% a 5 años) compatible con la descrita en la literatura (40)(Tabla 36).

En la Figura 38 se muestra la supervivencia libre de enfermedad y global por estadios del presente estudio.

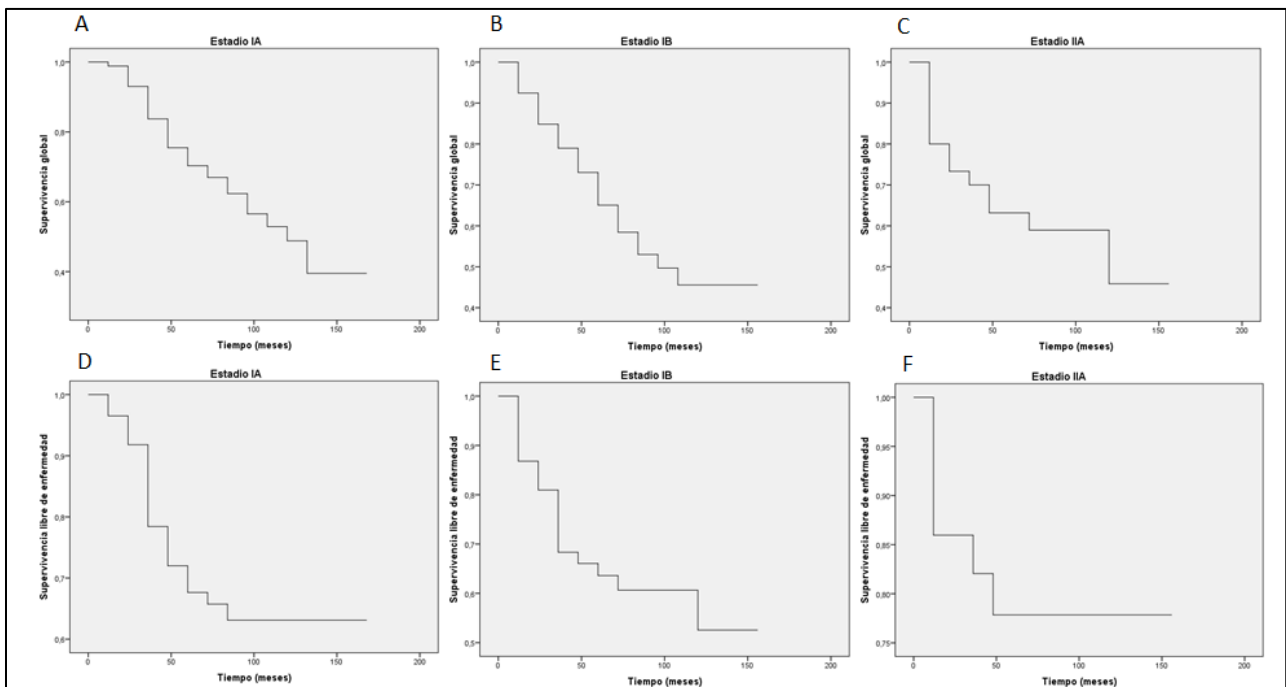


Tabla 36. Comparación SLE y SG entre nuestro estudio y publicaciones relevantes previas.

Estudio	Año	SLE 5 años	SG 5 años
Tanoue y cols.(40)	2009	Estadio I 70-81%	Estadio I 60-80% Estadio II 30-50%
Goldstraw et al.(35)	2015	-	Estadio IA 82% Estadio IB 66% Estadio IIA 52% Estadio IIB 47%
Presente estudio	2017	Global 67% Estadio IA 68% Estadio IB 64% Estadio IIA 78%	Global 67% Estadio IA 70% Estadio IB 65% Estadio IIA 63%

* SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global

Figura 38. Supervivencia libre de enfermedad y global por estadios.



* A: curva de supervivencia global del estadio IA. B: curva de supervivencia global del estadio IB. C: curva de supervivencia global del estadio IIA. D: curva de supervivencia libre de enfermedad del estadio IA. E: curva de supervivencia libre de enfermedad del estadio IB. F: curva de supervivencia libre de enfermedad del estadio IIA

La expresión de PD-L1 ha sido también acorde a lo descrito en otros estudios (89,98,113), y la mediana de expresión de Ki-67 se ajusta a los puntos de corte más empleados habitualmente (68). No se ha observado correlación pronóstica en función de la expresión de Ki-67, si bien se ha observado peor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad en relación con la expresión de PD-L1 independientemente del punto de corte empleado en este estudio.

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en base a cada objetivo del estudio.

7.2.1. Respuesta al objetivo 1: Determinar si el índice proliferativo Ki-67 se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y global

Se ha llevado a cabo un análisis univariante para determinar si existe relación entre la actividad proliferativa medida según la expresión de Ki-67 y el pronóstico en términos de SLE y SG. Utilizando la mediana de expresión de Ki-67 (mediana=30%) no se ha observado relación entre la expresión del marcador y el pronóstico en términos de SLE y SG ($p=0.568$ y $p=0.727$), por lo que se han analizado otros puntos de corte descritos en la literatura sin observar relación alguna con la supervivencia (ver tabla 16 y 17 del apartado Resultados).

A diferencia de nuestros resultados, en el meta-análisis de Wen de 2015 (67) se describía una correlación entre la expresión elevada de Ki-67 y la SG tanto en población asiática como en la no asiática (HR 1.97, IC 95% 1.43-2.71, $p<.001$; y HR 1.37, IC 95% 1.15-1.64, $p=.013$), si bien realizando análisis por tipo histológico, esta correlación era significativa sólo en adenocarcinomas, y en esos casos, tan sólo en población asiática y en estadios iniciales.

Se ha realizado un análisis en el subtipo histológico adenocarcinoma empleando los mismos puntos de corte sin observar relación significativa alguna con la supervivencia (ver tabla 18 y 19 del apartado Resultados). Dado que nuestra muestra está basada en población no asiática podrían existir otros factores relacionados con la población de la muestra que hayan influido para no obtener una correlación significativa entre Ki-67 y supervivencia.

Los trabajos de Hommura, Haga y Takahashi (70–72) sobre población asiática también encontraron correlación significativa entre Ki-67, y la SG y SLE. Existen pocos trabajos publicados en población no asiática que hayan corroborado esta asociación entre elevada expresión de Ki-67 y peor pronóstico. Harpole y cols. en 1996 (140) publicaron un estudio sobre 275 pacientes de CPCNP estadio I, utilizando un punto de corte de Ki-67 del 7% observando una mayor SG en los que expresaban Ki-67 por debajo del 7% (HR 1.53, IC95% 1.00-2.37). El trabajo de Medhi y cols. de 1998 (141) sobre 243 CPCNP en estadios I-II, utilizó un punto de corte del 25% para encontrar mayor riesgo en los que presentaban expresión elevada de Ki-67 tanto en SLE (HR 1.58, IC95% 1.06-2.41) como en SG (HR 1.60; IC95% 1.06-2.41). Más recientemente, Poleri y cols. en 2003 (142) sobre 50 estadios I y utilizando el 33% como punto de

corte observó peor pronóstico en términos de SLE en los que expresaban mayor Ki-67 (HR 4.10; IC95% 1.98-8.46). La Tabla 37 muestra los resultados de los principales estudios y el estudio presente.

Es importante resaltar que debido al limitado tamaño muestral, y ya que Ki-67 ha sido valorable en 149 casos, tan sólo con los puntos de corte 25% y 30% se han obtenido en los dos brazos al menos 50 casos, lo que puede limitar la potencia del análisis, si bien algunos de aquellos estudios que han observado correlación pronóstica tenían tamaños muestrales limitados como el nuestro (72,141,142). Por otro lado, en nuestro estudio se han obtenido resultados contradictorios en función del punto de corte, suponiendo en unos casos un resultado positivo un incremento del riesgo y en otros casos un menor riesgo pero sin un patrón lógico identificable, como se observa en las tablas 16 y 17 del apartado Resultados.

En el caso de los carcinomas escamosos, dado que existe menor evidencia en la literatura del valor pronóstico de Ki-67 en este subtipo histológico, se ha realizado un análisis en este subtipo únicamente con uno de los puntos de corte publicado más habituales, el 25%. Se ha observado una mayor SLE en aquellos que expresan >25% (118.46 meses; IC95% 100.56 – 136.37) que en los que expresan menor Ki-67 (106.16 meses; IC95% 77.96 – 134.36), si bien esta diferencia no ha alcanzado la significación estadística ($p=0.603$). En el caso de la SG, se observó un mejor pronóstico en los casos con baja expresión que en los casos con expresión >25% (106.90 vs. 103.04 meses, $p=0.388$) pero sin alcanzar la significación estadística. Estos resultados son difíciles de justificar dado que una mayor SLE y una mayor expresión de Ki-67 se asociarían a una menor SG, y podrían estar en relación al escaso número de carcinomas escamosos valorables para este marcador en este estudio ($n=52$).

No obstante, en la literatura se ha descrito un efecto directo entre expresión de Ki-67 y supervivencia en los carcinomas escamosos (a mayor expresión, mayor supervivencia), como describieron Warth y cols. en 2014 (68) sobre 1482 casos de CPCNP. Este efecto ha sido reportado en estudios más pequeños por Hommura (70), Takahashi (72) y Poleri (142). Acerca de este efecto, opuesto al observado de manera más generalizada en adenocarcinomas, no existe por el momento una explicación lógica para interpretar que una mayor actividad proliferativa pudiera relacionarse con mejor pronóstico; se ha especulado sobre si una mayor actividad proliferativa se relacionaría con un rápido incremento en el tamaño que comprometería el aporte

sanguíneo y favorecería la necrosis tumoral, y por tanto, una mayor inmunogenicidad, aunque por el momento es tan sólo una hipótesis sin corroborar.

A pesar del valor pronóstico de Ki-67 descrito en múltiples trabajos, la mayoría de estudios con análisis multivariante no han sido capaces de confirmar esta asociación con carácter independiente. La heterogeneidad de los estudios, los diferentes puntos de corte empleados para la definición de resultados positivos, y la inclusión de diferentes variables durante el análisis multivariante hacen difícil la comparación entre los mismos y obtener conclusiones claras al respecto.

Por tanto, en este trabajo no se ha podido demostrar una correlación estadísticamente significativa entre la expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 y la supervivencia con los datos disponibles en la muestra de este estudio, por lo que concluiríamos que la expresión de Ki-67 no tiene valor pronóstico.



Tabla 37. Principales estudios que correlacionan sobre-expresión de Ki-67 con supervivencia.

Estudio	Año	Punto de corte Ki-67	Correlación pronóstica
Harpole y cols.(140)	1996	7%	SG HR 1.53 (1.00-2.37); p=0.005
Medhi y cols.(141)	1998	25%	SG HR 1.60 (1.06-2.41); p=0.1 SLE HR 1.58 (1.06-2.41); p=0.1
Hommura y cols.(70)	2000	30%	SG HR 2.53 (1.35 4.72); p=0.004
Takahashi y cols.(72)	2002	25%	SLE HR 1.02 (0.32-3.30); p=
Haga y cols. (71)	2003	10%	SG HR 3.636 (1.267-10.439); p=0.0164
Poleri y cols. (142)	2003	33%	SLE HR 4.10 (1.98-8.46); p=
Wen y cols.(67)	2015		SG HR 1.59 (1.35-1.88); p<0.001 SLE HR 2.21 (1.43-3.42); p<0.001
Presente estudio	2017	30%	SLE HR 0.847 (0.480-1.496); p=0.568 SG HR 0.914 (0.553-1.512); p=0.727

* SLE: supervivencia libre de enfermedad; SG: supervivencia global; HR; hazard ratio

7.2.2. Respuesta al objetivo 2: Determinar si la sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales se correlaciona con la supervivencia libre de enfermedad y global

En nuestro estudio se ha observado una correlación inversa estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en membrana de células tumorales y la supervivencia libre de enfermedad, para los tres métodos de categorización de resultados (5%, 50%, sistema en tres categorías: <1%, 1-49%, >50%).

La SLE ha sido mayor en los casos con un resultado negativo para la expresión de PD-L1 que en aquellos con elevada expresión del marcador. En el caso del 5% como punto de corte para expresión positiva de PD-L1, la SLE para aquellos con expresión positiva fue de 83.36 meses, frente a 122.54 meses en los pacientes con un resultado negativo ($p=0.024$). Utilizando 50% como punto de corte, la SLE para aquellos con expresión positiva fue de 63.16 meses frente a 121.73 meses en los pacientes con un resultado negativo ($p=0.001$). Finalmente, utilizando la categorización entre los casos con menos del 1% de células tumorales con expresión de PD-L1, casos con entre 1-49%, y casos por encima o igual al 50% de células tumorales PD-L1 positivas, se observó una SLE de 122.76 meses, 100.04 meses y 63.16 meses respectivamente ($p=0.004$).

Al realizar un análisis multivariante incluyendo también aquellas otras variables que en el análisis univariante habían presentado una significación $p<0.2$ (tabaquismo, estadio TNM, Ki-67 >10%), no se alcanzó la significación estadística con ninguno de los tres sistemas de categorización de un resultado positivo para PD-L1 (5%, $p=0.804$; 50%, $p=0.445$; tres categorías, $p=0.879$) (ver tabla 23), por lo que podemos concluir que PD-L1 no es una variable que se pueda asociar de forma independiente con el pronóstico.

De entre los principales estudios que analizan el valor pronóstico de la expresión de PD-L1, dos encontraron una correlación inversa con la SLE. Zhang y cols. en 2014 (106), sobre 114 adenocarcinomas en estadio I-III observaron una menor SLE en aquellos que presentaban una expresión por encima del valor mediana de un score con rango de 0-18 en función de la intensidad de tinción y el porcentaje de células con expresión ($p=0.002$), así como una menor SG ($p<0.001$). Inamura y cols. (101) en

2016, sobre 268 adenocarcinomas en estadios I-IV, observaron una menor SLE en los casos con expresión mayor al 5% de las células tumorales ($p < 0.019$), así como una menor SG ($p = 0.0014$). En el análisis de regresión de Cox univariante, la positividad de PD-L1 se asoció con mortalidad específica por el tumor (HR 1.73; IC95% 1.06-2.72, $p = 0.030$).

Nuestro trabajo observó esta misma asociación en cáncer de pulmón al realizar el análisis utilizando el punto de corte para positividad del 5% (HR 1.897; IC95% 1.079-3.338, $p = 0.024$). De hecho, también se observó esta asociación utilizando el punto de corte del 50% (HR 2.855; IC95% 1.495-5.453, $p = 0.001$). Empleando la categorización en expresión nula ($< 1\%$), baja (1-49%) y alta ($\geq 50\%$), se observó mayor riesgo de recidiva en los casos con expresión alta (HR 2.960; IC95% 1.522-5.758, $p = 0.001$) respecto a los que presentaban expresión nula, pero no en los casos con expresión baja (HR 1.216; IC95% 0.560-2.640). Estos resultados apuntan a que la expresión alta de PD-L1, definida como mayor al 5% o al 50% de las células tumorales, se correlaciona con menor SLE de modo estadísticamente significativo. La principal explicación para estos resultados es que los tumores que presentan expresión elevada de PD-L1 utilizan esta vía como mecanismo para evadir la respuesta inmune antitumoral y progresar, del modo descrito en la introducción de esta tesis doctoral.

Existen estudios con resultados opuestos a los hallados en nuestro trabajo y en los estudios comentados anteriormente. El trabajo de Yang y cols. de 2016 (105), describió un efecto protector de la expresión de PD-L1 en más del 5% de las células tumorales (HR 0.446; IC95% 0.245-0.811, $p = 0.008$) en términos de SLE, en 105 carcinomas escamosos en estadio I, si bien en el análisis multivariante no demostró significación estadística aunque sí una tendencia a mantener este efecto (HR 0.563; IC95% 0.291-1.089, $p = 0.088$). El mismo autor, había descrito en 2014 (104), sobre una muestra de 163 adenocarcinomas en estadio I, un efecto protector de la expresión de PD-L1 $> 5\%$ en términos de SLE (SLE 5a 93% vs. 83%, $p = 0.027$), que se mantuvo durante el análisis multivariante (HR 0.179; IC95% 0.061-0.521, $p = 0.002$). La Tabla 38 muestra los resultados de los principales estudios que han analizado la correlación de la sobre-expresión de PD-L1 con la SLE.

Tabla 38. Principales estudios que correlacionan sobre-expresión de PD-L1 con SLE.

Estudio	Año	Punto de corte PD-L1	Correlación pronóstica
Zhang y cols.(106)	2014	Quickscore 8	SLE p=0.002
Inamura y cols.(101)	2016	5%	SLE p<0.019
Yang y cols.(104)	2014	5%	SLE p=0.027
Yang y cols. (105)	2016	5%	SLE HR 0.446 (0.245-0.811); p=0.008
Presente estudio	2017	5%	SLE HR 1.897 (1.079-3.338); p=0.024
		50%	SLE HR 2.855 (1.495-5.453); p=0.001
		1-50%	SLE p=0.004

* SLE: supervivencia libre de enfermedad; HR: hazard ratio

Una posible explicación para estos resultados opuestos en los que la expresión elevada de PD-L1 (empleando en estos casos el 5% como punto de corte) se correlaciona con una mejor supervivencia libre de enfermedad, sería que la vía del PD-L1 actúa con un doble efecto opuesto: si bien por un lado refleja un mecanismo del tumor para evadir la respuesta inmune, por otro lado resaltaría la existencia de una respuesta antitumoral que induce la expresión del marcador por parte del tumor, y que podría ser capaz de inhibir al menos parcialmente el crecimiento y desarrollo tumoral y proporcionar una mejor SLE.

Si analizamos el pronóstico en términos de SG, no se ha obtenido en nuestro estudio ninguna correlación estadísticamente significativa con la expresión de PD-L1

con los tres sistemas de categorización (5%, 50%, tres categorías). En el caso del 5% como punto de corte para expresión positiva de PD-L1, la SG para aquellos con expresión positiva fue de 87.42 meses, frente a 103.16 meses en los pacientes con un resultado negativo ($p=0.646$). Utilizando 50% como punto de corte, la SG para aquellos con expresión positiva fue de 81.20 meses frente a 103.24 meses en los pacientes con un resultado negativo ($p=0.468$). Finalmente, utilizando la categorización entre los casos con menos del 1% de células tumorales con expresión de PD-L1, casos con entre 1-49%, y casos por encima o igual al 50% de células tumorales PD-L1 positivas, se observó una SG de 102.54 meses, 93.78 meses y 81.20 meses respectivamente ($p=0.758$).

Son numerosos los estudios (93,96,97,101,102,106,116) que han mostrado una relación directa estadísticamente significativa entre expresión elevada de PD-L1 y pronóstico en términos de SG, como se muestra anteriormente en la tabla 5 de la Introducción, así como varios los meta-análisis que han descrito este efecto inverso entre expresión del marcador y supervivencia global (113–115). La explicación que de todos ellos se desprende radica en la utilización de la expresión de PD-L1 por el tumor con la finalidad de evadir la respuesta inmune antitumoral y progresar. Pero nuevamente se debe resaltar la existencia de trabajos que apuntan a un efecto protector de la expresión del marcador en términos de SG (89,98,100,105) como se muestra en la tabla 6 de la Introducción.

Esta disparidad de resultados, pone de relieve la necesidad de homogeneizar y sistematizar la evaluación de PD-L1, puesto que los tipos histológicos, los estadios incluidos y, sobretodo, la metodología empleada para evaluar la expresión del marcador, son heterogéneas y precisan de estandarización. Son numerosos los clones de anticuerpos para detección de PD-L1, así como los sistemas de detección, pero es aún más llamativa la heterogeneidad en los puntos de corte empleados para considerar un caso positivo, desde aquellos que han empleado únicamente los porcentajes de células tumorales con expresión independientemente de la intensidad, a aquellos que han desarrollado sistemas de puntuación en los que intensidad y porcentaje tienen cabida. No existe consenso sobre el número de muestras de un tumor que deben ser analizadas para limitar la heterogeneidad, ni el modo en que las mismas deben ser procesadas. Así mismo, la arbitraria determinación de puntos de

corte absolutos que convierten en categórica la variable continua de expresión de PD-L1 conlleva una mayor probabilidad de error en la valoración pronóstica, porque casos con expresiones muy similares pueden ser categorizados como opuestos y afectar a la veracidad de los resultados. En nuestro estudio, el tamaño muestral (tan sólo 165 casos fueron valorables, de los cuales 116 casos no expresaron PD-L1 en membrana celular) hace muy limitado el poder para detectar diferencias en términos de supervivencia y constituye una limitación a tener en consideración.

Por tanto, en este trabajo se ha podido demostrar una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 y la supervivencia libre de enfermedad con los datos disponibles en la muestra de este estudio, por lo que concluiríamos que la expresión de PD-L1 tiene valor pronóstico, y se recomendaría el análisis sistemático de la expresión de PD-L1 en membrana de células neoplásicas de tumores con las histología especificadas, en estadio inicial I-II, sin afectación ganglionar e intervenidos.

7.2.3. Respuesta al objetivo 3: Analizar la relación entre el índice proliferativo Ki-67 con variables clínicas y anatomopatológicas.

La expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 determinada mediante el anticuerpo monoclonal MIB1 se ha detectado en 149 casos (87.6%) con un valor mediana del 30% (P25-P75:16-38).

Se ha llevado a cabo un análisis para buscar asociación entre la expresión de Ki-67 y otras variables clínicas y patológicas.

Se han observado niveles de expresión de Ki-67 mayores en hombres que en mujeres (31.60 ± 18.09 vs. 20.73 ± 12.35 , en porcentajes), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.001$). Esta mayor expresión de Ki-67 en hombres ya se ha descrito previamente en la literatura. Ahn y cols. de 2014 (66) describieron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.002$) entre la expresión elevada ($\geq 40\%$) en hombres (26%) y en mujeres (4%). Kim y cols. en 2015 (74), también describieron una mayor expresión elevada ($\geq 10\%$) en hombres (61.5%) que en mujeres (35.6%), alcanzando esta diferencia la significación estadística ($p=0.004$). En el meta-análisis de Wen y cols. de 2015 (67) sobre 32 estudios con 5600 pacientes, se

describió una asociación entre la expresión de Ki-67 y el sexo masculino (OR 1.89; IC95% 1.53-2.33, $p=0.000$).

En los resultados de este estudio se ha observado también una mayor expresión de Ki-67 en pacientes fumadores que en los no fumadores, alcanzando esta diferencia la significación estadística (31.29 ± 17.32 vs. 14.84 ± 11.53 , en porcentajes; $p=0.000$). Así mismo se ha observado una relación directa entre la severidad del hábito tabáquico y la expresión del marcador, desde un valor medio de $14.84\pm 11.53\%$ en no fumadores hasta un valor medio de $36.29\pm 17.66\%$ en fumadores de >30 años/paquete (ver tabla 6 resultados).

De acuerdo con los resultados del presente estudio, el trabajo de Ahn y cols (66) describió una elevada expresión en fumadores (31% vs 10%) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0.024$), y el meta-análisis de Wen y cols. de 2015 (67) también describió esta mayor expresión en fumadores (OR 2.20; IC95% 1.72-2.82, $p=0.000$).

En relación al tipo histológico, se ha observado una mayor expresión de Ki-67 con significación estadística en los carcinomas escamosos y de célula grande que en los adenocarcinomas (21.35 ± 15.09 adenocarcinomas vs. 39.35 ± 15.22 carcinoma escamoso, $p=0.000$; 21.35 ± 15.09 adenocarcinomas vs. 38.17 ± 14.35 carcinoma célula grande, $p=0.003$). De entre los adenocarcinomas, se ha observado una diferencia estadísticamente significativa entre los distintos subtipos, con una expresión media creciente según el grado histológico: lepidicos 8.20 ± 5.88 , acinar/papilar 18.41 ± 12.15 , sólido/micropapilar 31.79 ± 15.26 .

Una de las principales asociaciones descritas en la literatura es en relación al tipo histológico. Los resultados descritos en la literatura, relativos a este aspecto amplíamente estudiado, apuntan a que los carcinomas escamosos expresan niveles mayores de Ki-67. Warth y cols.(68), describieron un mayor índice de Ki-67 en el carcinoma escamoso que en el adenocarcinoma (52.8% vs. 25.8%), así como una variabilidad según los subtipos de adenocarcinoma, con el subtipo sólido como el más proliferativo (39.4%), siendo el lepidico el menos proliferativo (9.5%), en concordancia con los resultados del presente estudio. Ahn y cols. (66) también describieron una mayor expresión en tipos no-adenocarcinoma (30% vs 11%, $P<0.012$). Por último, el meta-análisis de Wen y cols. (67) también presentó mayor expresión del marcador en

los subtipos no-adenocarcinoma (OR 1.88; IC95% 1.60-2.22, $p=0.000$), nuevamente en consonancia con los resultados del presente trabajo.

Finalmente se ha observado una relación directa entre la expresión creciente de Ki-67 y el grado nuclear, alcanzando dicha diferencia la significación estadística en las diferentes comparaciones, con un tamaño del efecto de $r=0.227$. Sobre esta asociación, el autor no ha encontrado referencias en la literatura al respecto. La Tabla 39 muestra los principales estudios que han observado estas correlaciones clínicas y patológicas.

Tabla 39. Principales estudios que avalan las correlaciones clínico-patológicas del presente estudio.

Estudio	Año	Variables correlacionadas
Ahn y cols.(66)	2014	Sexo $p=0.002$ Tabaco $p<0.024$ Tipo histológico $p<0.012$
Warth y cols. (68)	2014	Tipo histológico $p<0.0001$
Kim y cols.(74)	2015	Sexo $p=0.004$
Wen y cols.(67)	2015	Sexo $p=0.000$ Tabaco $p=0.000$ Tipo histológico $p=0.000$
Presente estudio	2017	Sexo $p=0.001$ Tabaco $p=0.000$ Tipo histológico $p=0.000/0.003$ Grado nuclear $p=0.000$

En concordancia con la mayoría de estudios publicados, en el presente estudio se ha observado una asociación entre niveles elevados de expresión de Ki-67 y otros factores de mal pronóstico en cáncer de pulmón como el tabaquismo, sexo varón, grado nuclear elevado y el grado histológico alto en adenocarcinomas (subtipos de peor pronóstico). Muchos estudios han correlacionado esta expresión elevada de Ki-67 con peor pronóstico en términos de SLE y SG en el caso de los adenocarcinomas, si bien esos y otros estudios han encontrado sobre el carcinoma escamoso la asociación inversa (67,68,70,72,142) a pesar de correlacionarse con dichas variables clínicas y patológicas de mal pronóstico.

En el presente estudio no se ha observado correlación pronóstica en la cohorte entera, ni en el análisis por tipo histológico, como se refleja en el apartado 1.2.1. Una explicación inicial podría ser atribuible a la presencia de adenocarcinomas y carcinomas escamosos, donde el efecto de Ki-67 parece opuesto, si bien el estudio por subgrupos empleando diferentes puntos de corte no ha sido capaz de determinar una correlación estadísticamente significativa para ninguna de los dos tipos histológicos. Por otro lado, y acorde a la literatura, parece existir una relación directa entre la expresión de Ki-67 y el grado de diferenciación de los adenocarcinomas, con un mayor índice de proliferación en los subtipos sólidos/micropapilares (61,143) reflejando probablemente categorías pronósticas. A pesar de ello, el escaso tamaño muestral y especialmente el bajo número de subtipos de adenocarcinoma con diferenciación sólida/micropapilar (N=28), puede haber limitado la capacidad para encontrar correlación pronóstica en los adenocarcinomas.

No se ha encontrado asociación del índice de actividad proliferativa Ki-67 con el estadio TNM ($p=0.071$) como se describe en otros trabajos (68), aunque sí una tendencia a una mayor expresión a mayor estadio (IA $27.32\pm 18.81\%$; IB $31.70\pm 14.73\%$; IIA $32.73\pm 17.30\%$). Una de las posibles explicaciones es el pequeño tamaño muestral, especialmente la representación limitada de estadios IIA (N=30;17.65%) y IIB (N=1;0.59%).

Tampoco se ha observado asociación con la edad ($p=0.190$), la invasión pleural ($p=0.501$) ni la expresión de PD-L1 ($p=0.955$).

7.2.4. Respuesta al objetivo 4: Analizar la relación entre la expresión de PD-L1 con variables clínicas y anatomopatológicas.

7.2.4.1. Expresión de PD-L1 en la muestra

La expresión del marcador PD-L1 determinada mediante el anticuerpo monoclonal anti PD-L1 22C3 ha sido valorable en 165 casos (97.1%), habiéndose detectado expresión positiva del mismo en 49 casos (28.8%) con un valor mediana del 30% (P25-P75:6.75-72.5). Utilizando como punto de corte para determinar la positividad el 1% de las células tumorales expresando el marcador, obtenemos un 26.5% de resultados positivos. Si el punto de corte es al menos el 5% de las células tumorales, un 24.7% serían resultados positivos, mientras que si el punto de corte lo elevamos al 50% de las células tumorales para discriminar aquellos tumores con elevada expresión de PD-L1, obtendríamos un 11.8% de resultados positivos.

Las cifras de expresión de PD-L1 en la muestra son similares a las encontradas por Zhou y cols.(113) en un meta-análisis con 877 casos, que presentaron una expresión de PD-L1 de entre el 24.8 y el 57.5% de los casos. Teniendo en cuenta que el presente estudio analiza estadios I-II, los resultados son muy similares a su vez a los encontrados por Cooper y cols. (89) sobre 681 casos de estadios I-III, que observaron un 28.2% de positividad con un punto de corte $\geq 1\%$ (26.5% en el presente estudio), y 7.4% de positividad con un punto de corte $\geq 50\%$ (11.8% en el presente estudio). Pan y cols. (114), en 2015, describieron un 42.6% de células tumorales con expresión de PD-L1 en un meta-análisis con 1550 casos, algo superior a las cifras del presente trabajo, si bien incluía estudios con diferentes puntos de corte y metodologías. Scheel y cols. (99) reportaron un 34.17% de casos con positividad para PD-L1 empleando $\geq 1\%$ de las células tumorales como punto de corte, sobre 436 casos con estadios I-IV. Chen y cols. en 2012 (93) describieron un 57.5% de positividad utilizando un score (IRS) que tenía en cuenta el porcentaje de células con expresión y la intensidad, sobre 120 casos con estadios I-III. Mu y cols. en 2011(97), sobre 103 casos en estadios I-III observaron un 53.2% de casos utilizando la mediana de un histoscore para determinar el punto de corte. Velcheti y cols. (98) sobre 544 estadios I-IV describieron expresión de PD-L1 entre el 25% y el 36% de los casos.

Los análisis de los estudios comentados anteriormente apuntan a que los resultados del presente estudio están dentro del rango de aquellos estudios que han

evaluado en cáncer de pulmón la expresión del marcador incluyendo estadios iniciales, como puede observarse en la Tabla 40. No obstante, puede observarse la gran variabilidad en la metodología empleada y los puntos de corte para determinar la positividad. Otros trabajos, como el de Mao y cols. de 2014 (96) sobre 128 estadios I-III, han reportado una positividad claramente superior de hasta el 72.7% de los casos, utilizando un punto de corte basado en el porcentaje de células con expresión y la intensidad de la misma; por lo que, a pesar de la concordancia con la literatura, es destacable la gran heterogeneidad en los resultados.

Tabla 40. Expresión de PD-L1 en la literatura.

Estudio	Año	Punto de corte PD-L1	Positividad
Mu y cols.(97)	2011	Score mediana	53.2%
Chen y cols.(93)	2012	Score ≥ 3	57.5%
D'Incecco y cols.(94)	2014	> 5%	55.3%
Cooper y cols. (89)	2015	$\geq 1\%$	28.2%
		$\geq 5\%$	7.4%
Zhou y cols.(113)	2015	(meta-análisis)	24.8 - 57.5%
Pan y cols.(114)	2015	(meta-análisis)	42.6%
Scheel y cols.(99)	2016	$\geq 1\%$	34.17%
Presente estudio	2017	Cualquier expresión	28.8%
		$\geq 1\%$	26.5%
		$\geq 5\%$	24.7%
		$\geq 50\%$	11.8%

Realizando un análisis por tipo histológico, observamos que, en nuestra muestra, un 19.8% de los casos de adenocarcinoma presentó algún grado de expresión de PD-L1, por 41.3% de los de carcinoma escamosos. La media de células tumorales con expresión para ambos tipos fue del $46.18 \pm 32.94\%$ en adenocarcinomas y $28.94 \pm 31.90\%$ en carcinomas escamosos. Estos resultados consideran cualquier porcentaje e intensidad de expresión de PD-L1, sin utilización de puntos de corte, y observamos una mayor proporción de casos con expresión del marcador en los carcinomas escamosos que en los adenocarcinomas.

Scheel y cols., en 2016 (99), observaron un porcentaje de células tumorales con expresión de PD-L1 similar en adenocarcinomas (34.4%) y en carcinomas escamosos (33.9%) utilizando un punto de corte muy bajo, es decir, considerando como positivo cualquier porcentaje de expresión $\geq 1\%$. Hung y cols., en 2016 (100), sobre 112 adenocarcinomas en estadios IA-IIIa reportaron un 88.4% de positividad para PD-L1, considerando intensidades de tinción débiles y altas independientemente del porcentaje de células. Zhang y cols., en 2014(106), sobre 143 adenocarcinomas en estadio I-III, describieron un 49% de positividad para PD-L1 empleando como punto de corte la mediana de un histoscore que ponderaba porcentaje e intensidad nuevamente. El mismo año publicaron Yang y cols. un trabajo sobre 163 adenocarcinomas en estadio I con un 39.9% de positividad, utilizando como criterio la expresión en al menos el 5% de las células tumorales ($\geq 5\%$). Ji y cols., en 2016, sobre 100 adenocarcinomas en estadios I-III, describieron un 40% de positividad al considerar intensidades moderadas-altas (≥ 2). Finalmente, Inamura y cols., en 2016, sobre 268 adenocarcinomas en todos los estadios (I-IV), obtuvieron una expresión de PD-L1 del 16% al considerar un punto de corte $\geq 5\%$ de las células tumorales.

En relación al carcinoma escamoso, para el cual en el presente estudio se encontró un 41.3% de los casos con positividad para PD-L1, destaca el trabajo de Yang y cols., de 2016 (105), sobre 105 estadios I de carcinoma escamoso, que empleando el 5% como punto de corte, observaron un 56.2% de resultados positivos, no muy lejos de lo observado en el presente trabajo.

El análisis pormenorizado de los estudios comentados anteriormente nos permite destacar la enorme variabilidad en la metodología, con utilización de puntos de corte no comparables (algunos basados exclusivamente en porcentaje de tinción y otros incluyendo la intensidad de la misma), distinta tecnología y diferentes kits para el

estudio inmunohistoquímico (ver tabla 4), y en muestras poblaciones que incluyen desde estadios iniciales hasta la totalidad de los estadios, pudiendo afectar esta heterogeneidad a la validez de cualquier comparación al respecto. Todo ello resalta la necesidad de desarrollar un sistema estándar para la evaluación de la expresión de PD-L1 y homogeneizar los criterios. Sería interesante diseñar un sistema que categorizase de un modo no dicotómico la expresión de este marcador (que en resumen es una variable cuantitativa), para no decantar resultados muy próximos a lados distintos de la balanza y poder así objetivar el efecto de las expresiones “elevadas” respecto a las expresiones “bajas”, pero considerando así mismo expresiones “intermedias” como punto de control o comparación.

7.2.4.2. Relación entre la expresión de PD-L1 con variables clínicas y anatomopatológicas

En el presente estudio se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el tipo histológico y la expresión de PD-L1, con una menor expresión en el carcinoma escamoso ($28.94 \pm 31.90\%$ de células tumorales) en comparación con el resto de tipos histológicos ($p=0.029$), que agrupados bajo la categoría de carcinomas no escamosos presentaría un resultado medio de $51.90 \pm 33.27\%$ ($p=0.017$; $r=0.34$). Esta asociación hace referencia al porcentaje de células tumorales promedio que expresan PD-L1 según subtipo histológico, no al número de casos que han presentado algún tipo de expresión de PD-L1, que ha supuesto 19 casos de adenocarcinoma (19.8%) con algún tipo de expresión de PD-L1, por 24 casos de carcinoma escamoso (41.3%).

Existen varios estudios que apuntan a esta variabilidad en la expresión de PD-L1 en muestras de cáncer de pulmón en función del tipo histológico. Mu y cols., en 2011 (97), analizaron la expresión del marcador en 109 casos en estadios I-III y, utilizando como punto de corte la mediana de un histoscore que ponderaba porcentaje e intensidad, encontraron un mayor porcentaje de casos con expresión de PD-L1 positiva en adenocarcinomas (65.2%) que en carcinomas escamosos (44.4%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.032$), si bien no se hacía referencia a los porcentajes promedios de expresión por tipo histológico. En un trabajo parecido en 2014, Azuma y cols. (116) describieron en el análisis multivariante de una muestra

de 164 CPCNP en estadio I-III, y utilizando para determinar el punto de corte un histoscore, una mayor expresión en adenocarcinomas que en carcinomas escamosos ($p < 0.001$), asociándose la histología adenocarcinoma con expresión elevada de PD-L1 en el análisis multivariante ($p = 0.046$). D'Incecco y cols. (94) también describieron esta mayor expresión en adenocarcinomas respecto a carcinomas escamosos (score 100 vs. score 0) al analizar, en 2015, 125 casos en estadio avanzado. Utilizando el $\geq 5\%$ de las células tumorales con intensidades medias/altas, se observó que el 88.1% de los adenocarcinomas, por un 11.9% de los carcinomas escamosos presentaron un resultado positivo, alcanzando esta diferencia la significación estadística ($p = 0.005$). Bien es cierto que los meta-análisis de Pan (y cols.), y Wang (y cols.) del año 2015 no pudieron objetivar asociación con el tipo histológico(114,115).

En la muestra del presente estudio se ha obtenido una correlación inversa estadísticamente significativa ($p = 0.033$) entre la expresión de PD-L1 y la edad, con una mayor expresión de PD-L1 a menor edad. Existen pocos estudios que hayan observado esta asociación, pero Cooper y cols., en 2015(89), sobre 681 CPCNP en estadio I-III observaron una menor edad en los pacientes con expresión elevada de PD-L1, tanto empleando un valor de histoscore ≥ 50 ($p = 0.07$) como utilizando un porcentaje $\geq 50\%$ como punto de corte ($p < 0.05$). Los principales meta-análisis no han sido capaces de demostrar esta asociación con la edad (88,113–115).

En la Tabla 41 pueden verse los principales estudios que avalan las correlaciones clinicopatológicas observadas en el presente estudio en relación a la sobre-expresión de PD-L1.

Tabla 41. Correlaciones de la sobre-expresión de PD-L1 en la literatura que avalan los resultados del presente estudio.

Estudio	Año	Variables correlacionadas
Mu y cols.(97)	2011	Tipo histológico p=0.032
Azuma y cols. (116)	2014	Tipo histológico p=0.046
D’Incecco y cols.(94)	2015	Tipo histológico p=0.005
Cooper y cols.(89)	2015	Edad p<0.05
Presente estudio	2017	Edad p=0.033 Tipo histológico p=0.029

En el presente estudio, la expresión de PD-L1 ha sido mayor en fumadores que en no fumadores (fumador 42 ± 34.39 vs. no fumador 20 ± 30.31), si bien esta asociación no ha alcanzado la significación estadística ($p=0.286$). Inamura y cols. (101) encontraron asociación en el análisis univariante entre positividad en la expresión de PD-L1 y antecedente de tabaquismo ($p=0.0056$), así como Chen y cols en 2013 (144). Por el contrario, Azuma y cols. (116), en 2014, describieron una mayor expresión de PD-L1 en pacientes sin antecedentes de exposición al tabaco ($p<0.001$). Los meta-análisis de Pan (y cols.), y Wang (y cols.), de 2015, no encontraron asociación entre la expresión de PD-L1 y el tabaquismo, por lo que no queda claro si existe correlación entre el hábito tabáquico y la expresión del marcador.

En el presente estudio no se ha encontrado correlación entre la expresión de PD-L1 y otras variables clínicas como el sexo ($p=0.078$), ni con otras variables patológicas como el estadio TNM final ($p=0.851$), la invasión pleural ($p=0.381$), el grado nuclear ($p=0.457$), el grado histológico en los adenocarcinomas ($p=0.291$) o la expresión de Ki-67 ($p=0.955$).

La única variable que ha podido ser correlacionada con la expresión de PD-L1, en varios meta-análisis y estudios aislados, es el grado de diferenciación tumoral. Pan y cols. (114) encontraron en su meta-análisis que tan sólo existía una asociación estadísticamente significativa entre el grado de diferenciación (bien/moderado vs.

pobrementemente) y la expresión de PD-L1 (OR 0.53; IC95% 0.39-0.72, $p < 0.0001$), fundamentalmente justificada en los resultados alcanzados en los trabajos de en los trabajos de Chen y Yang (93,104). Wang y cols. (115) también encontraron, en un meta-análisis, como única correlación estadísticamente significativa, el grado de diferenciación con la expresión de PD-L1 (OR 1.91; IC95% 1.33-2.75, $p = 0.001$). La diferenciación del tumor es la similitud del tejido tumoral con el tejido sano de origen, siendo la pobre diferenciación un factor pronóstico adverso, con lo que la expresión más elevada de PD-L1 en tumores con pobre diferenciación podría contribuir a su efecto pronóstico adverso facilitando el escape de la respuesta inmune anti-tumoral. Analizando la diferenciación de los adenocarcinomas mediante el grado histológico en el presente estudio, no se ha observado dicha correlación con la expresión de PD-L1. Los adenocarcinomas con grado 2 (acinares y papilares) expresaron en menor medida el marcador ($28.33 \pm 36.35\%$) en comparación con los lepidicos (55%) y los sólidos/micropapilares ($54.37 \pm 30.34\%$), sin alcanzar la significación estadística ($p = 0.291$).

En relación con el sexo, a pesar de que en el presente trabajo no se ha objetivado asociación estadísticamente significativa ($p = 0.078$), la tendencia ha mostrado una mayor expresión de PD-L1 en varones que en mujeres ($44.77 \pm 36.28\%$ vs. $27.96 \pm 24.27\%$). Inamura y cols. (101) encontraron asociación en el análisis univariante entre positividad en la expresión de PD-L1 y sexo masculino ($p = 0.0053$), mientras que Azuma y cols. (116) observaron mayor expresión en mujeres que en hombres ($p < 0.001$).

A pesar de que el presente estudio no ha encontrado asociación estadísticamente significativa entre el estadio TNM y la expresión de PD-L1 ($p = 0.851$), una tendencia hacia mayor expresión de PD-L1 en estadios II respecto a los I puede observarse en la tabla 11 de los resultados. Varios trabajos han descrito mayor expresión de PD-L1 a mayor estadio TNM: Chen y cols. en 2012 (93), sobre 120 estadios I-III, reportaron una mayor expresión a mayor estadio TNM (OR 11.05; IC95% 2.21-55.28, $p < 0.001$). Zhang y cols. en 2014 (106), sobre 143 adenocarcinomas en estadio I-III, describieron también una relación directa entre estadio y PD-L1 ($p = 0.005$). Finalmente, Mao y cols.(96), en un trabajo de 2014 sobre 128 tumores en estadio I-III, observaron el mismo efecto alcanzando la significación estadística ($p = 0.04$). Esta correlación observada en varios estudios sugiere que la expresión de PD-L1 podría considerarse

como un marcador de progresión de la enfermedad al asociarse a tumores con mayor extensión de la misma. Entre las posibles causas de que el presente estudio no haya objetivado dicha asociación, debemos considerar el escaso número de pacientes en estadio II (N=31, 18.24%); así como el hecho de que los estudios que han observado esta asociación incluyeron estadios III, mientras que el presente se ha limitado a estadios I-II, por lo que podría verse limitado en su potencia para encontrar esta correlación.





8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. La actividad proliferativa evaluada mediante Ki-67 no predice el pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad y global, en los pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en estadio inicial sin afectación ganglionar resecaos. La utilización de diferentes puntos de corte para la determinación de los resultados positivos arroja resultados contradictorios al respecto.
2. La sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en estadio inicial sin afectación ganglionar resecaos se correlaciona con una menor supervivencia libre de enfermedad, y por tanto un peor pronóstico en términos de recidiva. La utilización de diferentes puntos de corte para la determinación de los resultados positivos ha demostrado estadísticamente dicha correlación pronóstica, si bien es necesario profundizar en la determinación del punto de corte que tenga una mayor capacidad de predecir resultados en términos de supervivencia libre de enfermedad.
3. La sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en estadio inicial sin afectación ganglionar resecaos no se correlaciona con la supervivencia global.
4. El sexo masculino, el tabaquismo, los tipos histológicos escamoso y de célula grande, el grado nuclear alto, y el grado histológico alto (en adenocarcinomas), se correlacionan con una mayor actividad proliferativa evaluada mediante Ki-67 en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en estadio inicial sin afectación ganglionar resecaos.
5. Los pacientes más jóvenes presentan mayor expresión de PD-L1 en casos de cáncer de pulmón de célula no pequeña en estadio inicial sin afectación ganglionar resecaos.
6. Los carcinomas escamosos presentan con mayor frecuencia algún porcentaje de expresión de PD-L1 que otros subtipos histológicos, si bien muestran una menor expresión en porcentaje de células tumorales que los subtipos no escamosos en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña en estadio inicial sin afectación ganglionar resecaos.

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECAOS:

KI-67 Y PD-L1



9. BIBLIOGRAFÍA

1. American Cancer Society. www.cancer.org.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. Vol. 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. p. <http://globocan.iarc.f>.
3. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). www.seom.org.
4. Alberg AJ, Brock M V, Ford, et al. Epidemiology of Lung Cancer 3rd ed : American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2013;143(May):1–29.
5. Red Española de Registros de Cáncer. REDECAN. www.redecan.org.
6. International Agency for Research on Cancer (IARC). www.iarc.fr.
7. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics , 2016. 2016;66(1):7–30.
8. De Angelis R, Sant M, Coleman M, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. Lancet Oncol. 2014;15(1):23–34.
9. Deslauriers J, Patterson A, Cooper JD. Pearson's Thoracic and Esophageal Surgery 3rd edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2008.
10. Jemal A, Vineis P, Bray F, et al. El Atlas del Cáncer. Segunda edición. Atlanta, GA: American Cancer Society. 2014;
11. Baquet CR, Hunter CP. Patterns in minorities and special populations. In: Cancer prevention and control. 1995. p. 23–36.
12. Freund KM, Belanger AJ, D'Agostino RB, et al. The health risks of smoking the framingham study: 34 years of follow-up. Ann Epidemiol. 1993;3(4):417–24.
13. Doll R, Peto R. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers. J Epidemiol Community Health [Internet]. 1978;32(4):303–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1060963&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

14. Eriksen M, Mackay J, Schluger NW, et al. The Tobacco atlas [Internet]. Vol. 47, The Tobacco Atlas,. 2015. Available from:
/home/karim/Documents/Divers/Tabac/TA5_2015_WEB.pdf
15. Peto R, Darby S, Deo H, et al. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *Br Med J*. 2000;321(7257):323–9.
16. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer * Epidemiology of Lung Cancer *. *Chest* [Internet]. 2003;123(1 Suppl):21S–49S. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23649439>
17. Hirayama T. Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *Br Med J (Clin Res Ed)* [Internet]. 1981;282(6259):183–5. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1503989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Fajersztajn L, Veras M, Barrozo LV, et al. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013;13(9):674–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924644>
19. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: Prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*. 2013;14(9):813–22.
20. Darby S, Hill D, Auvinen A, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* [Internet]. 2005;330(7485):223. Available from:
<http://www.bmj.com/content/330/7485/223.short>
21. Darby S, Hill D, Doll R. Radon: A likely carcinogen at all exposures. Vol. 12, *Annals of Oncology*. 2001. p. 1341–51.
22. Herranz AD. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica y cáncer de pulmón : implicaciones prácticas. 2017;240–7.
23. Hubbard R, Venn A, Lewis S, et al. Lung cancer and cryptogenic fibrosing

- alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2000;161(1):5–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619790>
24. Linseisen J, Rohrmann S, Miller AB, et al. Fruit and vegetable consumption and lung cancer risk: updated information from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2007;121(5):1103–14.
 25. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* [Internet]. 2005;93(7):825–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 26. Gianni G, Chimlan R, Qiao Z. CYP2D6 and GSTM1 genetic polymorphism and lung cancer susceptibility. *Chinese J Oncol*. 1998;20(3):185–6.
 27. Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S, et al. Polymorphism in CYP1A1 and CYP2D6 genes: Possible association with susceptibility to lung cancer. In: *Environmental Health Perspectives*. 1993. p. 109–12.
 28. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: Pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(9):1681–90.
 29. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015;10(9):1243–60. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01243894-900000000-98927%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26291008%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086415335711>
 30. 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* [Internet]. 2011;6(2):244–85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4513953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

trez&rendertype=abstract

31. Nitadori JI, Bograd AJ, Kadota K, et al. Impact of micropapillary histologic subtype in selecting limited resection vs lobectomy for lung adenocarcinoma of 2cm or smaller. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(16):1212–20.
32. 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):706–14.
33. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Vol. 10, *Clinical Oncology.* 2009.
34. Rusch VW, Asamura H, Rami-porta R, et al. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac ... [Internet].* 2009;4(5):568–77. Available from: http://journals.lww.com/jto/Abstract/2009/05000/The_IASLC_Lung_Cancer_Staging_Project__A_Proposal.4.aspx
35. 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.
36. Vansteenkiste J, Crino L, Doms C, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early stage non-small cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol [Internet].* 2014;25(May 2013):1462–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24562446>
37. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Guideline Non-Small Cell Lung Cancer Version 3.2017. [Internet]. © 2016 National Comprehensive Cancer Network, Inc. 2017. Available from: NCCN.org
38. García-Campelo R, R B, Cobo M. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015. *Clin Trans Oncol.* 2015;(12):102029.

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

39. Howlader N, Noone A, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015. [Internet]. [Http://Seer.Cancer.Gov/Csr/1975_2012/](http://Seer.Cancer.Gov/Csr/1975_2012/). 2015. p. 1–101. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/sections.html
40. Tanoue LT, Detterbeck FC. New TNM classification for non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* [Internet]. 2009;9(4):413–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975377>
41. Goodgame B, Viswanathan A, Miller CR, et al. A clinical model to estimate recurrence risk in resected stage I non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* [Internet]. 2008;31(1):22–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18376223>
42. Sereno Moyano M, Gonzalez Barón M, Redondo Sánchez A, et al. Factores pronósticos del cáncer de pulmón. *Revis en cáncer* [Internet]. 2003;17(2):43–55. Available from: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/extart?codigo=498613>
43. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. Vol. 5, *American Journal of Clinical Oncology*. 1982. p. 649–56.
44. Braun DP, Gupta D, Staren ED. Quality of life assessment as a predictor of survival in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* [Internet]. 2011;11:353. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843358><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3171386/pdf/1471-2407-11-353.pdf>
45. Marcos M, Martínez E, Meiriño R, et al. Factores pronósticos del cáncer de pulmón Prognostic factors in lung cancer. 2001;24:83–97.
46. Mountain C, Lukeman J, Hammar S. Lung cancer classification: the relationship of disease extent and cell type to survival in clinical trials population. *J Surg Oncol*. 1987;35(3):147–56.
47. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung

- cancer: A decade of progress. *Chest* [Internet]. 2002;122(3):1037–57. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12226051><http://chestjournal.chestpubs.org/content/122/3/1037.full.pdf>
48. Cha MJ, Lee HY, Lee KS, et al. Micropapillary and solid subtypes of invasive lung adenocarcinoma: Clinical predictors of histopathology and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147(3).
 49. Ujiie H, Kadota K, Chaft JE, et al. Solid predominant histologic subtype in resected stage I lung adenocarcinoma is an independent predictor of early, extrathoracic, multisite recurrence and of poor postrecurrence survival. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2877–84.
 50. Tsao MS, Marguet S, Le Teuff G, et al. Subtype Classification of Lung Adenocarcinoma Predicts Benefit From Adjuvant Chemotherapy in Patients Undergoing Complete Resection. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015;33(30):3439–46. Available from:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=25918286
 51. Brambilla C, Laffaire J, Lantuejoul S, et al. Lung squamous cell carcinomas with basaloid histology represent a specific molecular entity. *Clin Cancer Res*. 2014;20(22):5777–86.
 52. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2011;24(5):653–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252858>
 53. 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*. 2012;30(13):1438–46.
 54. Sige CS, Rudomina DE, Sima CS, et al. Predicting pulmonary adenocarcinoma outcome based on a cytology grading system. Vol. 120, *Cancer Cytopathology*. 2012. p. 35–43.

55. Yanagi S, Sugiura H, Morikawa T, et al. Tumor size does not have prognostic significance in Stage Ia NSCLC. *Anticancer Res.* 2000;20(2 B):1155–8.
56. Pujol J-L, Molinier O, Ebert W, et al. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer* [Internet]. 2004;90(11):2097–105. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
57. Garcia Lujan R, Conde Gallego E, Lopez Rios F, et al. [Prognostic value study of lung cancer molecular markers]. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2009;132(14):529–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19368933>
58. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, et al. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2012;103(4):760–6.
59. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983;31(1):13–20.
60. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, et al. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):624–35.
61. Jakobsen JN, Sørensen JB. Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2013;79(1):1–7.
62. Luporsi E, André F, Spyrtatos F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2012;132(3):895–915. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3332349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Khor LY, Bae K, Paulus R, et al. MDM2 and Ki-67 predict for distant metastasis and mortality in men treated with radiotherapy and androgen deprivation for prostate cancer: RTOG 92-02. *J Clin Oncol.* 2009;27(19):3177–84.

64. Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, et al. Ki-67 proliferation index: correlation with prognostic parameters and outcome in multiple myeloma. *Am J Clin Oncol*. 2004;27(1):8–13.
65. Allegra CJ, Paik S, Colangelo LH, et al. Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Dukes' B and C colon cancer: A National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project collaborative study. *J Clin Oncol*. 2003;21(2):241–50.
66. Ahn HK, Jung M, Ha SY, et al. Clinical significance of Ki-67 and p53 expression in curatively resected non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* [Internet]. 2014;35(6):5735–40. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13277-014-1760-0>
67. Wen S, Zhou W, Li C, et al. Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies. *BMC Cancer* [Internet]. 2015;15(1):520. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/15/520>
68. Warth A, Cortis J, Soltermann A, et al. Tumour cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role. *Br J Cancer* [Internet]. 2014;111(6):1222–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25051406>
69. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2004;91(12):2018–25.
70. Hommura F, Dosaka-akita H, Mishina T, et al. Prognostic Significance of p27 KIP1 Protein and Ki-67 Growth Fraction in Non-small Cell Lung Cancers. 2000;6(October):4073–81.
71. Haga Y, Hiroshima K, Iyoda A, et al. Ki-67 expression and prognosis for smokers with resected stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2003;75(6):1727-32-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12822607>
72. Takahashi S, Kamata Y, Tamo W, et al. Relationship between postoperative

- recurrence and expression of cyclin E, p27, and Ki-67 in non-small cell lung cancer without lymph node metastases. *Int J Clin Oncol*. 2002;7(6):349–55.
73. Tubiana M, Courdi A. Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long-term survival. *Radiother Oncol*. 1989;15(1):1–18.
74. Kim C-H, Lee HS, Park J-H, et al. Prognostic role of p53 and Ki-67 immunohistochemical expression in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a retrospective study. *J Thorac Dis [Internet]*. 2015;7(5):822–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4454875&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell [Internet]*. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
76. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Nat Immunol [Internet]*. 2002;3(11):991–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
77. Liu Y, Zeng G. Cancer and innate immune system interactions: translational potentials for cancer immunotherapy. *J Immunother [Internet]*. 2012;35(4):299–308. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22495387>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3331796>
78. Carbone DP, Gandara DR, Antonia SJ, et al. Non – Small-Cell Lung Cancer Role of the Immune System and Potential for Immunotherapy. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2015;10(7):974–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000551>
79. Ott IM, Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer [Internet]*. 2012;12(April):265–77. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3433802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

80. Kerr KM, Nicolson MC. Non-Small Cell Lung Cancer, PD-L1, and the Pathologist. *Arch Pathol Lab Med* [Internet]. 2016;140(3):249–54. Available from: <http://www.archivesofpathology.org/doi/10.5858/arpa.2015-0303-SA%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26927720>
81. Ostrand-Rosenberg S. Immune Surveillance: A Balance Between Pro- and Anti-tumor Immunity. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1):11–8.
82. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-)* [Internet]. 2011;331(6024):1565–70. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/331/6024/1565.abstract>
83. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2014;480(7378):480–9.
84. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005;(5):263–74.
85. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;(12):252–64.
86. Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol*. 2002;168(9):4272–6.
87. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61(12):4766–72.
88. Zhong A. Prognostic value of programmed cell death-ligand 1 expression in patients with non-small-cell lung cancer : evidence from an updated meta-analysis. 2015;3595–601.
89. Cooper WA, Tran T, Vilain RE, et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer* [Internet]. 2015;89(2):181–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.05.007>

90. Zhang Y, Huang S, Gong D, et al. Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer. *Cell Mol Immunol*. 2010;7(March):389–95.
91. Shukuya T, Carbone DP. Predictive Markers for the Efficacy of Anti – PD-1 / PD-L1 Antibodies in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016;11(7):976–88. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.02.015>
92. Cree IA, Booton R, Cane P, et al. PD-L1 testing for lung cancer in the UK: recognizing the challenges for implementation. *Histopathology*. 2016;69(2):177–86.
93. Chen Y, Mu C-Y, Huang J-A. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: a 5-year-follow-up study. *Tumori* [Internet]. 2012;98(6):751–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389362>
94. D’Incecco A, Andreozzi M, Ludovini V, et al. PD-1 and PD-L1 expression in molecularly selected non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* [Internet]. 2015;112(1):95–102. Available from: <http://www.nature.com.ezp-prod1.hul.harvard.edu/bjc/journal/v112/n1/full/bjc2014555a.html>
95. Ilie M, Long-Mira E, Bence C, et al. Comparative study of the PD-L1 status between surgically resected specimens and matched biopsies of NSCLC patients reveal major discordances: A potential issue for anti-PD-L1 therapeutic strategies. *Ann Oncol*. 2016;27(1):147–53.
96. Mao Y, Li W, Chen K, et al. B7-H1 and B7-H3 are independent predictors of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015;6(5):3452–61.
97. Mu CY, Huang JA, Chen Y, et al. High expression of PD-L1 in lung cancer may contribute to poor prognosis and tumor cells immune escape through suppressing tumor infiltrating dendritic cells maturation. *Med Oncol*. 2011;28(3):682–8.
98. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Investig* [Internet].

- 2014;94(1):107–16. Available from:
<http://www.nature.com/doi/10.1038/labinvest.2013.130>
99. Scheel AH, Ansén S, Schultheis AM, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016;5(5):e1131379. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27467949>
 100. Hung J-J, Huang S-F, Shen Y-Y, et al. Prognostic Significance of Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression in Patients With Resected Lung Adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2016;1–8. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2016.07.074>
 101. Inamura K, Yokouchi Y, Sakakibara R, et al. Relationship of tumor PD-L1 expression with *EGFR* wild-type status and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol* [Internet]. 2016;46(10):935–41. Available from: <http://jjco.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jjco/hyw087>
 102. Ji M, Liu Y, Li Q, et al. PD-1/PD-L1 expression in non-small-cell lung cancer and its correlation with *EGFR/KRAS* mutations. *Cancer Biol Ther*. 2016;17(4):407–13.
 103. Lin C, Chen X, Li M, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression Predicts Tyrosine Kinase Inhibitor Response and Better Prognosis in a Cohort of Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2015;16(5):e25–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clcc.2015.02.002>
 104. Yang CY, Lin MW, Chang YL, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage i pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer* [Internet]. 2014;50(7):1361–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.01.018>
 105. Yang CY, Lin MW, Chang YL, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression is associated with a favourable immune microenvironment and better overall survival in stage i pulmonary squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* [Internet]. 2016;57(7):91–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2015.12.033>

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

106. Zhang Y, Wang L, Li Y, et al. Protein expression of programmed death 1 ligand 1 and ligand 2 independently predict poor prognosis in surgically resected lung adenocarcinoma. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2014;7:567–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748806><http://www.dovepress.com/getfile.php?fileID=19653>
107. Akbay EA, Koyama S, Carretero J, et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov*. 2013;3(12):1355–63.
108. Tang Y, Fang W, Zhang Y, et al. The association between PD-L1 and EGFR status and the prognostic value of PD-L1 in advanced non-small cell lung cancer patients treated with EGFR-TKIs Patient characteristics. *Oncotarget*. 2015;6(16):14209–19.
109. Kitazono S, Fujiwara Y, Tsuta K, et al. Reliability of Small Biopsy Samples Compared With Resected Specimens for the Determination of Programmed Death-Ligand 1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2015;16(5):385–90.
110. Yu H, Boyle TA, Zhou C. PD-L1 Expression in Lung Cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016;11(7):964–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.04.014>
111. Hirsch FR, Mcelhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the “Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project.” *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.11.2228>
112. Kerr KM, Tsao M, Nicholson AG, et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015;10(7):985–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000526>
113. Zhou ZJ, Zhan P, Song Y. PD-L1 over-expression and survival in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2015;4(2):203–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4384212/pdf/tlcr-04-02-203.pdf>

114. Pan Z-K, Ye F, Wu X, et al. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand1 (PD-L1) expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *J Thorac Dis* [Internet]. 2015;7(3):462–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922726>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4387432>
115. Wang A, Wang HY, Liu Y, et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(4):450–6.
116. Azuma K, Ota K, Kawahara A, et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2014;25(10):1935–40.
117. Gandini S, Massi D, Mandalà M. Critical Reviews in Oncology / Hematology PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1 / PD-L1 antibodies : A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol / Hematol* [Internet]. 2016;100:88–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.02.001>
118. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;373(2):123–35. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1504627>
119. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. checkmate 017 Nivolumab. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;373(17):1627–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412456>
120. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;372(21):2018–28. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1501824>
121. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540–50.

122. L H, Spigel DR, Gettinger SN. Clinical activity, safety and predictive biomarkers of the engineered antibody MPDL3280A (anti-PDL1) in non-small cell lung cancer (NSCLC): update from a phase Ia study. *J Clin Oncol.* 2015;33:8029.
123. Vansteenkiste J, Fehrenbacher L, Spira A. Atezolizumab monotherapy vs docetaxel in 2L/3L non-small cell lung cancer: Primary analyses for efficacy, safety, and predictive biomarkers from a randomized phase II study (POPLAR). *Lancet.* 2016;387(10030):1837–46.
124. Spigel DR, Chaft J, Gettinger SN. Clinical activity and safety from a phase II study (FIR) of MPDL3280A (anti-PDL1) in PD-L1–selected patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol.* 2015;33:8028.
125. Besse B, M J, Jänne P. Phase II single-arm trial (BIRCH) of atezolizumab as first-line or subsequent therapy for locally advanced or metastatic PD-L1-selected non-small cell cancer. *Pap Present 2015 Eur Cancer Congr Sept 25–29, 2015; Vienna, Austria.*
126. Spira A, Park K, Mazieres J, Al. E. Efficacy, safety and predictive biomarker results from a randomized phase II study comparing MPDL3280A vs docetaxel in 2L/3L NSCLC (POPLAR) [abstract 8010]. *2J Clin Oncol.* 2015;(33 (suppl)).
127. Gulley J, Rajan A, DR S. Avelumab (MSB0010718C), an anti-PD-L1 antibody, in patients with metastatic or recurrent non-small-cell lung cancer progressing after platinum-based chemotherapy: A phase Ib trial. *Pap Present 2015 Eur Cancer Congr Sept 25–29, 2015; Vienna, Austria.*
128. Higgs B, Robbins P, Blake-Haskins J. High tumoral IFN γ mRNA, PD-L1 protein, and combined IFN γ mRNA/PD-L1 protein expression associates with response to durvalumab (anti-PD-L1) monotherapy in NSCLC patients. *Pap Present 2015 Eur Cancer Congr Sept 25–29, 2015; Vienna, Austria.*
129. NCCN. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer [Internet]. Version 1.2016. 2016. p. 1–191. Available from: www.nccn.org/patients
130. AB B, AP V, Cederquist L. Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw.* 2017;15(3):370–98.

131. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol.* 2005;40(2):90–7.
132. Surgeons SS of T. STS General Thoracic Surgery Database Data Specifications Version 2.3. 2011; Available from: www.sts.org
133. Herbert WH. Cigarette smoking and arteriographically demonstrable coronary artery disease. *Chest.* 1975;67(1):49–52.
134. Woo T, Okudela K, Yazawa T, et al. Prognostic value of KRAS mutations and Ki-67 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Lung Cancer [Internet].* 2009;65(3):355–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19162366>
135. Pelosi G, Frassetto F, Pasini F, et al. Immunoreactivity for thyroid transcription factor-1 in stage I non-small cell carcinomas of the lung. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(3):363–72.
136. Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T, et al. Prognostic significance of p27(KIP1) protein and Ki-67 growth fraction in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 2000;6(10):4073–81.
137. Yamashita S ichi, Moroga T, Tokuisi K, et al. Ki-67 labeling index is associated with recurrence after segmentectomy under video-assisted thoracoscopic surgery in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;17(4):341–6.
138. Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, et al. CE NCCN Guidelines © Insights : Non – Small Cell Lung Cancer , Featured Updates to the NCCN Guidelines. 2016;14(March).
139. Hirsch FR, McElhinny A, Stanforth D, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assays for Lung Cancer: Results from Phase 1 of the “Blueprint PD-L1 IHC Assay Comparison Project.” *J Thorac Oncol [Internet].* 2016; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27913228%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1556086416335365>
140. Harpole Jr D, Herndon 2nd J, Wolfe W, et al. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation,

- histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res.* 1995;55:51–6.
141. Mehdi S, Ezzell J, Newman N, et al. Prognostic significance of Ki-67 immunostaining and symptoms in resected stage I and II non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 98AD;20:99–108.
 142. Poleri C, Molero J, Nieva B, et al. Risk of recurrence in patients with surgically resected stage I non-small cell lung carcinoma: Histopathologic and immunohistochemical analysis. *Chest.* 2003;123:1858–67.
 143. Bryant CM, Albertus DL, Kim S, et al. Clinically relevant characterization of lung adenocarcinoma subtypes based on cellular pathways: An international validation study. *PLoS One.* 2010;5(7).
 144. Chen YY, Wang LB, Zhu HL, et al. Relationship between programmed death-ligand 1 and clinicopathological characteristics in non-small cell lung cancer patients. *Chinese Med Sci J.* 2013;28(3):147–51.





10. ABREVIATURAS

AACR	Asociación Americana Investigación del Cáncer (inglés)
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
AP	Anatomía Patológica
ATS	American Thoracic Society
BAG	Biopsia con aguja gruesa
CCG	Carcinoma de célula grande
CEA	Antígeno carcinoembrionario
CPNCP	Cáncer de pulmón no de célula pequeña
CPA's	Células presentadoras de antígenos
CT's	Células Tumorales
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocytes antigen-4
CYFRA21-1	Fragmento 19 de la citoqueratina
DC's	Células dendríticas (inglés)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (inglés)
EBUS	Ecobroncoscopia (inglés)
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidérmico (inglés)
EMA	Agencia Europea del Medicamento
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERS	European Respiratory Society
FDA	Administración de fármacos y alimentos de los EEUU
FP	Factores pronóstico
H/E	Hematoxilina/Eosina
HGUA	Hospital General Universitario Alicante
HR	Hazard ratio
IARC	International Agency for Research on Cancer
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
ICs	Células Inmunes (inglés)
ICI's	Inhibidores de puntos de control inmunes (inglés)
IHQ	Inmunohistoquímica
KRAS	Kirsten rat sarcoma
LAM	Linfangiomiomatosis
mAb	Anticuerpo monoclonal (inglés)

MDSC	Células supresoras derivadas mieloides (inglés)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (inglés)
NIH	National Institute of Health
NUT	Proteína nuclear en testes (inglés)
OR	Odds ratio
OMS (WHO)	Organización Mundial de la Salud
PAAF	Punción-aspiración con aguja fina
PET	Tomografía por emisión de positrones
PD-1	Programme death-1 receptor
PD-L1	Protein death -1 ligand
PS	Performance status / estado general
QT	Quimioterapia
RNA	Ácido ribonucleico
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SEPAR	Sociedad Española de Patología Respiratoria
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SG	Supervivencia Global
STS	Sociedad de Cirujanos Torácicos (inglés)
TAC	Tomografía computarizada
TIL's	Linfocitos infiltrantes de tumor
TKI's	Inhibidores de la tirosin kinasa (ingles)
TMA's	Tissue microarrays
TPS	Tumor Proportion Score
TTF-1	Thyroid Transcription factor 1
UICC	Unión Internacional para el Control del Cáncer
VATS	Video-assisted Thoracic Surgery



11. ANEXOS

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

ANEXO I – CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Variable	Codificación
Número historia clínico (NHC)	-
Edad	-
Sexo	1: Mujer 2: Hombre
Fumador	0: No fumador 1: Fumador
Tabaquismo	1: Leve (5-15 años/paq) 2: Moderado (16-30 años/paq) 3: Severo (>30 años/paq)
Fecha cirugía	-
Tipo de resección	1: Neumonectomía 2: Lobectomía 3: Bilobectomía 4: Segmentectomía anatómica 5: Wedge
Lado	1: Izquierdo 2: Derecho
Lóbulo	1: LSI 2: LII 3: LSD 4: LM 5: LID
Fecha último seguimiento	-

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

Tamaño tumoral (cm)	-
Tipo histológico	1: Carcinoma escamoso 2: Adenocarcinoma 3: Carcinoma de célula grande 4: Adenoescamoso
Invasión pleural	1: No 2: Sí
Grado nuclear	1: Bajo 2: Intermedio 3: Alto
Grado histológico	1: Lepídico 2: Acinar/papilar 3: Sólido/micropapilar
Número de ganglios resecados	-
Estadio patológico TNM	1: IA 2: IB 3: IIA 4: IIB
Recidiva	1: Sí 2: No
Fecha recidiva	-
Supervivencia libre de enfermedad (meses)	-
Tipo de recidiva	1. Local. 2. A distancia. 3. Ganglionar. 4. Pleural. 5. Local + ganglionar. 6. Local + pleural.

ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

	7. Local + ganglionar + a distancia. 8. Ganglionar + a distancia. 9. Local + a distancia.
Exitus	1: Vivo 2: Exitus
Fecha de exitus	-
Supervivencia global (meses)	-
Ki-67 (%)	-
PD-L1 (%)	-
PD-L1 intensidad	0: Ausente 1+: Débil 2+: Moderada 3+: Fuerte



ANEXO II – COMUNICACIÓN ORAL CONGRESO NACIONAL SECT 2017

Comunicación oral remitida al VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Cirugía Torácica, celebrado en Zaragoza los días 11 y 12 de Mayo de 2017, con los resultados de un análisis preliminar con 150 pacientes de la cohorte.

Título: Análisis de la expresión y valor pronóstico de PD-L1 en estadios iniciales de Carcinoma pulmonar de célula no pequeña resecao

Autores: C. Gálvez (1), S. Bolufer (1), E. Gálvez (2), F. Lirio (1), J. Sesma (1), J. Gallego (1), M.F. Sanchez (1), B. Baschwitz (1), I. Aranda Lopez (1)

Centros: (1) Hospital General Universitario, Alicante, (2) Hospital General Universitario, Elda

Texto comunicación:

Introducción y Objetivo: PD-L1 es una proteína ligando de PD-1 expresada en células tumorales de multitud de neoplasias distintas, relacionada con la capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune antitumoral. El objetivo es analizar la prevalencia y el valor pronóstico de la expresión de PD-L1 en pacientes con Carcinoma de Pulmón de Célula No Pequeña (CPCNP) en estadios iniciales sin afectación ganglionar intervenidos quirúrgicamente.

Material y métodos: Se ha analizado retrospectivamente las muestras de 150 pacientes con CPCNP estadios I y II (pN0), sin tratamiento neoadyuvante, intervenidos entre 2003 y 2010 en nuestro centro, de los que se dispone de seguimiento. La tinción inmunohistoquímica de PD-L1 (Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx) se realizó sobre secciones obtenidas de TMAs (tissue microarrays). Los resultados obtenidos se correlacionaron (Ji cuadrado y test de Fisher) con variables clinicopatológicas (sexo, edad, tabaquismo, tamaño tumoral, estadio patológico, tipo histológico, grado nuclear, número de mitosis, Ki67). Para el análisis de supervivencia (libre de enfermedad y global) se utilizaron las curvas de Kaplan-Meier con la prueba de los rangos logarítmicos (Log rank test), y el método proporcional de Cox tomando los valores negativos como referencia.

Resultados. La edad media de los pacientes fue de 66 años (44-85), 117 hombres

(78%) y 33 mujeres (22%). El 90% eran fumadores. La mediana de seguimiento fue de 64 meses (rango 2-161). En cuanto a la distribución por estadios, el 48% correspondían a estadio patológico IA, el 30% a estadio IB y el 20% a estadio II (pT2bN0). En relación a los subtipos histológicos el 61% fueron adenocarcinomas (AD), en segundo lugar con un 33% carcinomas de células escamosas (CCE) y el 6% carcinomas de célula grande (CCG). El 28% de los casos fueron positivos para PD-L1 ($\geq 1\%$ células tumorales, tinción de membrana). Para el análisis se estableció 5% como punto de corte basándonos en la literatura. En cuanto a la relación con variables clinicopatológicas, se encontró asociación entre la expresión de PD-L1 y menor edad ($p=0,006$), tabaquismo ($p=0,04$), grado nuclear alto ($p=0,04$), Ki67 alto ($p=0,006$) y tendencia a la asociación con tipo histológico (mayor en CCG y CCE, $p=0,057$) y mayor número de mitosis ($p=0,07$). No se encontró asociación con el tamaño tumoral ni el estadio patológico. El análisis de Kaplan-Meier demostró una menor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes PD-L1 positivos (79 versus 120 meses; HR 1,96; IC 95% 1,11-3,48; $p=0,018$). No se observaron diferencias significativas en relación con la supervivencia global ($p=n.s$).

Conclusión. La expresión de PD-L1 en el CPCNP en estadio inicial sin afectación ganglionar operado, se asocia con datos morfológicos de mayor agresividad y es un factor de riesgo de recaída. No se ha observado significación en relación con la supervivencia global.



SE CT 8º CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE CIRUGÍA TORÁCICA **ZARAGOZA**
10/12 mayo 2017

JOSÉ MARCELO GALBIS CARVAJAL
Presidente de la SECT

Por medio de la presente certifica que

C. Gálvez Muñoz, S. Bolufer, E. Gálvez Muñoz, F. Lirio, J. Sesma, J. Gallego, M.F. Sanchez, B. Baschwitz, I. Aranda Lopez

han presentado la Comunicación tipo **ORAL**, titulada:

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN Y VALOR PRONÓSTICO DE PD-L1 EN ESTADIOS INICIALES DE CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULA NO PEQUEÑA RESECADO

VIII Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Torácica

celebrado en Zaragoza el 11 y 12 de mayo de 2017.

Y para que así conste a todos los efectos, firma la presente **CERTIFICACIÓN**, en Zaragoza, mayo de 2017.


José Marcelo Galbis Carvajal
Presidente de la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT)


Florentino Hernando Tranco
Vicepresidente de la Sociedad Española de Cirugía Torácica (SECT)



ANÁLISIS DE FACTORES PRONÓSTICOS EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN RESECADOS:

KI-67 Y PD-L1

ANEXO III – COMUNICACIÓN ORAL CONGRESO NACIONAL SEAP-IAP 2017

Comunicación oral remitida al XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP-IAP), XXIII Congreso Nacional de Citología (SEC) y IV Congreso Nacional de Patología Forense (SEPAF), celebrado en Valencia los días 24 a 26 de Mayo de 2017, con los resultados de un análisis preliminar con 150 pacientes de la cohorte.

Título: Expresión y significado pronóstico de PD-L1 en carcinoma pulmonar de célula no pequeña estadios I y II sin ganglios positivos.

Autores: F. I. Aranda López (1), C. Gálvez Muñoz (2), E. Costa Navarro (1), F. J. Illán Gambín (1), M.F. Sanchez de la Fuente (1).

Centros: (1) Anatomía Patológica Hospital General Universitario Alicante, (2) Cirugía Torácica Hospital General Universitario Alicante.

Texto comunicación:

Introducción y Objetivo: PD-L1 es una proteína ligando de PD-1 expresada en células tumorales de multitud de neoplasias distintas, relacionada con la capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune antitumoral. El objetivo es analizar la prevalencia y el valor pronóstico de la expresión de PD-L1 en pacientes con Carcinoma de Pulmón de Célula No Pequeña (CPCNP) en estadios iniciales sin afectación ganglionar intervenidos quirúrgicamente.

Material y métodos: Se ha analizado retrospectivamente las muestras de 150 pacientes con CPCNP estadios I y II (pN0), sin tratamiento neoadyuvante, intervenidos entre 2003 y 2010 en nuestro centro, de los que se dispone de seguimiento. La tinción inmunohistoquímica de PD-L1 (Dako PD-L1 IHC 22C3 pharmDx) se realizó sobre secciones obtenidas de TMAs (tissue microarrays). Los resultados obtenidos se correlacionaron (Ji cuadrado y test de Fisher) con variables clinicopatológicas (sexo, edad, tabaquismo, tamaño tumoral, estadio patológico, tipo histológico, grado nuclear, número de mitosis, Ki67). Para el análisis de supervivencia (libre de enfermedad y global) se utilizaron las curvas de Kaplan-Meier con la prueba de los rangos logarítmicos (Log rank test), y el método proporcional de Cox tomando los valores negativos como

referencia.

Resultados. La edad media de los pacientes fue de 66 años (44-85), 117 hombres (78%) y 33 mujeres (22%). El 90% eran fumadores. La mediana de seguimiento fue de 64 meses (rango 2-161). En cuanto a la distribución por estadios, el 48% correspondían a estadio patológico IA, el 30% a estadio IB y el 20% a estadio II (pT2bN0). En relación a los subtipos histológicos el 61% fueron adenocarcinomas (AD), en segundo lugar con un 33% carcinomas de células escamosas (CCE) y el 6% carcinomas de célula grande (CCG). El 28% de los casos fueron positivos para PD-L1 ($\geq 1\%$ células tumorales, tinción de membrana). Para el análisis se estableció 5% como punto de corte basándonos en la literatura. En cuanto a la relación con variables clinicopatológicas, se encontró asociación entre la expresión de PD-L1 y menor edad ($p=0,006$), tabaquismo ($p=0,04$), grado nuclear alto ($p=0,04$), Ki67 alto ($p=0,006$) y tendencia a la asociación con tipo histológico (mayor en CCG y CCE, $p=0,057$) y mayor número de mitosis ($p=0,07$). No se encontró asociación con el tamaño tumoral ni el estadio patológico. El análisis de Kaplan-Meier demostró una menor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes PD-L1 positivos (79 versus 120 meses; HR 1,96; IC 95% 1,11-3,48; $p=0,018$). No se observaron diferencias significativas en relación con la supervivencia global ($p=n.s$).

Conclusión. La expresión de PD-L1 en el CPCNP en estadio inicial sin afectación ganglionar operado, se asocia con datos morfológicos de mayor agresividad y es un factor de riesgo de recaída. No se ha observado significación en relación con la supervivencia global.



CONGRESO NACIONAL 24/26 mayo 2017 | Valencia

La Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP-IAP), la Sociedad Española de Citología (SEC) y la Sociedad Española de Patología Forense (SEPAF) certifican que

la Comunicación Oral titulada

Expresión y significado pronóstico de PD-L1 en carcinoma pulmonar de célula no pequeña estadios I y II sin ganglios positivos

firmada por los siguientes autores

Fco. Ignacio Aranda López(1), Carlos Gálvez Muñoz(1), Estela Costa Navarro(1), Francisco José Illán Gambin(1) y María Fernanda Sánchez de la Fuente(1) de (1)Hospital General Universitario de Alicante

se ha presentado en el XXVIII Congreso Nacional SEAP-IAP / XXIII Congreso Nacional SEC / IV Congreso Nacional SEPAF celebrado en el Palacio de Congresos de Valencia del 24 al 26 de mayo de 2017

Valencia, a 26 de mayo de 2017

