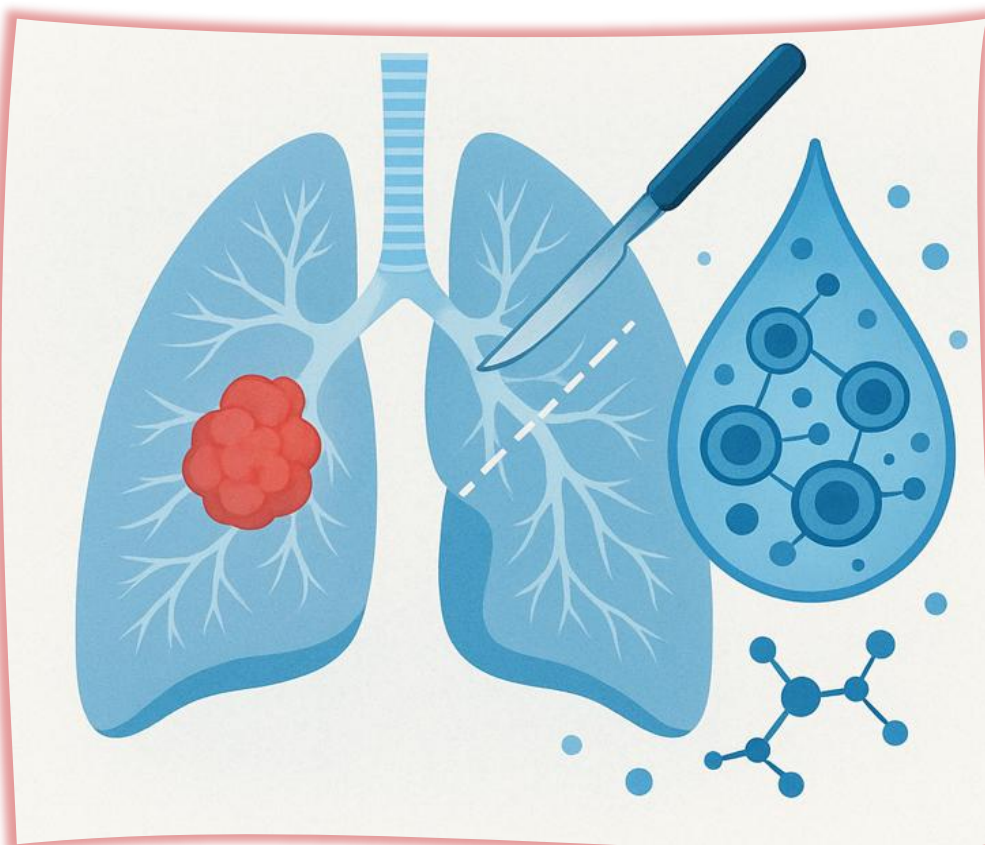


VALOR CLÍNICO DE LA CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y ANÁLISIS MOLECULAR DE TEJIDO EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO



Doctoranda: M^a José Moyano Rodríguez

Directoras: M^a José Serrano Fernández y Clara Bayarri Lara

Programa de doctorado: Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Granada. Mayo 2025

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: María José Moyano Rodríguez
ISBN: 978-84-1195-948-3
URI: <https://hdl.handle.net/10481/108860>

VALOR CLÍNICO DE LA CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y ANÁLISIS MOLECULAR DE TEJIDO EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

**Tesis presentada para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada
dentro del Programa de Bioquímica y Biología Molecular por Dña. M^a José
Moyano Rodríguez**

Dña. María José Serrano Fernández.

Dña. Clara Isabel Bayarri Lara

Certifican que:

Doña MARIA JOSÉ MOYANO RODRÍGUEZ, graduado en Medicina por la Universidad de Córdoba y Facultativo Especialista de Área en Cirugía Torácica, ha realizado la Tesis Doctoral **“Valor clínico de la caracterización de células tumorales circulantes y análisis molecular de tejido en estadios iniciales de cáncer de pulmón no microcítico”** en colaboración conjunta entre el Hospital Universitario Virgen de las Nieves y el centro Genyo (Centro Pfizer-Junta de Andalucía-Universidad de Granada de Genómica e investigación Oncológica), para aspirar al Título Oficial de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, por la Universidad de Granada.

Este trabajo reúne las condiciones necesarias para ser presentado y defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado.

Granada, a 3 de Junio de 2025.

VALOR CLÍNICO DE LA CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES Y ANÁLISIS MOLECULAR DE TEJIDO EN ESTADIOS INICIALES DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO

Compromiso de los derechos de autor

La doctoranda **Dña. María José Moyano Rodríguez** y los directores de la tesis **Dña. María José Serrano Fernández** y **Dña. Clara Isabel Bayarri Lara**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que:

El trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de las directoras de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En Granada a 3 de Junio de 2025.

Directoras de tesis:

Doctoranda:

AGRADECIMIENTOS

Para mí es un orgullo poder dar luz a este trabajo que tanto esfuerzo, dedicación y tiempo ha supuesto, a la vez que una enorme ilusión, y es por lo que quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todos los que me han acompañado en este camino haciéndolo posible.

Desde el tercer año de residencia gracias a la Dra. Clara Bayarri, tutora en aquel entonces, y a su gran interés en el mundo de la biopsia líquida, comenzó esta andadura. Con su propuesta, y gracias al liderazgo e inmensurable experiencia de la Dra. M^a José Serrano, el esfuerzo juntas ha dado su fruto, por lo que infinitas gracias mis directoras de tesis.

A todos mis compañeros que han formado parte del servicio de Cirugía Torácica, gracias por sus enseñanzas y dedicación y por ser mis maestros, además de compañeros y amigos. Agradecer también su participación en la recogida de muestras, así como al resto de personal de la planta 8^a izquierda, quirófano y consulta, quienes también lo han hecho posible.

Al equipo del grupo de pulmón del centro Genyo de Granada, por su trabajo y dedicación a la ciencia, en especial a Abel por toda su ayuda.

A la Universidad de Granada y al programada de Bioquímica y Biología Molecular, tanto a mi tutora Pilar como coordinador Jesús, por su ayuda.

Por supuesto, a todos los pacientes que han colaborado desinteresadamente en este trabajo, sin obtener nada a cambio, salvo su esperanza en la ciencia.

A mis padres, Antonio y Conchi, y a mi hermana, Paqui, por ser mis referentes en la vida. Gracias por ser mis guías y enseñarme el valor del esfuerzo y sacrificio para sentirme orgullosa de mis méritos, pero el mayor orgullo es ser vuestra hija y hermana. Y al resto de mi familia, y a los que ya no están, gracias por vuestro amor y confianza.

A mis amigos, y en especial a los que siempre están, sobre todo en las malas, cuando me demuestran que soy más afortunada si cabe.

A Ward, mi amigo, marido y compañero de vida. Gracias por apoyarme incondicionalmente en todos mis sueños y hacer de mi (nuestra) vida una bonita aventura que vale la pena disfrutar cada día.

Y a ti, oligodendroglioma, por haberme enseñado a apreciar cada segundo como si no hubiera un mañana, disfrutando del regalo más preciado: LA VIDA.

RESUMEN

Introducción

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial(1). El carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM) es el subtipo histológico más frecuente, suponiendo un 80% de los casos, y es subsidiario de tratamiento quirúrgico de elección en estadios resecables (I-III)(2). A pesar de la cirugía, la tasa de recidiva es mayor de lo deseable y oscila entre el 30-35% ocurriendo en la mayoría de los casos de forma precoz en los primeros 5 años, debido principalmente a la enfermedad mínima residual(3). De la misma manera, la supervivencia global es inferior al 15-20% a los 5 años(4). La compleja heterogeneidad tumoral intra e inter paciente y la gran variabilidad pronóstica de esta patología nos hace preguntarnos qué factores y biomarcadores son responsables de estas diferencias.

Las células tumorales circulantes (CTCs) son analitos derivados del tumor primario y pueden detectarse en sangre periférica. Se asocian al proceso metastásico, considerándose como un potencial factor pronóstico(5)(6). Las CTCs son muy heterogéneas, pudiendo existir diferentes subpoblaciones en un mismo paciente(7), por lo que su caracterización fenotípica y/o molecular aporta más información acerca de la biología tumoral. La secuenciación de nueva generación (NGS) facilita paneles genéticos personalizados para un análisis molecular más exhaustivo del tipo tumoral, permitiendo analizar multitud de genes y alteraciones en una misma muestra(8).

El objetivo principal de esta tesis es analizar el valor pronóstico de marcadores de biopsia líquida junto al análisis molecular del tejido y las posibles ventajas de su análisis combinado como fuentes de información biológica tumoral en pacientes con estadios iniciales de CPNM tratados quirúrgicamente. Los objetivos específicos son: 1) Detección y caracterización fenotípica de CTCs, en concreto de la proteína EZH2 (miembro del complejo de represión Polycomb 2), 2) Análisis molecular tumoral mediante un perfil mutacional personalizado de 50 genes implicados en distintos procesos biológicos, y 3) Análisis entre la caracterización molecular tisular y las CTCs y su valor pronóstico. En este contexto, hipotetizamos que la detección de este subtipo de CTCs-EZH2 en combinación con mutaciones tumorales específicas podrían contribuir como biomarcadores pronósticos e indicadores de enfermedad mínima residual en CPNM, orientando las posibles estrategias de tratamiento postoperatorio.

Material y Métodos

Se trata de una cohorte observacional prospectiva de pacientes con CPNM en estadios I-III tratados con cirugía radical como primera opción de tratamiento entre julio de 2017 y diciembre de 2019.

Se realizaron dos determinaciones sanguíneas para el aislamiento de CTCs y su posterior caracterización en base a la expresión de EZH2, la primera antes de la intervención (CTC1) y otra al mes de esta (CTC2). En el acto quirúrgico, se extrajo una muestra del tejido tumoral para su secuenciación mediante NGS utilizando un panel personalizado de 50 genes.

Para el aislamiento de CTCs se usó la metodología MACs® y para su caracterización fenotípica el anticuerpo anti-EZH2. El ADN tumoral se extrajo utilizando el kit NucleoSpin®Tissue y su secuenciación se realizó mediante NGS utilizando un panel personalizado de 50 genes.

Resultados

Se incluyeron un total de 76 pacientes para estudio de biopsia líquida y un subgrupo de 23 pacientes para estudio tisular, realizándose un seguimiento durante 5 años. El 60,5% de la serie fueron varones con una edad media de 67 años y hábito tabáquico en el 81%. El subtipo histológico adenocarcinoma fue el más frecuente (65,8%) y la lobectomía fue el principal tipo de resección pulmonar (77,6%).

La carga de CTCs detectadas disminuyó de forma significativa tras la cirugía ($p < 0,0001$), y los pacientes con CTCs y alta expresión de EZH2 ($\geq 70\%$) presentaron mayor riesgo de muerte ($p = 0,018$). Los genes con mayor frecuencia de mutación fueron *TP53*, *FLT1*, *MUC5AC*, *EGFR* y *NLRP3*. El análisis molecular reveló cinco pares de genes con mutaciones coocurrentes de significación estadística: *CD163-TLR4* ($p = 0,0056$), *FGF10-FOXP2* ($p = 0,0118$), *ADAMTSL3-FLT1* ($p = 0,0142$), *ADAMTSL3-MUC5AC* ($p = 0,0144$), y *MUC5AC-NLRP3* ($p = 0,0183$), así como una única interacción genética mutuamente excluyente, también con significación estadística: *RIN3* y *TP53* ($p = 0,0457$). La agrupación de variantes con significado clínico patogénico con aquellas de significado incierto (VUS) supuso una mayor carga mutacional en los pacientes que presentaron recurrencia ($p = 0,0404$).

Discusión

La secuenciación de nueva generación (NGS) ofrece un panel genético personalizado para un conocimiento molecular más exhaustivo del tipo tumoral. La medicina de precisión utiliza la NGS para identificar la heterogeneidad tumoral, predecir la evolución de la enfermedad y permitir orientar líneas de tratamiento según el potencial riesgo de recidiva. Nuestro estudio seleccionó un panel personalizado de 50 genes participantes en distintos procesos biológicos (desarrollo embriológico, relacionados con la EPOC, inflamación y proliferación tumoral), analizándose la interacción entre ellos. En nuestro análisis molecular el gen más frecuentemente mutado fue *TP53*, observándose principalmente en estadios patológicos localmente avanzados (estadio III). Respecto a las interacciones genéticas, se observaron 5 mutaciones coocurrentes con significación estadística: *CD163-TLR4*, *FGF10-FOXP2*, *ADAMTSL3-FLT1*, *ADAMTSL3-MUC5AC* y *MUC5AC-NLRP3*, así como una excluyente: *RIN3-TP53*. Estas interacciones sugieren posibles rutas convergentes implicadas en el desarrollo tumoral, así como rutas alternativas de transformación tumoral, respectivamente.

La biopsia líquida es otra herramienta que posibilita el análisis de biomarcadores originarios del tumor, como las células tumorales circulantes (CTCs), facilitando igualmente información más detallada del tumor y en tiempo real. Su detección y análisis de su dinámica

permite una monitorización de la enfermedad. En nuestro estudio observamos una dinámica descendente entre la detección preoperatoria (CTC1) y postoperatoria (CTC2), siendo este descenso significativo. La negativización de CTCs postoperatoria podría asociarse positivamente al pronóstico, mientras que la persistencia implicaría persistencia de enfermedad (enfermedad mínima residual) a pesar de la cirugía. Además, la caracterización fenotípica y molecular de estas células aporta información más precisa de las distintas subpoblaciones. En nuestra serie, elegimos la expresión de EZH2 por su implicación pronóstica en determinados tipos de cánceres, incluido en el CPNM y observamos que niveles de expresión de EZH2 $\geq 70\%$ se relacionaron con mayor riesgo de muerte y peor SG. La expresión de EZH2 podría reflejar mayor agresividad en subpoblaciones celulares desprendidas del tumor primario, considerándose un marcador de mal pronóstico.

Conclusiones

La integración del perfil molecular tumoral junto con la caracterización de CTCs brinda una visión más integral y dinámica de la heterogeneidad tumoral. Esta información combinada y complementaria posibilita una estratificación del riesgo de recidiva y/o desarrollo de metástasis, ayudando a la toma de decisiones terapéuticas. Además, permite una monitorización en tiempo real de la enfermedad, siendo clave para una medicina moderna más personalizada.

Bibliografía

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–63.
2. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2017;28(Supplement 4):iv1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx222>
3. Gristina V, La Mantia M, Peri M, Iacono F, Barraco N, Perez A, et al. Navigating the liquid biopsy Minimal Residual Disease (MRD) in non-small cell lung cancer: Making the invisible visible. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2023;182(December 2022):103899. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103899>
4. C A, Tomohiro, Carlo V di, Harewood R, Matz M, Bonaventura A. Concord-3. *Lancet.* 2018;391(10125):1023–75.
5. Ma XL, Xiao ZL, Liu L, Liu XX, Nie W, Li P, et al. Meta-analysis of circulating tumor cells as a prognostic marker in lung cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2012;13(4):1137–44.
6. Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery

for non-small-cell lung carcinoma: Comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2025 May 1];129(7):1651–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21128227/>

7. Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2019;19(10):553–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0180-2>
8. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors guideline from the college of American pathologists, the international association for the study of lung cancer, and the a. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321–46.

RESUMEN EN INGLÉS

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer-related death worldwide(1). Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common histological subtype, comprising 80% of all cases, and the only one eligible for surgical treatment in resectable stages (I-III)(2). Despite surgical resection, relapse rates are unacceptably high, ranging from 30–35% and early in the first 5 years, mainly due to minimal residual disease(3).

with a 5-year rate overall survival of 15-20%(3). The complex tumor heterogeneity in the same patient and between patients, combined with an uncertain prognostic variability of this disease, raises the question of which factors and biomarkers are responsible for these differences.

Circulating tumor cells (CTCs) are analytes derived from the primary tumor and can be detected in peripheral blood. They are related to the metastatic process as a potential prognostic factor(4)(5). CTCs are highly heterogeneous and different subpopulations may exist in the same patient(6). Phenotypic and molecular characterization of CTCs provides additional information about tumor biology. Next-generation sequencing (NGS) facilitates personalized genetic panels for a more exhaustive molecular analysis of tumor type. The analysis of multiple genes and alterations can be done in a single sample(7).

The main objective of this thesis is to analyze the prognostic value of liquid biopsy markers and the molecular tissue analysis, as well as their potential combined analysis advantages as sources of tumor biological information in patients with early stages of NSCLC treated with radical surgery. The specific objectives are the following: 1) Phenotypic characterization of CTCs, specifically the EZH2 protein (a member of the Polycomb repression complex 2), 2) Molecular tumor analysis using a personalized mutational profile of 50 genes involved in different biological processes, and 3) Analysis between tissue molecular characterization and CTCs and their prognostic value. In this context, we hypothesize that the detection of this subtype of EZH2-CTCs in combination with specific tumor mutations could contribute as prognostic biomarkers and indicators of minimal residual disease in early-stage NSCLC, guiding possible postoperative treatment strategies.

Materials and Methods

This is a prospective observational cohort of patients with stage I-III NSCLC treated with radical surgery as the first treatment option between July 2017 and December 2019.

Two blood samples were collected for CTCs isolation and subsequent EZH2 characterization: one prior to surgery (CTC1) and another one month after resection (CTC2). During surgery, a tumor sample was extracted for targeted NGS sequencing using a customized 50-gene panel, from a subset of patients. The MACs® methodology was used for CTC isolation and the rabbit anti-EZH2 antibody was used for phenotypic characterization. Tumor DNA was extracted using the NucleoSpin® Tissue kit and sequencing was performed using NGS using a customized 50-gene panel.

Results

A total of 76 patients were included for liquid biopsy analysis and a subgroup of 23 patients for tissue analysis, with a 5-year follow-up. As results, 66% of the series were men, with a mean age of 67 years old and 81% were smokers. The most common histological subtype was adenocarcinoma (65.8%), and lobectomy was the main type of lung resection performed (77.6%).

The number of CTCs detected significantly decreased between CTC1 and CTC2 ($p < 0.0001$) after surgery. CTCs+ patients with high EZH2 expression ($\geq 70\%$) had a higher risk of death ($p = 0.018$). The most frequently mutated genes were *TP53*, *FLT1*, *MUC5AC*, *EGFR*, and *NLRP3*. Molecular analysis revealed five gene pairs with co-occurring mutations of statistical significance: *CD163-TLR4* ($p = 0.0056$), *FGF10-FOXP2* ($p = 0.0118$), *ADAMTSL3-FLT1* ($p = 0.0142$), *ADAMTSL3-MUC5AC* ($p = 0.0144$), and *MUC5AC-NLRP3* ($p = 0.0183$), as well as a single mutually exclusive genetic interaction: *RIN3* and *TP53* ($p = 0.0457$). Grouping pathogenic clinical variants with those of uncertain significance (VUS) revealed a higher mutational burden in patients who experienced recurrence ($p = 0.0404$).

Discussion

Next-generation sequencing (NGS) enables comprehensive molecular analysis of tumors through customized gene panels. Precision medicine uses NGS to identify tumor heterogeneity, predict disease progression, and guide treatment options based on the potential risk of recurrence. In our study, we selected a personalized panel of 50 genes involved in distinct biological processes (embryological development, COPD-related processes, inflammation, and tumor proliferation), analyzing their interaction, both co-occurring and mutually exclusive events, and their relationship with prognosis. In our molecular analysis, the most frequently mutated gene was *TP53*, observed mainly in locally advanced disease stages (stage III). Regarding genetic interactions, five co-occurring mutations with statistical significance were observed: *CD163-TLR4*, *FGF10-FOXP2*, *ADAMTSL3-FLT1*, *ADAMTSL3-MUC5AC*, and *MUC5AC-NLRP3*, as well as one exclusive mutation: *RIN3-TP53*. These interactions suggest possible convergent pathways involved in tumor development and pathways of tumor transformation, respectively.

Liquid biopsy is a valuable tool for detecting tumor-derived biomarkers such as circulating tumor cells (CTCs), providing more precise real-time information about the tumor. Its detection and its dynamics analysis allow disease monitoring. In our study, we observed a significant decrease in the number of CTCs because of the surgery. The absence of postoperative CTCs could be positively associated with prognosis, while persistence would imply disease persistence (minimal residual disease) despite surgery. Furthermore, the phenotypic and molecular characterization of these cells provides more precise information about the different subpopulations. In our study, we selected the protein EZH2 due to its prognostic implications in certain types of cancer, including NSCLC, and we observed that EZH2 expression levels $\geq 70\%$ were associated with a higher risk of death and worse OS. EZH2 expression could reflect greater aggressiveness in cell subpopulations detached from the primary tumor and is considered a marker of poor prognosis.

Conclusions

Integrating the molecular profile of tumors and CTCs characterization provides a more comprehensive and dynamic view of tumor heterogeneity. This combined approach enables risk stratification of recurrence and/or metastasis development, aiding therapeutic decision-making. It also enables real-time disease monitoring, which is key to more personalized modern medicine.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EPIDEMIOLOGÍA	2
1.1.1. Epidemiología mundial.....	2
1.1.2. Epidemiología en España.....	3
1.2. ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO	7
1.2.1. Tabaco.....	7
1.2.2. Carcinógenos ambientales y ocupacionales.....	7
1.2.3. Patología pulmonar	8
1.2.4. Genética.....	9
1.3. HISTOLOGÍA	10
1.3.1. Clasificación histológica de CPNM	10
1.3.2. Clasificación histológica del adenocarcinoma pulmonar	11
1.4. DIAGNÓSTICO	13
1.4.1. Clínico	13
1.4.2. Marcadores séricos.....	13
1.4.3. Radiológico	13
1.4.4. Histológico	14
1.4.5. Estadificación.....	15
1.5. TRATAMIENTO.....	19
1.5.1. Tratamiento actual del CPNM por estadio.....	19
1.5.2. Nuevas fronteras terapéuticas.....	22
1.5.3. Supervivencia según estadios en CPNM	25
1.6. BIOPSIA LÍQUIDA	28
1.6.1. Concepto, componentes y biomarcadores de la biopsia líquida.....	28
1.6.2. Utilidad, ventajas e inconvenientes de la biopsia líquida.....	30
1.7. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES.....	32
1.7.1. Sistemas de detección de CTCs.....	33
1.7.2. Caracterización de las CTCs	35
1.7.3. Valor clínico de las CTCs en cáncer de pulmón.....	37
1.8. BIOLOGÍA MOLECULAR.....	39
1.8.1. Biomarcadores en CPNM	39
1.8.2. Métodos y técnicas de detección de biomarcadores	41
1.9. EZH2.....	43

1.9.1. Concepto y función de EZH2.....	43
1.9.2. EZH2 y su implicación en el cáncer de pulmón	43
2. JUSTIFICACIÓN.....	45
3. OBJETIVOS	48
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	49
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. METODOLOGÍA	51
4.1. DISEÑO, POBLACIÓN Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	52
4.1.1. Diseño	52
4.1.2. Población de estudio.....	52
4.1.3. Criterios de inclusión.....	52
4.2. VARIABLES DE ESTUDIO.....	54
4.2.1. Variables clínico-demográficas	54
4.2.2. Variables diagnóstico-terapéuticas	54
4.2.3. Variables histopatológicas	55
4.2.4. Variables relacionadas con las células tumorales circulantes.....	56
4.2.5. Variables relacionadas con las mutaciones tumorales.....	56
4.2.6. Variables de valor pronóstico	57
4.3. PROTOCOLO DE ESTUDIO	58
4.4. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LAS MUESTRAS.....	59
4.4.1. Biopsia líquida: CTCs	59
4.4.2. Muestra de tejido tumoral.....	62
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	64
5. RESULTADOS	66
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS.....	67
5.2. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO EN CPNM ESTADIOS I-III.....	70
5.2.1. Supervivencia global.....	70
5.2.2. Supervivencia libre de progresión.....	71
5.2.3. Supervivencia global y libre de progresión según variables pronósticas	71
5.3. ANÁLISIS DE LAS CTCs	73
5.3.1. Detección antes y después de la cirugía y dinámica	73
5.3.2. Caracterización de EZH2 en CTCs antes y después de la cirugía.....	73
5.3.3. Relación entre las variables clínico-patológicas y las CTCs.....	74
5.3.4. Valor pronóstico de las CTCs en términos de SG y SLP	76
5.4. ANÁLISIS DEL TEJIDO TUMORAL.....	80

5.4.1. Librería de mutaciones en tejido tumoral y peri tumoral.....	80
5.4.2. Análisis de eventos mutuamente excluyentes y coexistentes	84
5.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE MUTACIONES TISULARES Y CTCS	87
6. DISCUSIÓN	89
6.1. DESCRIPCIÓN DEL GRUPO	92
6.2. IDENTIFICACIÓN DE CTCS, DINÁMICA PRE Y POSTQUIRÚRGICA, RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMPLICACIÓN PRONÓSTICA.	93
6.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE EZH2 EN CTCS, DINÁMICA PRE Y POSTQUIRÚRGICA, RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMPLICACIÓN PRONÓSTICA.....	96
6.4. PERFIL MUTACIONAL TISULAR, PANEL DE GENES E IMPLICACIÓN PRONÓSTICA.	97
7. CONCLUSIONES.....	100
7.1. CONCLUSIONES RESPECTO A LAS CTCs.....	101
7.2. CONCLUSIONES RESPECTO AL TEJIDO TUMORAL.....	102
8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO	104
9. BIBLIOGRAFÍA.....	107
10. ANEXOS.....	117
10.1. ABREVIATURAS.....	118
10.2. FIGURAS Y TABLAS.....	121
10.3. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS	125
10.4. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS PARA CIRUGÍA	128

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de pulmón (CP) o carcinoma broncogénico se refiere a toda neoplasia primaria maligna de la vía aérea inferior, principalmente el pulmón. Se trata de una enfermedad oncológica compleja en la que participa un gran número de especialistas en cada una de sus fases diagnóstico-terapéuticas, y que asocia una elevada morbilidad a pesar de los avances y su estudio continuo. Existen dos grandes grupos de CP: cáncer de pulmón microcítico o células pequeñas (CPCP) y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que es el más frecuente.

1.1.1. Epidemiología mundial

El CP es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo(1). Según Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC), organismo dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2022 se registraron 2.4 millones de nuevos casos y un total de 1.8 millones de muertes por CP(8)(9)(Figura 1). En varones se considera el cáncer más frecuente, mientras que en mujeres es la segunda neoplasia tras el cáncer de mama, siendo en ambos sexos la principal causa de muerte por cáncer (16.8/100.000 habitantes). La incidencia varía según la zona geográfica, siendo más alta en países desarrollados, principalmente en Europa, Norte América y Asia oriental(10)(Figura 2), probablemente relacionado con el consumo de tabaco y la mayor contaminación ambiental.

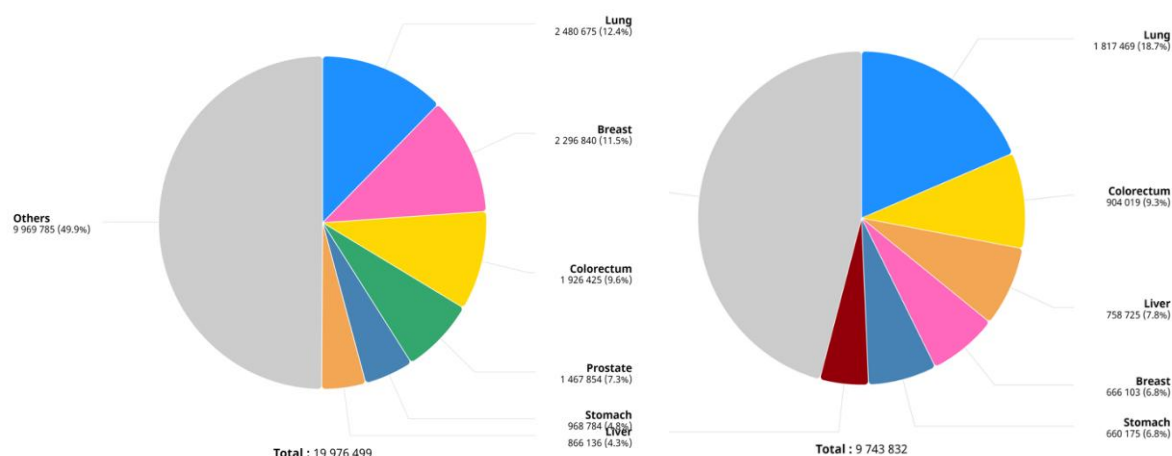


Figura 1: Incidencia (izquierda) y Mortalidad (derecha) mundial absoluta según el tipo de cáncer. Fuente: World Health Organization Cancer Mortality Database (Base de datos de mortalidad de la OMS), año 2022,3.

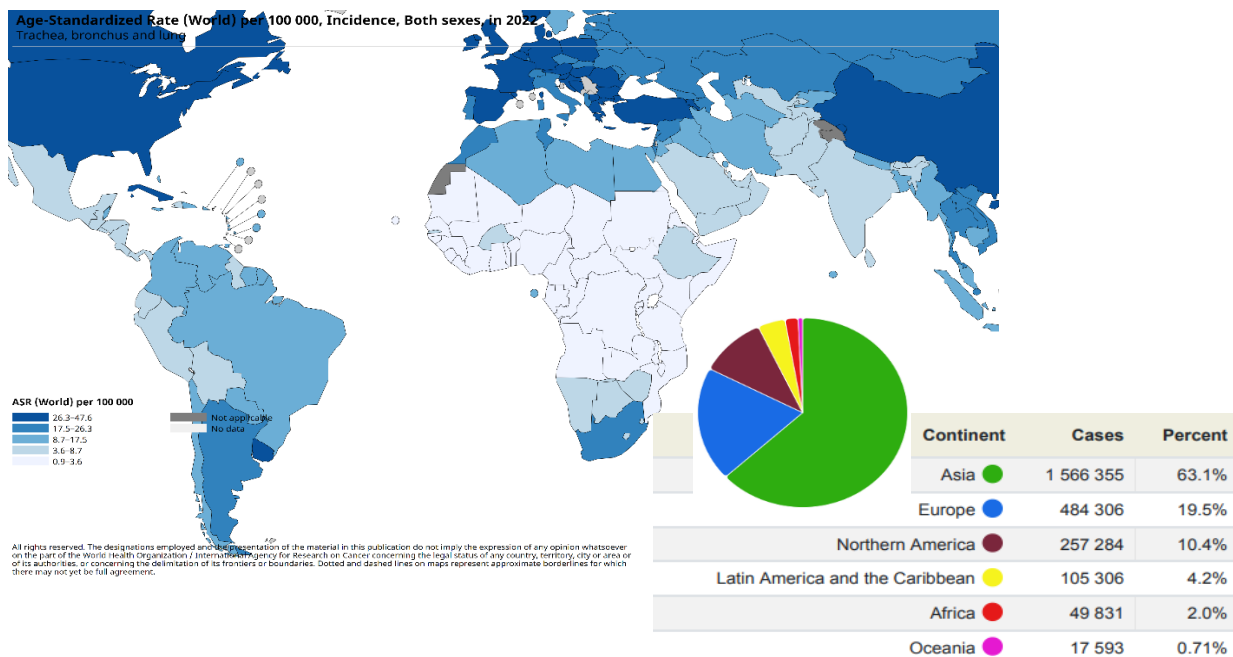


Figura 2: Tasa de incidencia ajustada a la población estándar mundial de CP según zonas geográficas. Fuente: World Health Organization Cancer Mortality Database (Base de datos de mortalidad de la OMS), año 2022⁴.

1.1.2. Epidemiología en España

En Europa, se diagnosticaron 484.554 casos en el año 2022 y supuso la principal causa de muerte por cáncer en ambos sexos (19.8%). En España, es la tercera neoplasia más frecuente en hombres (tras el cáncer de próstata y colorrectal) y mujeres (tras el cáncer de mama y colorrectal)(11)(Figura 3), con una incidencia ajustada a la población mundial estándar de 27.8 casos por 100.000 habitantes (41,4/100.000 en hombres y de 16/100.000 en mujeres).

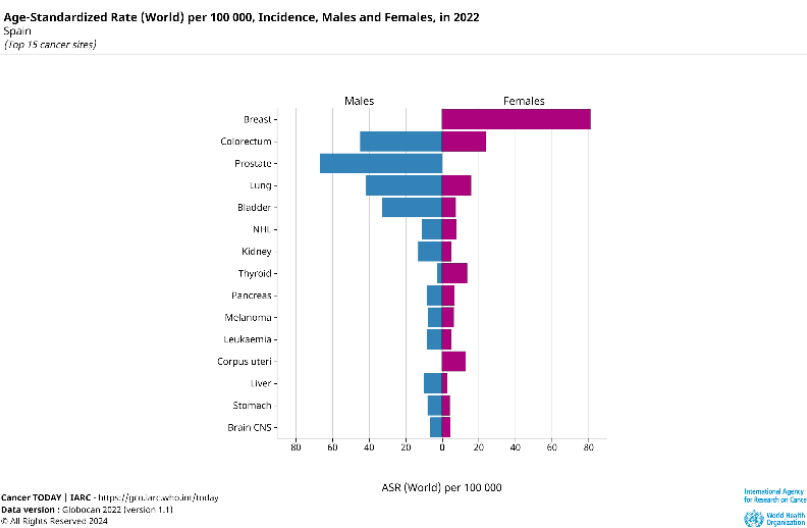


Figura 3: Tasa de incidencia ajustada a la población mundial de cáncer en España (2022). Fuente: World Health Organization Cancer Mortality Database (Base de datos de mortalidad de la OMS), año 2022⁵.

En 2024, las tasas de mortalidad por CP en España, ajustadas a la población mundial estándar, son de 76 muertes por cada 100,000 habitantes en hombres y 21 muertes por cada 100,000 habitantes en mujeres, según datos del Ministerio de Sanidad(12).

Según Instituto Nacional de Estadística (INE) el CP fue la tercera causa de muerte en 2023 (22.805 muertes), tras la cardiopatía isquémica (27.734 muertes) y los procesos cerebrovasculares (23.428 muertes)(13)(Figura 4). En el primer semestre de 2024, más de la mitad de las defunciones ocurridas en España fueron debidas a enfermedades del sistema circulatorio o tumores. Dentro de los tumores más frecuentes, el que más aumentó fue el cáncer de bronquios y pulmón (un 2,5%), mientras que el que más disminuyó fue el cáncer de colon (-6,3%). Aunque la mortalidad por CP sigue siendo mayor en hombres (16.564 muertes) respecto a las mujeres (6.241 muertes), el ascenso en el género femenino es continuo, habiéndose registrado 276 casos más que en 2022(14)(Figura 5).

Defunciones según la causa de muerte más frecuente - Resultados definitivos 2023 y provisionales 1er semestre 2024							
	Total	Hombres	Mujeres	Variación anual. Total	Variación anual. Hombres	Variación anual. Mujeres	
Total de defunciones	436.124	220.742	215.382	-6,1	-5,8	-6,4	
Enfermedades isquémicas del corazón	27.734	17.446	10.288	-4,6	-3,0	-7,2	
Enfermedades cerebrovasculares	23.428	10.481	12.947	-5,1	-3,3	-6,5	
Cáncer de bronquios y pulmón	22.805	16.564	6.241	0,4	-1,1	4,6	
Demencia	21.183	6.883	14.300	-3,2	-2,2	-3,7	
Insuficiencia cardíaca	18.954	7.721	11.233	-7,9	-5,6	-9,5	

Variación anual porcentual respecto de datos definitivos de 2022.

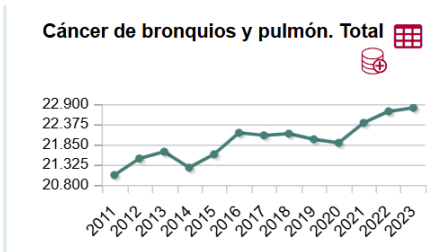


Figura 4: Defunciones según la causa de muerte en España. Fuente: INE, 20247.

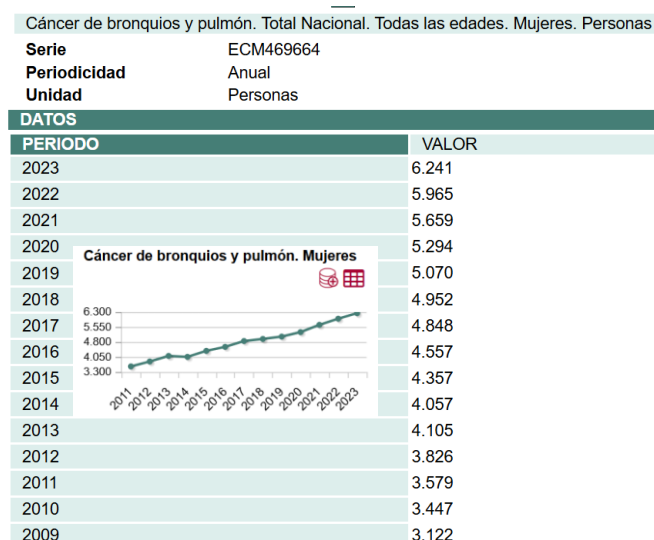


Figura 5: Mortalidad por CP en mujeres en España. Fuente: INE, 20248.

En España, se estiman 34.506 nuevos casos de CP para 2025 según las estimaciones del INE y REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer)(15).

La supervivencia del CP depende de varios factores, como el tipo de cáncer (microcítico o no microcítico), el estadio en el momento del diagnóstico, el tratamiento recibido, y el estado de salud del paciente. No obstante, la supervivencia global es inferior al 15-20% a los 5 años, por lo que las tasas de mortalidad e incidencia no varían demasiado. Esto se debe a que más del 70% de los casos se diagnostican en un estadio avanzado de la enfermedad, lo cual disminuye la supervivencia y empobrece el pronóstico.

De acuerdo con los datos de principio de siglo del estudio Eurocare-5, que engloba el periodo entre 1999-2007, la supervivencia global en pacientes con CP a los 5 años aumentó de un 11.6% hasta un 13.4% en la comparativa por periodos(16)(Figura 6). En España, la supervivencia relativa del CP fue del 10,6%, sólo mejor que la del páncreas (5%) y la del esófago (9,6%), según dicho estudio(17).

En otro proyecto internacional basado en la información de registros de tumores de 71 países, que recogen datos entre 2000 y 2014 (Concord 3), la supervivencia estandarizada a los 5 años para CP oscilaba entre un 10-20% en la mayoría de los países y en progresiva mejora(3). No obstante, la media de supervivencia a los 5 años es la más baja en la lista de los diez tumores más frecuentes (13%).

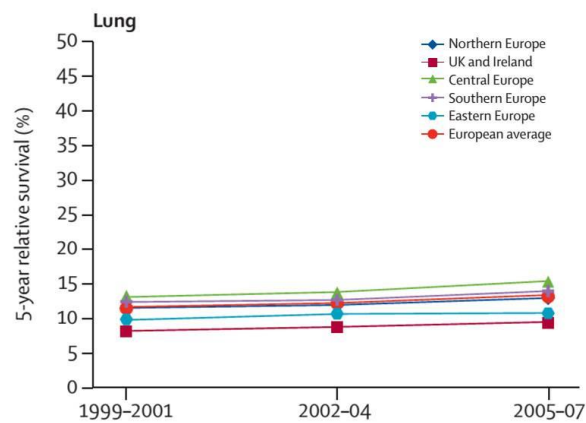


Figura 6: Supervivencia relativa a los 5 años para el CP en Europa, por regiones y periodos de diagnóstico. Fuente: Reproducido de Gatta, G et al. *The Lancet Oncology*, 2014¹⁰.

Si nos centramos en el CPNM, la supervivencia global varía según el estadio y sigue siendo pobre incluso en estadios iniciales subsidiarios de cirugía radical. La supervivencia global a los 5 años para el estadio I localizado oscila entre el 60-70% y desciende hasta el 30-40% para estadios II y III localmente avanzados. El estadio metastásico IV tiene una supervivencia del 5-10%.

1.2. ETIOPATOGENIA Y FACTORES DE RIESGO

Una neoplasia se origina como resultado del desequilibrio entre la fase de proliferación y de muerte celular normal y tiene como resultado la aparición de células tumorales que pueden resultar en el desarrollo de un cáncer. Los cambios a nivel genético y/o epigenético son resultado de la acción de distintos factores de riesgo (inflamatorios y/o carcinogénicos) y de la predisposición genética individual. A continuación, describiremos los factores de riesgo que más se han estudiado por su relación con el desarrollo de CP.

1.2.1. Tabaco

El consumo de tabaco en cigarrillos es la principal causa asociada al desarrollo de CP en países desarrollados. El humo resultante del proceso de combustión contiene más de 7000 componentes con potencial carcinogénico y mutagénico (benceno, cloruro de vinilo, hidrocarburos aromáticos, nitrosaminas, etc.) que producen daño en las células del aparato respiratorio favoreciendo el desarrollo de células neoplásicas.

El 90% de los casos de CP tiene relación con el consumo de tabaco, siendo proporcional a la cantidad y duración. El primer estudio que demostró la asociación epidemiológica entre el consumo de tabaco y el desarrollo de CP, así como la relación entre la dosis de tabaco y el riesgo, fue realizado por Doll y Hill en 1950(18). Otros factores que aumentan el riesgo son la edad de inicio, el grado de inhalación, la cantidad de alquitrán y nicotina y el uso de cigarrillos sin filtro(19). El consumo de tabaco en pipa también se asocia a un mayor riesgo de CP.

El cese en el hábito tabáquico reduce el riesgo de desarrollar CP a largo plazo. En varios estudios de casos-controles se ha demostrado que en ex fumadores con un periodo de abstinencia de 15 años o más, el riesgo de CP se reduce entre el 80-90% respecto a fumadores, aunque persiste más elevado que en no fumadores(20).

El tabaquismo pasivo también es reconocido como un carcinógeno humano para el desarrollo de CP, proporcional al grado de exposición y a la duración(21). En un análisis combinado de dos estudios de casos-controles en Estados Unidos y Europa, se observó que aquellos individuos no fumadores expuestos pasivamente al humo del tabaco en tres situaciones (exposición conyugal, laboral o social), presentaban un riesgo incrementado significativo de cáncer de pulmón, que aumentaba cuando la exposición temporal era más duradera(22).

1.2.2. Carcinógenos ambientales y ocupacionales

La IARC reconoce 29 agentes ocupacionales de riesgo, 30 agentes ocupacionales y ambientales sospechosos y 12 circunstancias de exposición con potencial carcinogénico. Se estima que el 2% de la cifra global de cáncer y menos del 1% son secundarios a una exposición laboral y ambiental, respectivamente(21). Las sustancias más ampliamente estudiadas en el desarrollo del CP son el radón y el asbesto; otros tóxicos que han mostrado relación son metales (níquel, cromo y arsénico), el berilio, el cadmio y la sílice.

El **asbesto o amianto** se refiere a un grupo minerales fibrosos compuestos por silicatos de cadena doble y que se encuentran en el suelo. Este mineral se empleó ampliamente en la industria naval, la construcción, el aislamiento y electricidad, fábricas de lavandería y limpieza en seco, etc. En Europa está prohibido su empleo desde el año 2002. Este carcinógeno ocupacional se ha relacionado con el desarrollo de CP y mesotelioma, pudiendo causar otras patologías pleuropulmonares como la asbestosis. El riesgo de CP aumenta con la exposición prolongada a fibras de tipo anfíboles, con el tabaquismo y con la asbestosis pulmonar asociada(21)(23).

El **radón** es un gas inerte resultado de la degradación del uranio-238 y radio-226 y supone el 9% de las muertes por CP. Es un carcinógeno ocupacional en trabajadores de minas de uranio. Además, la exposición doméstica no es despreciable en determinadas áreas geográficas con escasa ventilación. Un meta-análisis que incluía 12 estudios europeos demostró una relación entre la exposición doméstica al radón y el desarrollo de CP, dosis-dependiente, y un riesgo 25 veces mayor en los casos de consumo de tabaco asociado(21)(24).

La **contaminación ambiental** también ha sido reconocida desde el año 2013 como un agente carcinógeno en humanos, de predominio en zonas urbanizadas y superpobladas(21). En un meta-análisis por el ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects) que incluye 17 estudios de 9 países europeos, se demostró un riesgo estadísticamente significativo entre el tamaño de partícula contaminante en el aire ambiente ($<10\mu\text{m}$) y el desarrollo de CP, específicamente de adenocarcinoma(25).

La exposición a **radiaciones ionizantes** con fines diagnóstico-terapéuticos incrementa el riesgo de desarrollar segundas neoplasias. La incidencia observada en desarrollar CP es mayor en pacientes con antecedente de radioterapia por linfoma de Hodgkin(26) y cáncer de mama. En un estudio de cohortes con 7.408 pacientes con cáncer de mama, de las cuales 5.700 recibieron radioterapia como tratamiento, se observó una incidencia de CP estadísticamente significativa mayor en el grupo radiado (2.3 versus 0.2, respectivamente)(27).

1.2.3. Patología pulmonar

La susceptibilidad al desarrollo de CP se ve aumentada con determinadas enfermedades broncopulmonares como la EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica), neumoconiosis como la asbestosis y silicosis, la FPI (Fibrosis Pulmonar Idiopática), el asma y enfermedades sistémicas como la esclerosis(28).

La **EPOC** supone un conjunto de alteraciones en el aparato respiratorio, tales como una inflamación crónica, un aumento del estrés oxidativo-nitrosativo y cambios epigenéticos celulares. La EPOC se considera un factor de riesgo independiente de CP, sobre todo la forma enfisematosa y el grado moderado-severo(29). La incidencia es entre 2 y 5 veces mayor en pacientes fumadores con EPOC respecto a los exclusivamente fumadores(30).

El **asma**, la **FPI** y la **esclerosis sistémica** también se han relacionado con el desarrollo de CP, aunque existe controversia. Hay estudios en los que se ha observado una incidencia de CP del 55% en 10 años de seguimiento en pacientes con FPI(28).

Infecciones pulmonares como la tuberculosis también se ha asociado a un mayor riesgo de CP sobre lesiones cicatriciales "scar cancer". La enfermedad por VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) en la década previa a los antirretrovirales, también se ha asociado a neoplasias pulmonares (CP, linfoma o sarcoma de kaposi pulmonar).

1.2.4. Genética

Hay factores hereditarios en estudio, así como determinados polimorfismos (por ejemplo, el polimorfismo en CYP1A1 MspI y GSTM1) cuyos mecanismos de transmisión exactos se desconocen pero que pudieran estar en relación con el desarrollo de determinados tumores.

Existen estudios que ponen de manifiesto un desequilibrio entre la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores, así como determinadas mutaciones a nivel de receptores y factores de crecimiento tumoral, y alteraciones en la reparación del ADN celular favorecedoras del desarrollo de CP según la susceptibilidad individual(31).

Además, se han demostrado formas de agregación familiar, más frecuente en el carcinoma epidermoide, y un riesgo entre 2 y 6 veces más elevado de padecer CP en familiares directos de enfermos que aquellos sin parentesco(32). En un meta-análisis que incluye 28 estudios de casos-controles y 17 estudios de cohortes se pone de manifiesto que el riesgo de CP aumenta si hay antecedentes familiares (RR 1.8, 95% CI 1.6-2.0), siendo mayor en familias con más familiares afectados y si el CP debutó en edades más tempranas(33).

1.3. HISTOLOGÍA

La principal clasificación histológica diferencia entre cáncer de pulmón microcítico o de célula pequeña (CPNM) y no microcítico (CPNM), suponiendo este más del 75% del total. Es importante hacer un diagnóstico diferencial entre ambos, dado que el tratamiento y el pronóstico difieren notablemente, siendo peor para el CPCP. El CPNM se divide en distintos subtipos, siendo el adenocarcinoma el tipo histológico más frecuente actualmente, seguido de carcinoma epidermoide.

1.3.1. Clasificación histológica de CPNM

La clasificación anatómo-patológica del CP obedece a la última propuesta por la OMS en 2015 (Tabla 1). Una de las modificaciones respecto a la clasificación de 2004 y las propuestas por el panel de expertos IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer), ATS (American Thoracic Society) y ERS (European Respiratory Society) en el año 2011 es que introduce la caracterización inmunohistoquímica, criterios y terminología estandarizados para el diagnóstico citológico y de biopsias pequeñas, y proporciona orientación de marcadores moleculares en determinados subtipos de carcinoma.

CLASIFICACIÓN DE CARCINOMA PULMONAR (OMS 2015)	
Adenocarcinoma (ADC)	- Preinvasivo - Mínimamente invasivo - Invasivo - Lepídico - Acinar - Papilar - Micropapilar - Sólido
Carcinoma escamoso	• Queratinizante • No queratinizante • Basaloide
Carcinoma de células grandes	
Carcinoma adenoescamoso	
Carcinoma sarcomatoide	• Carcinoma pleomorfo • Carcinoma de células fusiformes • Carcinoma de células gigantes • Carcinosarcoma • Blastoma pulmonar
Carcinoma neuroendocrino	• Carcinoma de células pequeñas o microcítico (CPCP) • Carcinoma neuroendocrino de células grandes • Carcinoide (típico y atípico)
Hiperplasia de células neuroendocrinas pulmonares idiopáticas difusas	

Tabla 1: Clasificación OMS 2015 del Carcinoma de pulmón no microcítico.

Además del tipo histológico tumoral, debe hacerse referencia al grado de diferenciación celular, estableciéndose diferentes categorías según las características de las células: G1 (bien diferenciado), G2 (moderadamente diferenciado), G3 (pobremente diferenciado) y G4 (indiferenciado).

1.3.2. Clasificación histológica del adenocarcinoma pulmonar

Merece la pena destacar en las modificaciones propuestas por la IASLC, ATS y ERS en 2011 las referidas al subtipo adenocarcinoma (ADC):

1. Propone cambios en cuanto a tamaño y grado de invasión e incluye el término “lepídico” para referirse a formas no invasivas. Se eliminan los subtipos “mixto y bronquioloalveolar”, y se incluyen los de “Hiperplasia adenomatosa atípica, ADC in situ y ADC mínimamente invasivo”, que implican mejor pronóstico. El término ADC invasivo mucinoso sustituye al antiguo carcinoma bronquioloalveolar y engloba los ADC que no cumplen criterios de ADC in situ ni mínimamente invasivo.
Dada la variabilidad clínica, radiológica, molecular y patológica del espectro de ADC, sobre todo de su variante lepídica, fue necesaria una nueva clasificación (Tabla 2) por su implicación pronóstica.
2. Elimina respecto a la clasificación anterior los subtipos “En anillo de sello y de células claras”, considerándose características citológicas asociadas a otros patrones.
3. Hallazgos radiológicos también se han correlacionado con esta clasificación, a destacar el patrón radiológico en vidrio deslustrado con los subtipos no mucinosos de hiperplasia adenomatosa atípica y ADC in situ.

CLASIFICACIÓN DE ADENOCARCINOMA	
Lesiones pre invasivas	
Hiperplasia adenomatosa atípica	Proliferación de neumocitos atípicos o células claras con citología que no alcanza el carcinoma y es ≤ 5 mm
Carcinoma in situ	Lesión ≤ 3 cm, única, exclusivamente lepidica y sin invasión.
Lesiones invasivas	
Mínimamente invasivo	Lesión ≤ 3 cm, de predominio lepidica y ≤ 5 mm de invasión.
Lepídico	Crecimiento lepidico en la mayoría del tumor, pero con al menos un foco de invasión > 5 mm.
Acinar	Presencia de acinos y túbulos formados por células columnares que pueden producir mucina, células epiteliales, e incluso células claras.
Papilar	Presencia de papilas con núcleo fibrovascular central.
Micropapilar	Presencia de papilas sin núcleo fibrovascular (G3).
Sólido	Los tumores carecen de características glandulares o papilas y producen mucina.
Variantes de formas invasivas	
Invasivo mucinoso	Las células tumorales tienen morfología de células caliciformes o células columnares con abundante mucina.
Coloide	Las células tumorales pueden ser difíciles de encontrar por la gran cantidad de mucina extracelular. <i>El ADC cístico mucinoso se incluye en este grupo.</i>
Fetal	Células similares al adenocarcinoma endometrioide.
Entérico	Células similares a las colorrectales.
*En anillo de sello y células claras	Características citológicas visibles en otros tipos de tumores, de predominio en formas sólidas. *No se consideran un subtipo de ADC.

Tabla 2: Clasificación de los subtipos de adenocarcinoma pulmonar.

1.4. DIAGNÓSTICO

El objetivo fundamental en el estudio del CP es el diagnóstico precoz y la correcta estadificación para ofrecer la mejor opción terapéutica. La evaluación inicial incluirá el conjunto de datos clínicos y estudios complementarios para establecer el diagnóstico definitivo, así como el estudio de función respiratoria y despistaje de posibles síndromes paraneoplásicos. Se recomienda optar por procedimientos de menor a mayor invasión y realizar la menor cantidad de pruebas posibles. El proceso diagnóstico-terapéutico y la toma de decisiones deberá realizarse por un comité oncológico multidisciplinar, teniendo en cuenta siempre la opinión del paciente.

1.4.1. Clínico

El CP es una de las neoplasias más silentes desde el punto de vista clínico. La presencia de síntomas intra o extratorácicos suele ser indicativo de enfermedad localmente avanzada o metastásica (70%). Según la localización tumoral, los síntomas más frecuentes son tos (50-75%), hemoptisis (25-50%), disnea (25%) o dolor torácico (20%)(34). En ocasiones, la manifestación clínica es un síndrome de Pancoast, un síndrome de vena cava superior, un síndrome paraneoplásico (Sd. Eaton-Lambert, Sd. Cushing, etc.) o síntomas secundarios a enfermedad metastásica.

El síndrome paraneoplásico engloba un conjunto de signos y síntomas secundarios a la producción hormonal, de citoquinas y la respuesta inmunológica desencadenada por las células tumorales. Ante su sospecha es importante la confirmación y el tratamiento precoz ya que empobrece el pronóstico por su elevada morbi-mortalidad asociada(34).

1.4.2. Marcadores séricos

El CP no suele producir alteraciones séricas específicas. Se recomienda un análisis inicial que incluya hemograma, bioquímica completa y coagulación.

La determinación de marcadores tumorales no suele estar indicada de forma rutinaria como ocurre en otro tipo de neoplasias. Kulpa et al analizaron los niveles de CYFRA 21.1 (cytokeratin 19 fragment antigen 21-1), SCCA (squamous cell carcinoma antigen), CEA (carcinoembryonic antigen) y NSE (neuron specific enolase) en 200 pacientes con carcinoma escamoso de pulmón en distintos estadios que no habían recibido tratamiento frente a un grupo control. CYFRA 21.1 resultó un factor pronóstico independiente en estadios iniciales y NSE en estadios avanzados de carcinoma escamoso(35). El grupo europeo de marcadores tumorales recomienda la determinación de CYFRA, CEA y NSE según el tipo histológico(30), como factor pronóstico para valorar resistencia terapéutica y riesgo de recurrencia.

1.4.3. Radiológico

La radiografía de tórax es la técnica inicial ante la sospecha de cáncer de pulmón, por su accesibilidad y rapidez. La estadificación radiológica de una neoplasia pulmonar se realiza

mediante la tomografía axial computarizada (TAC) y la tomografía por emisión de positrones (PET) principalmente.

▪ TAC DE TÓRAX

Es la técnica de elección en el diagnóstico del CP, incluyendo cortes desde el cuello hasta el abdomen superior(30). El TAC ofrece distintos patrones radiológicos: nódulo o masa, múltiples nódulos, fenómenos obstructivos, síndrome adenopático, etc. Aporta información del componente T (Tumor primario) en términos de tamaño, localización, invasión local y relación con estructuras vecinas, y del componente N (Node/Ganglios linfáticos) en cuanto a tamaño, número y localización. En caso de metástasis intratorácicas también permite el estudio del componente M (Metástasis).

▪ PET

Ofrece información metabólica de la enfermedad basada en el fenómeno de aniquilación de pares positrónicos, siendo el radiofármaco más empleado la 18F-fluorodexosiglucosa (18F-FDG). Tiene gran valor en la estadificación ganglionar (componente N) y afectación metastásica (componente M), con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 90%, contrarrestando las limitaciones del TAC en la valoración adenopatías (<10 mm)(36).

Es la técnica de elección para estudiar enfermedad metastásica, excepto en la enfermedad cerebral. Además, el PET-TC con 18F-FDG es preferible en la re-estadificación de los pacientes con CPNM después del tratamiento neoadyuvante.

La principal limitación es la presencia de falsos positivos en la enfermedad inflamatoria y granulomatosa, así como la escasa avidez por el radiofármaco de lesiones menores de 1 cm y estirpes tumorales bien diferenciadas como el adenocarcinoma o el tumor carcinoide.

▪ RESONANCIA NUCLEAR MAGNÉTICA

No se utiliza de forma rutinaria. Su indicación principal es en el estudio de extensión cerebral en los estadios avanzados o en el despistaje por clínica neurológica. También puede indicarse en casos de infiltración de grandes vasos, corazón y tumores del sulcus, así como en tumores que afectan el foramen y canal medular(36), ya que aporta mayor precisión de imagen en dichas estructuras.

1.4.4. Histológico

El estudio anatomo-patológico en el CP se realiza a partir de una muestra de tejido tumoral, bien primaria o metastásica. El tipo de muestra (citopatológica o histopatológica) dependerá del procedimiento diagnóstico empleado, tendiendo siempre a la mínima invasión. Cualquier muestra debería permitir un estudio completo cito-morfológico, inmuno-histoquímico y genético-molecular.

Los métodos mínimamente invasivos incluyen: citología de esputo, videobroncoscopia flexible con biopsia transbronquial y ecobroncoscopia (EBUS) para tumores centrales y/o afectación mediastínica por pruebas de imagen; ecoendoscopia (EUS) para lesiones

próximas al esófago; y punción aspiración con aguja fina (PAAF) o biopsia con aguja gruesa (BAG) guiadas por TAC o ecografía en tumores más periféricos. El EBUS/EUS está indicado en pacientes con tumores centrales de la vía aérea, tumores mayores de 3 cm en pacientes con afectación mediastínica por técnicas de imagen, en la re-estadificación tras neoadyuvancia, y en la confirmación de progresión.

La navegación electromagnética es una técnica novedosa que facilita la obtención de muestras mediante broncoscopia de alta tecnología de lesiones periféricas de pequeño tamaño, así como de adenopatías mediastínicas. Permite realizar tanto biopsias transbronquiales como punciones con aguja citológica, por lo que es muy versátil.

En caso de no conseguir un diagnóstico con las técnicas anteriormente citadas, se dispone de métodos quirúrgicos más invasivos como la video-mediastinoscopia y sus variantes, la videotoracoscopia, la mediastinotomía y la toracotomía. A pesar de poder estar asociadas a una mayor morbi-mortalidad, ofrecen un mayor valor predictivo negativo, siendo el “gold standard” en la estadificación mediastínica.

El estudio inmunohistoquímico debe ir orientado a excluir diferenciaciones neuroendocrinas y establecer el diagnóstico diferencial entre CPCP y CPNM, y en este último establecer si se trata de un adenocarcinoma o de un carcinoma escamoso. Para ello, se recomienda el uso de paneles reducidos con 2 o 4 marcadores inmunohistoquímicos, preferiblemente TTF-1 y Napsin A para el adenocarcinoma, y P40 y P63 para el carcinoma escamoso(7).

1.4.5. Estadificación

Durante el 16º Congreso mundial de Cáncer de Pulmón, la Union for International Cancer Control (UICC) presentó la 8ª clasificación TNM (Tumor, Node and Metastasis), en vigor desde enero de 2018, y la que se ha utilizado en nuestro trabajo. Este sistema se utiliza para determinar la extensión de la enfermedad. Las características tumorales moleculares del CP no están incluidas. Según la clasificación clínica TNM (cTNM) (Tabla 3) y el estado clínico y funcional del paciente, se determinará el tratamiento de elección.

La categoría T se divide en:

- **Tx**: tumor primario que no se puede evaluar, o tumor probado por la presencia de células malignas en el esputo o en el lavado bronquial, pero no visualizado por imagen o broncoscopia.
- **T0**: ausencia de evidencia de tumor primario.
- **Tis**: carcinoma in situ.
 - SCIS: carcinoma epidermoide in situ.
 - AIS: adenocarcinoma in situ (patrón lepidico puro ≤ 3 cm).
- **T1**: tumor de ≤ 3 cm de eje mayor sin invadir el bronquio principal.
 - pT1mi: adenocarcinoma mínimamente invasivo (≤ 3 cm de eje mayor y foco invasivo ≤ 5 mm).
 - T1a: ≤ 1 cm

- T1b: $>1 \text{ y } \leq 2 \text{ cm}$
 - T1c: $> 2 \text{ cm y } \leq 3 \text{ cm}$
- **T2:** tumor $> 3 \text{ cm y } \leq 5 \text{ cm}$ con cualquiera de las siguientes características: afectación del bronquio principal sin afectar a la carina, invasión pleural (PL1 y PL2) o atelectasia/neumonitis obstructiva que alcanza el hilio.
 - T2a: $> 3 \text{ cm y } \leq 4 \text{ cm}$
 - T2b: $> 4 \text{ cm y } \leq 5 \text{ cm}$
- **T3:** tumor $> 5 \text{ cm y } \leq 7 \text{ cm}$ o cualquier tamaño que infiltre pleura parietal (PL3), pared torácica (incluido el tumor de Pancoast), pericardio y N. Frénico, o varios nódulos tumorales en el mismo lóbulo.
- **T4:** tumor de $>7 \text{ cm}$ o cualquier tamaño que infiltre diafragma, mediastino, grandes vasos, corazón, tráquea y carina, esófago, columna y N. Laríngeo recurrente, o varios nódulos tumorales en distintos lóbulos ipsilaterales.

La categoría N se divide en:

- **Nx:** no se pueden valorar los ganglios regionales.
- **N0:** ausencia de metástasis ganglionares.
- **N1:** metástasis en ganglios peribronquiales, hiliares e intrapulmonares ipsilaterales.
- **N2:** metástasis en ganglios mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
- **N3:** metástasis en ganglios mediastínicos e hiliares contralaterales, y escalenos y supraclaviculares ipsi o contralaterales.

La categoría M se divide en:

- **M0:** ausencia de metástasis a distancia.
- **M1a:** nódulo tumoral en lóbulo contralateral; nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico maligno.
- **M1b:** afectación de un solo órgano extra tóracico por metástasis única.
- **M1c:** múltiples metástasis extra tóracicas en uno o más órganos.

El sistema TNM combina cada uno de los descriptores del tumor (tamaño y extensión tumoral regional, afectación ganglionar, y/o extensión tumoral metastásica), agrupando a los pacientes en estadios (Tabla 3)(34) que se correlacionan con el pronóstico y están vinculados a recomendaciones de tratamiento.

8th Ed TNM Categories

8 th Ed TNM Categories					
T/M	Label	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a Inv	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a >3-4	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b >4-5	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 >5-7	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Inv	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Same Lobe Nod	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 >7	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 Inv	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 Ipsi Nod	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a PI Dissem	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a Contr Nod	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b Single Les	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c Mult Les	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabla 3: 8ª Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón no microcítico. Fuente: Reproducido de Ost D et al. *Chest*, 2013²⁹. En rojo se resaltan los subgrupos subsidiarios de cambio en la 9ª clasificación TNM.

En la práctica clínica el CPNM puede clasificarse en 3 subgrupos clínicos: estadio inicial (I y II), estadio III o “localmente avanzado” y estadio IV o metastásico.

Este subgrupo es el más heterogéneo por la variabilidad de descriptores TNM, sobre todo en lo que se refiere a matices en el descriptor N (número de estaciones afectadas, tamaño de las adenopatías, la existencia de afectación intracapsular o extracapsular, etc.), que puede repercutir en el manejo y pronóstico. En los últimos años diferentes autores son partidarios de subclasificar el estadio III de CPNM en 3 grupos útiles en la práctica clínica:

- Estadio IIIA con afectación N2 incidental.
- Estadio IIIA con afectación N2 potencialmente resecable.
- Estadio III con afectación N2/N3 irresecable.

Recientemente, la IASLC ha publicado una nueva propuesta de TNM (9ª edición), que está entrando progresivamente en vigor desde enero de 2025. Esta actualización incluye cambios en los descriptores N y M, y específicamente en los subgrupos N2 y M1c(37).

Propone la subdivisión de N2 en N2a (afectación ganglionar mediastínica ipsilateral única o afectación ganglionar subcarínica), y N2b (afectación ganglionar mediastínica ipsilateral múltiple con o sin afectación ganglionar subcarínica). Para M1c, propone la subdivisión en M1c1 (metástasis extratorácicas múltiples en un solo órgano), y M1c2 (metástasis

extratorácicas múltiples en múltiples órganos). No se han propuesto cambios para el descriptor T(37). El resultado son nuevas subcategorías en cada estadio TNM (Tabla 4). Estas modificaciones son el resultado de observar diferencias de pronóstico entre pacientes de los mismos subgrupos TNM de las ediciones previas. El objetivo es tener un sistema de clasificación y una nomenclatura del CPNM lo más exhausta posible con el fin de optimizar y ofrecer la mejor estrategia de tratamiento a los pacientes y, por tanto, mejorar el pronóstico de estos.

Proposed 9th Ed TNM Categories

Proposed 9 th Ed TNM Categories						
T/M	Description	N0	N1	N2		N3
				N2a	N2b	
T1	T1a ≤1 cm	IA1	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1b >1 to ≤2 cm	IA2	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1c >2 to ≤3 cm	IA3	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a Visceral pleura / central invasion	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2a >3 to ≤4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2b >4 to ≤5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
T3	T3 >5 to ≤7 cm	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Invasion	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Same lobe tumor nodule	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 >7 cm	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 Invasion	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 Ipsilateral tumor nodule	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
M1	M1a Pleural / pericardial dissemination	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a Contralateral tumor nodule	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b Single extrathoracic lesion	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c1 Multiple lesions, 1 organ system	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB
	M1c2 Multiple lesions, >1 organ system	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB

Tabla 4: 9ª Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón no microcítico. Fuente: Reproducido de Rami-Porta R et al. *Journal of Thoracic Oncology*, 2024. En rojo se resaltan los cambios realizados respecto a la 8ª.

1.5. TRATAMIENTO

La elección del tratamiento dependerá del estadio cTNM, de las pruebas de función respiratoria y de la comorbilidad del paciente, siendo consensuado en un comité multidisciplinar. El comité estará formado por representantes de las especialidades de Neumología, Radiología, Medicina Nuclear, Oncología Médica, Oncología Radioterápica, Cirugía Torácica y Anatomía Patológica.

Se estima que entre el 20-30% de los pacientes se diagnostica en un estadio inicial (I-II) subsidiario de tratamiento quirúrgico, el 35% en un estadio III y el 40% en un estadio metastásico. A pesar del tratamiento quirúrgico, entre el 30-55% tendrán recurrencia durante el seguimiento.

1.5.1. Tratamiento actual del CPNM por estadio

Estadio I-II

El tratamiento de elección en **estadios iniciales de CPNM (I-II)** es la cirugía, siempre y cuando el paciente cumpla criterios de operabilidad(38). La resección pulmonar anatómica y linfadenectomía sistemática es la cirugía estandarizada, siendo la lobectomía el procedimiento más frecuente y con mejores resultados(2)(38). El abordaje quirúrgico podrá ser por cirugía mínimamente invasiva: videotoracoscopia o VATS y cirugía robótica o RATS (Figura 7), o bien por cirugía abierta: toracotomía, lo cual implica la separación costal (Figura 8). La resección sublobar o segmentectomía anatómica está aceptada en lesiones pulmonares en vidrio deslustrado, adenocarcinoma in situ o mínimamente invasivo, y podría plantearse en pacientes que no toleren una resección mayor(2).

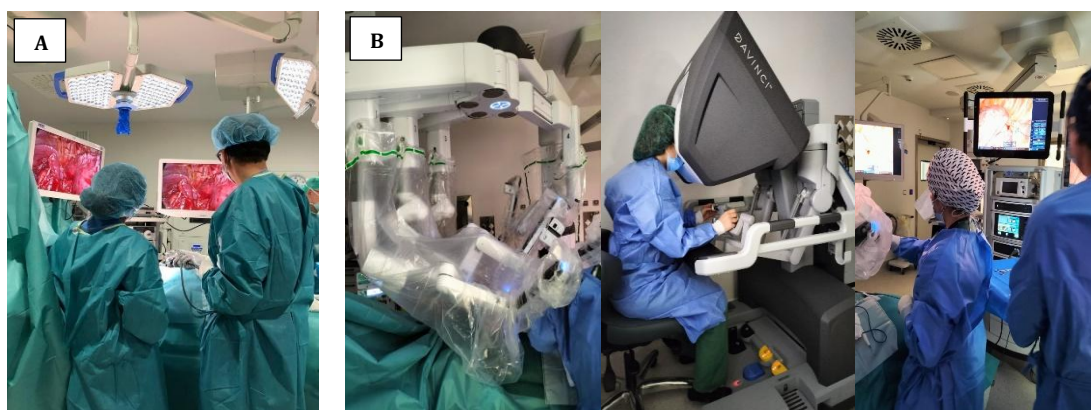


Figura 7: Abordaje torácico tipo VATS a la izquierda (A) y tipo RATS a la derecha (B).

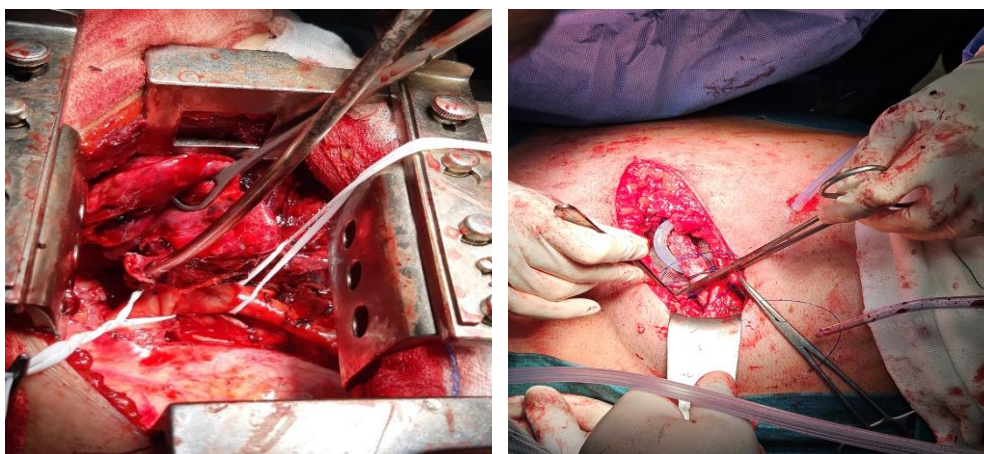


Figura 8: Abordaje torácico abierto por toracotomía.

La cirugía ofrece una supervivencia global a los 5 años entre el 50% y 73% en el estadio IA, y decae entre un 25% y un 36% en el estadio IIB. En el seguimiento durante 4 años de un grupo grande de pacientes intervenidos por CPNM se observó que el riesgo de recurrencia oscilaba entre el 6% y el 10% por persona por año, decreciendo posteriormente al 2%. La recurrencia de tipo local era más frecuente en los dos primeros años, y las metástasis a distancia entre el tercer y cuarto año(39). Así mismo, el riesgo de desarrollar un nuevo CP durante el seguimiento oscilaba entre un 1% y un 6% por persona por año(39).

Como alternativa en pacientes inoperables o que rechazan la cirugía, está la radioterapia fraccionada estereotáxica (SBRT), la RT convencional (RT) y la termoablación(2). La SBRT está indicada en tumores periféricos, preferentemente estadio I, con tasas descritas de control local del 90% a los 5 años. La RT convencional se indica en tumores de > 5 cm y más centrales; ambos tipos de radioterapia se indican en lesiones únicas preferiblemente y sin afectación ganglionar. La termoablación puede contemplarse en pacientes inoperables y contraindicados para SBRT. La ablación por radiofrecuencia y la crioablación son otras alternativas a la RT.

Estadio III

El tratamiento del CPNM en **estadio III** no está tan estandarizado y difiere al encontrarnos distintos escenarios en este grupo, con una supervivencia que oscila entre el 19% y el 24% para estadios IIIA y entre el 7% y 9% para estadios IIIB.

La cirugía inicial estaría indicada en un estadio cT3N1 y cT4N0-cT4N1 (III con N0-1) tras una estadificación mediastínica negativa. La afectación N2 en una única estación puede tratarse mediante cirugía inicial (preferiblemente T1-T2), o bien de rescate tras tratamiento neoadyuvante y re-estadificación mediastínica negativa. La cirugía con afectación N2 bulky o multi estación es más controvertida, siendo necesario el tratamiento neoadyuvante inicial; la cirugía podría valorarse si existe respuesta mediastínica en la reevaluación y preferiblemente no implica neumonectomía(2), seleccionado e individualizando estos casos. La neoadyuvancia en la era pre inmunoterapia se ha fundamentado en quimioterapia

(QT) de inducción basada en cisplatino 3-4 ciclos con reevaluación posterior. En tumores del sulcus (tumor de Pancoast), la inducción con QT-RT seguida de cirugía es preferible a la QT neoadyuvante.

En los casos con estadio III no resecable, el tratamiento de elección será la QT-RT concurrente preferiblemente, o bien secuencial si el estado general del paciente y su comorbilidad no lo permiten(2). La dosis de RT indicada es 60-66 Gy en 30-33 fracciones. Además, en los pacientes sin progresión y una expresión de PD-L1 $\geq 1\%$ se administra adyuvancia con Durvalumab durante 1 año si no existe contraindicación(38).

A continuación, se detalla el algoritmo de tratamiento en CPNM (I-III) según las recomendaciones ESMO (Sociedad Europea de Oncología Médica) (Figura 9).

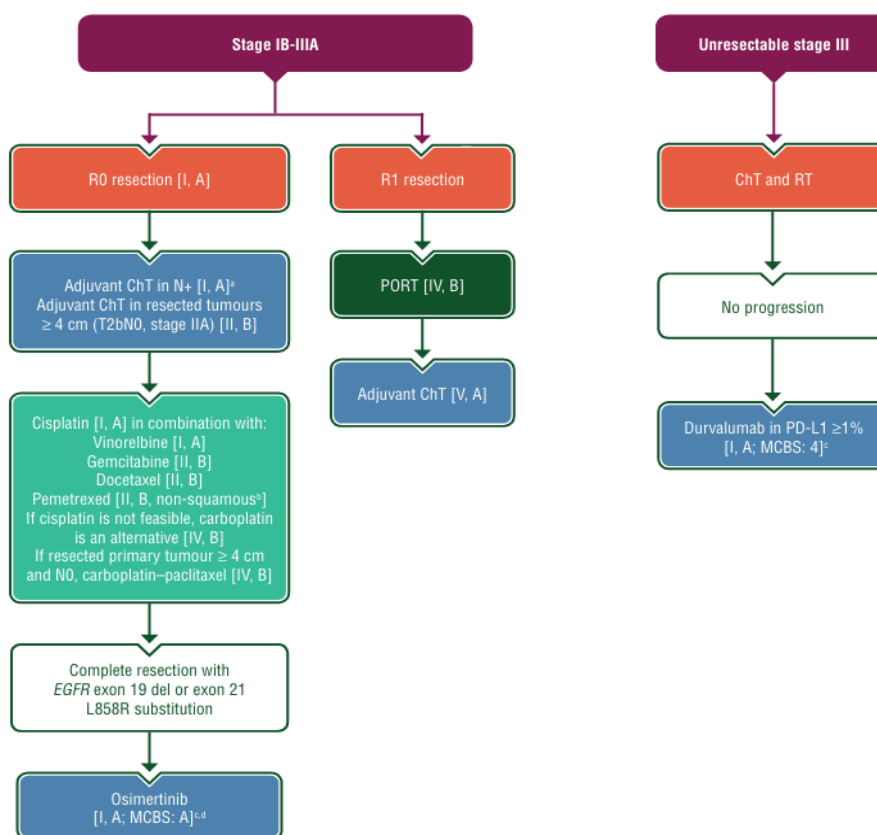


Figura 9: Algoritmo de tratamiento de CPNM según las recomendaciones ESMO³⁴. Fuente: Reproducido de Remon, J et al. *Annals of Oncology*, 2021.

El tratamiento sistémico adyuvante tras la cirugía basado en un doblete con platino debe ofrecerse a pacientes con un **estadio IIB-III**, y considerarse en el **estadio IIA** por tumor >4 cm (Figura 9). La pauta más empleada es cisplatino-vinorelbina en 4 ciclos tras 4-6 semanas de la intervención, si el paciente está recuperado y su condición física lo permite(2); no obstante existen otras combinaciones con platino. La terapia adyuvante aumenta la supervivencia un 4-5% a los 5 años respecto a la cirugía únicamente(40)(41), con mejores resultados para el estadio IIIA. Hasta ahora, no había criterios moleculares para seleccionar en qué pacientes estaba indicada la QT adyuvante más allá de los criterios puramente patológicos, ni existía ningún biomarcador predictivo para seleccionar el esquema de QT.

No obstante, estamos viviendo una era de auge en la inmuno-oncología, con resultados prometedores como detallaremos más adelante.

El papel de la RT postoperatoria en estadios IIIA N2 tras cirugía ha sido controvertido en los últimos años, hasta que dos ensayos clínicos fase III han demostrado que no aporta beneficio en supervivencia libre de enfermedad respecto al grupo placebo(42)(43). Su uso estaría reservado para resecciones incompletas (R1) principalmente.

Estadio IV

En **estadios metastásicos (IVa-IVb)** el tratamiento quirúrgico no se contempla, estimándose una supervivencia entre un 2% y un 13% a los 5 años según las series. En la última década el tratamiento del CPNM avanzado ha evolucionado sustancialmente gracias al conocimiento de la biología molecular tumoral y a la incorporación de nuevos quimioterápicos, agentes biológicos y fármacos dirigidos contra dianas moleculares, mejorando la supervivencia de estos pacientes.

El tratamiento de elección de primera línea en pacientes sin comorbilidad y sin alteraciones genéticas subsidiarias de tratamiento dirigido, es la quimioterapia con dos fármacos: un platino (cisplatino o carboplatino) y un segundo fármaco de tercera generación (taxanos, gemcitabina y vinorelbina para carcinoma escamoso, y pemetrexed o bevacizumab para carcinoma no escamoso), con una pauta de 4-6 ciclos de tratamiento(44). De segunda línea, la inmunoterapia (nivolumab y pembrolizumab - anti-PD1), independientemente de la histología, es mejor opción que la QT. Existen estudios como el KEYNOTE-024, que demuestra que pacientes con una expresión de PD-L1 $\geq 50\%$ en tejido tumoral se benefician de inmunoterapia con pembrolizumab de primera línea, con superioridad al doblete de quimioterapia estándar en supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG)(45). En pacientes con mutaciones drivers, el tratamiento de elección será un TKI (Inhibidor Tirosin-Kinasa) como gefitinib, erlotinib o afatinib para la mutación de *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*), y crizotinib para aquellos con traslocación *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*).

Connotación especial para aquellos pacientes en estadio IV oligometastásico, en los que de forma individualizada y, siempre y cuando la metástasis sea resecable y no exista afectación mediastínica N2, podría plantearse un tratamiento sistémico combinado con cirugía.

1.5.2. Nuevas fronteras terapéuticas

En la actualidad existen varios ensayos clínicos, algunos ya aprobados y en uso en la práctica clínica, que están cambiando el paradigma de tratamiento en CPNM en estadios quirúrgicos. El objetivo principal radica en el empleo de inmunoterapia perioperatoria (adyuvancia o neoadyuvancia) con el fin de mejorar el pronóstico de estos pacientes y ante la eficacia de la combinación de QT e inmunoterapia en la enfermedad avanzada. En la misma línea investigadora, hay ensayos basados en el uso de terapias dirigidas con TKIs en pacientes candidatos a resección quirúrgica. A continuación, haremos un resumen de los ensayos más recientes en terapia perioperatoria(46).

- Inmunoterapia en adyuvancia

Los estudios con inmunoterapia adyuvante en pacientes con CPNM en estadio IB-IIIa resecables han mostrado una mejora de la supervivencia libre de enfermedad (SLE) significativa.

En octubre de 2021, la FDA (Food and Drugs Administration en EEUU) aprobó el uso de **atezolizumab** adyuvante junto con QT con platino tras la cirugía en estadios II y IIIa de CPNM con una expresión tumoral PD-L1 $\geq 1\%$ según la eficacia del estudio *IMpower-010* *NCT02486718* (47). El atezolizumab ha sido posteriormente aprobado por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) y la AEM (Agencia Española del Medicamento).

En enero de 2023, la FDA aprobó el uso de **pembrolizumab** como tratamiento adyuvante tras la cirugía y posterior QT con platino para estadios IB (T2a ≥ 4 cm), II y IIIa de CPNM, según la eficacia del estudio *KEYNOTE-091* (*NCT02504372*). Este fármaco también ha sido aprobado por la EMA.

- Inmunoterapia en neoadyuvancia

En marzo de 2022, la FDA aprobó el uso de **nivolumab** junto con QT basada en un doblete con platino (3 ciclos) como tratamiento neoadyuvante en pacientes con CPNM resecable (estadios IB ≥ 4 cm, II o IIIa según la 7ª edición TNM) independientemente del nivel de expresión de PD-L1, según los resultados del estudio *CHECKMATE-816* (*NCT02998528*)(48) y *NADIM II* para estadios de CPNM IIIa-IIIb(49). El tratamiento con nivolumab mostró mejores tasas de supervivencia sin complicaciones (SSC) y de respuesta patológica completa en comparación con la quimioterapia única. A los 21 meses de seguimiento, la mediana de SSC fue de 31,6 meses (IC 95 %, 30,2–no alcanzado) en el grupo de nivolumab y QT respecto a 20,8 meses (IC 95 %, 14,0–26,7) en el grupo de QT única (CRI, 0,63; IC 97,38 %, 0,43–0,91; $P = 0,005$). De la misma manera, se mejoró la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en el grupo con inmunoterapia, siendo el beneficio mayor para: pacientes con enfermedad en estadio IIIa versus estadio IB o II (CRI, 0,54; IC 95 %, 0,37–0,80 vs. CRI, 0,87; IC 95 %, 0,48–1,56), 2); pacientes con expresión de PD-L1 $\geq 1\%$ versus $<1\%$ (CRI, 0,41; IC 95 %, 0,24–0,70 vs. CRI, 0,85; IC 95 %, 0,54–1,32); y para los pacientes con características histológicas no escamosas. Esta pauta de tratamiento ya ha sido aceptada por la EMA para pacientes con alto riesgo de recidiva y expresión de PD-L1 mayor del 1%.

En octubre de 2023, la FDA aprobó el uso de **pembrolizumab** junto con QT con platino (4 ciclos) en neoadyuvancia en pacientes con CPNM en estadio II, IIIa o IIIb (≥ 1 ganglio ipsilateral en mediastino o ganglio subcarinal) seguido de cirugía y pembrolizumab adyuvante 1 año según la eficacia del ensayo *KEYNOTE-671* (*NCT03425643*)(50). La tasa estimada de SSC a los 24 meses fue del 62,4 % (IC 95 %, 56,8–67,5 %) en los pacientes del grupo de pembrolizumab vs 40,6 % (IC 95 %, 34,8–46,3%) en el grupo placebo. La mediana de SSC no se alcanzó en el grupo de pembrolizumab (IC 95 %, 34,1–NA), siendo 17 meses (IC 95 %, 14,3–22,0) en el grupo de placebo (CRI, 0,58_{progresión, recidiva o muerte}; IC 95 %, 0,46–0,72; $P < 0,001$). La supervivencia global (SG) a los 24 meses fue del 80,9 % en el grupo con pembrolizumab y del 77,6 % en el grupo de placebo ($p = 0,02$, no se alcanzó el criterio de valoración).

En agosto de 2024, la FDA aprobó el uso de **durvalumab** junto con QT con platino en neoadyuvancia (4 ciclos) seguido de durvalumab adyuvante 1 año en pacientes con CPNM resecable (tumores ≥ 4 cm y/o con afectación ganglionar N) sin mutaciones EGFR o ALK previamente documentadas, según el estudio *AEGEAN (NCT03800134)*(51). El primer análisis se hizo con un 32% de madurez de los datos y con una mediana de seguimiento de 12 meses, observándose un beneficio en la tasa de SSC, así como en la respuesta patológica completa con independencia del estadio y de la expresión de PD-L1 en los pacientes con durvalumab preoperatorio.

Existen otros ensayos en neoadyuvancia con QT actualmente en curso como el *NEOTORCH* con torlipalimab o el *RATIONALE 315* con tislelizumab, a la espera de resultados.

El tratamiento neoadyuvante tiene como objetivo actuar sobre la enfermedad micro metastásica y mejorar los resultados quirúrgicos posteriores al reducir el estadio tumoral inicial y permitir resecciones pulmonares no posibles al diagnóstico inicial o que suponían una resección muy extensa. Según el meta-análisis publicado por Mark Sorin et al. a inicios de este año, donde se incluyen 8 ensayos clínicos aleatorizados de entre 43 ensayos seleccionados (3.387 pacientes), concluyen que la quimio-inmunoterapia neoadyuvante es superior a la quimioterapia neoadyuvante en eficacia (SLE y SG) y en respuesta patológica (parcial o completa), mejorando la tasa de resección quirúrgica y completa (R0), sin un aumento en la tasa de efectos adversos relacionados con el tratamiento o con la cirugía (52).

▪ Terapias con TKIs

Igualmente, las alteraciones oncogénicas descritas en el CP avanzado también pueden identificarse en estadios iniciales (15% para *EGFR*). Estudios como el *EVANS fase II* y *ADAURA fase III (NCT02511106)* han evaluado el efecto de TKIs en adyuvancia en pacientes intervenidos, con resultado favorecedores en SG a los 5 años (53)(54). La FDA aprobó en diciembre de 2022 el uso de **osimertinib** en adyuvancia tras la resección completa en pacientes con CPNM en estadios IB a IIIA con delecciones en el exón 19 o mutaciones L858R en el exón 21 de *EGFR*, con o sin QT previa, e histología predominantemente escamosa. Posteriormente ha sido aprobado por la EMA y la AEM (Figura 9).

Queda por definir el rol de los EGFR-TKI en la estrategia neoadyuvante (*fase II EMERGINCG-CTONG-1103* y *fase III NeoADAURA-NCT04351555*). La estrategia perioperatoria también se está estudiando para otras alteraciones oncogénicas con otras terapias dirigidas (*ALINA NCT03456076*, *ALCHEMIST NCT02194738*, *PROMISE trial* y *NAUTIKA NCT04302025*).

A modo de resumen, en la actualidad está aprobado el uso de atezolizumab y pembrolizumab como tratamiento adyuvante tras la cirugía, nivolumab con QT como tratamiento neoadyuvante, y pembrolizumab como tratamiento perioperatorio en pacientes con CPNM resecables (46)(Figura 10).

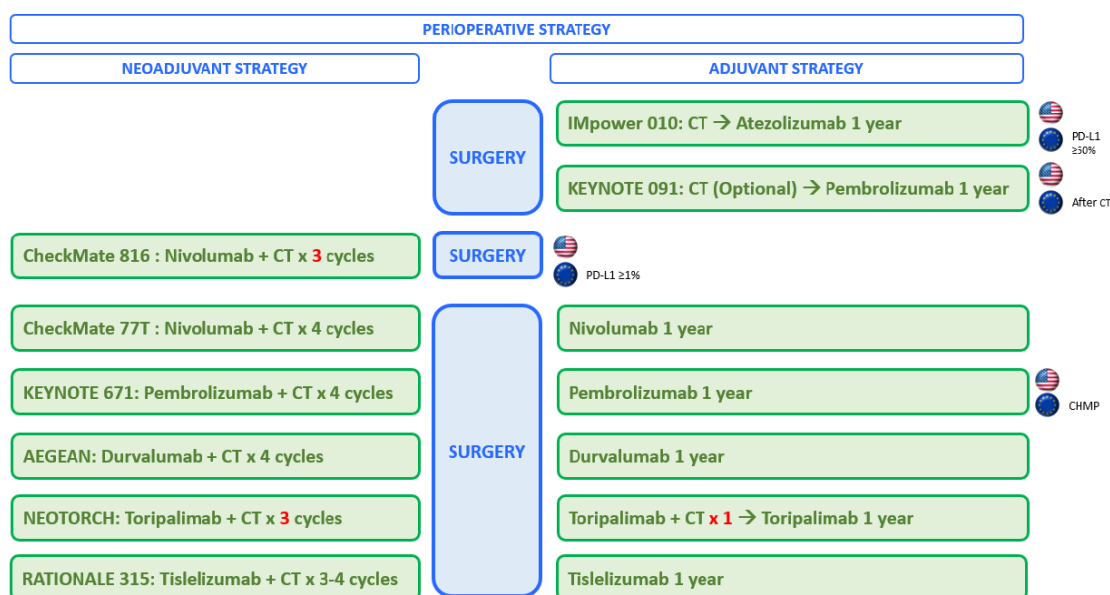


Figura 10: Resumen de los ensayos clínicos y estrategias de tratamiento con inmunoterapia perioperatoria en estadios resecables de CPNM. Fuente: Reproducido de Lavaud, P et al. *Cancers*, 2024⁴³.

A pesar de los nuevos y continuos avances terapéuticos, aún persisten numerosos desafíos en cuanto al uso de la inmunoterapia y terapia TKI perioperatoria, entre ellos: la duración óptima del tratamiento adyuvante, el papel de la enfermedad mínima residual para identificar a los pacientes con alto riesgo de recaída y guiar así las decisiones terapéuticas, y el papel de la QT adyuvante en el CPNM resecado e inducido por oncogenes. Además, se necesitan biomarcadores predictivos de eficacia de estos tratamientos para poder intensificar las estrategias perioperatorias.

1.5.3. Supervivencia según estadios en CPNM

El factor pronóstico con más impacto en CPNM lo determina la clasificación TNM. La supervivencia disminuye progresivamente con la enfermedad más avanzada (Figura 11)(55). La tasa de SG corresponde al número de pacientes vivos al término del periodo de observación, con o sin enfermedad, mientras que la SLE indica la tasa de pacientes vivos al final del periodo de seguimiento sin evidencia de enfermedad y ésta refleja mucho mejor el éxito del tratamiento.

La SG a los 5 años varía entre un 90% para el estadio IA1, un 65% para el estadio IIA, un 41% para el IIIB y solo un 12% para el IIIC, según la 8ª clasificación pTNM (Figura 11).

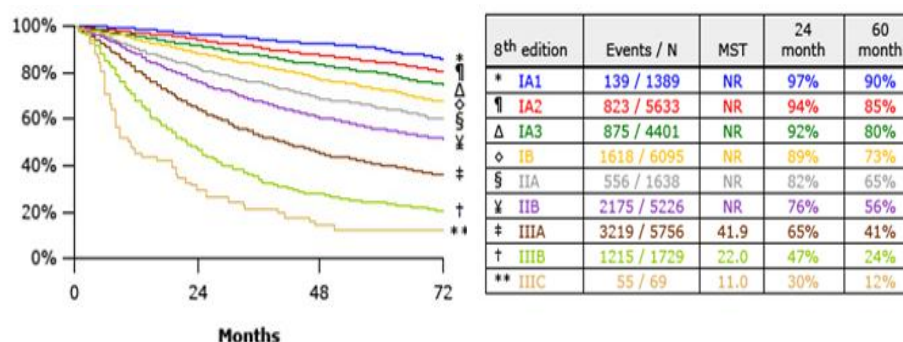


Figura 11: Supervivencia global por estadios patológicos según la 8ª edición TNM. Fuente: Reproducido de Goldstraw, P et al. *Journal of Thoracic Oncology*, 2016⁵⁶.

Como ya se ha comentado, la IASLC ha publicado una nueva propuesta de TNM (9ª edición), que incluye cambios en los descriptores N y M, y específicamente en los subgrupos N2 y M1c, tras observar diferencias de pronóstico entre pacientes de los mismos subgrupos TNM en las ediciones previas. También incluye otros factores como la edad, el sexo o el subtipo histológico, entre otros. Con pocas excepciones, los gráficos de supervivencia y las tasas de supervivencia a 5 años, tanto en el estadio clínico como en el patológico, revelan una disminución constante, ordenada y escalonada de la supervivencia a medida que aumenta el estadio del tumor (Figura 12).

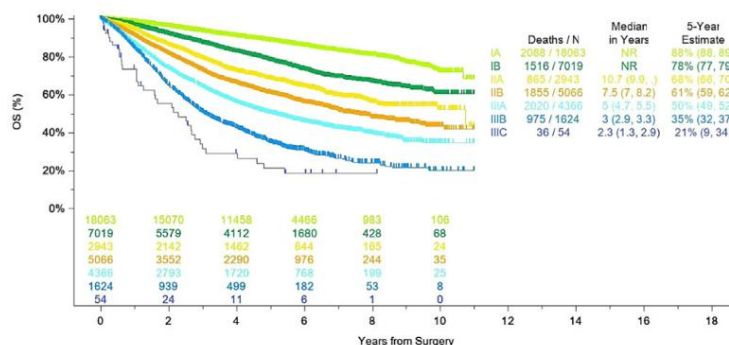


Figura 12: Supervivencia global por estadios patológicos según la 9ª edición TNM. Los datos involucran a todos los pacientes evaluables con CPCNP, M0 y sometidos a resección pulmonar, excluyendo aquellos con terapia neoadyuvante. Fuente: Reproducido de Rami-Porta, R et al. *Journal of Thoracic Oncology*, 2024³⁸.

También se han descrito factores histopatológicos pronósticos como el subtipo histológico, el grado de diferenciación celular, la infiltración linfocítica tumoral, la invasión linfática o la presencia de metástasis ocultas⁽⁵⁶⁾. Dentro del subtipo histológico, el adenocarcinoma tiene mayor capacidad de presentar metástasis ganglionares y a distancia que los escamosos, y dentro de los primeros, los tumores de patrón sólido y micropapilar suelen tener una conducta más agresiva que el patrón lepidico no mucinoso, en el que existe menor capacidad de diseminación. También la invasión vasculo-linfática del tumor parece que empeora el pronóstico.

Otros factores clínicos pronósticos son el estado funcional del paciente, la edad y el abandono del hábito tabáquico. Igualmente, se han descrito múltiples alteraciones genéticas y moleculares que afectan a protooncogenes, genes supresores y genes reparadores del ADN, con implicación clínica y pronóstica, al disponerse de fármacos específicos para un tratamiento individualizado como los TKIs.

El fracaso de los tratamientos y el pobre pronóstico puede resultar de la compleja heterogénea y dinámica naturaleza de los tumores y todos sus factores contribuyentes(57).

1.6. BIOPSIA LÍQUIDA

El diagnóstico de una neoplasia se ha fundamentado en la biopsia tisular del propio tumor o de una metástasis. Sin embargo, existen situaciones en las que la accesibilidad al tumor es difícil, la colaboración del paciente es limitada o el riesgo no es asumible. Así mismo, el cáncer es una enfermedad dinámica y heterogénea compleja tanto intra como inter individualmente(57). Por ello, para entender su comportamiento y evolución es importante el acceso al tumor en distintas etapas y conocer su perfil histológico y molecular en tiempo real, lo cual es posible gracias a la biopsia líquida (BL).

1.6.1. Concepto, componentes y biomarcadores de la biopsia líquida

Según la definición de la Sociedad Internacional de Biopsia Líquida (ISLB), la biopsia líquida es un examen mínimamente invasivo que utiliza fluidos corporales para identificar biomarcadores circulantes asociados a una enfermedad, como por ejemplo el cáncer. El propósito es recopilar información diagnóstica, pronóstica y/o predictiva de la enfermedad.

El camino de la biopsia líquida comenzó en la década de 1970, cuando los investigadores identificaron por primera vez células tumorales circulantes (CTCs) en la sangre de pacientes con cáncer. En los años siguientes su estudio se extendió a la detección de ADN libre circulante (cfDNA), descrita por primera vez por Mandel y Metais en 1948. El cfDNA plasmático es liberado principalmente por células mononucleares de sangre periférica y endoteliales; en pacientes con cáncer, una pequeña fracción de cfDNA consiste en fragmentos de ADN liberados en la sangre por células tumorales, denominados ADN tumoral circulante (ctDNA)(58). El descubrimiento del ADN tumoral circulante (ctDNA) en la sangre de pacientes con cáncer marcó un hito crítico, al descubrir que contenía las mismas mutaciones genéticas que el tumor primario(59). El verdadero avance en la biopsia líquida llegó con la aparición de la secuenciación de nueva generación (NGS) y las tecnologías de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) digital. Estas herramientas permitieron la detección precisa de mutaciones genéticas, variaciones en el número de copias y otras alteraciones en el ctDNA, incluso en cantidades muy pequeñas a partir de una simple muestra de sangre.

La interacción estroma-tumor o microambiente tumoral juega un papel importante en la regulación de la progresión tumoral local y posterior proceso metastásico. En este proceso participan distintas moléculas o analitos circulantes derivados del tumor (células tumorales circulantes, cfDNA, vesículas extracelulares y ácidos nucleicos), que inducen fenotipos celulares anormales como las TEPs (Tumor Educated Platelets), TANs (Tumor Associated Neutrophils) y CAFs (Cancer Associated Fibroblast), entre otros, y modulan el comportamiento del tumor y las respuestas estroma-tumor.

La biopsia líquida permite el estudio de estos biomarcadores a partir de una muestra fluida. Los protocolos de prueba para fluidos biológicos, como el derrame pleural y el líquido cefalorraquídeo, carecen de estandarización y siguen existiendo desafíos para lograr una sensibilidad y especificidad óptimas. La sangre periférica sigue la muestra fluida más estudiada para evaluar la heterogeneidad espacial y temporal del tumor. La sangre se

centrifuga, obteniéndose dos componentes: el plasma o suero y la fracción celular, aislándose distintas moléculas en cada uno de ellos (Figura 13)(60).

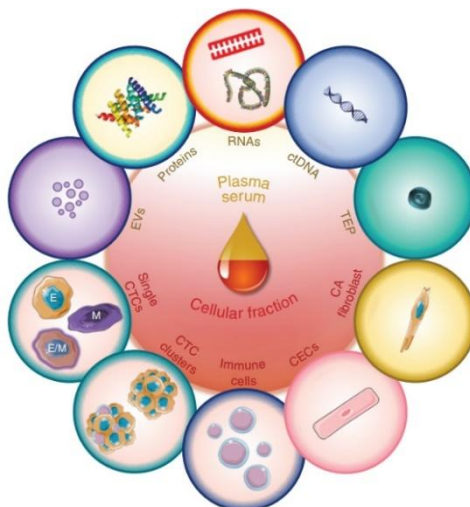


Figura 13: Sangre centrifugada y moléculas predominantes tanto en plasma (amarillo) como en la porción celular (rojo). Fuente: Reproducido de Alix-Panabières, C et al. Cancer Discovery, 2021⁵⁶.

En cáncer de pulmón en estadios avanzados, la biopsia líquida de sangre es una herramienta valiosa para la detección, monitorización y pronóstico de la enfermedad. Permite identificar diversos biomarcadores asociados a este tipo de cáncer, que incluyen:

- a) **ADN tumoral circulante (ctDNA):** fragmentos de ADN que provienen de las células tumorales que se liberan al torrente sanguíneo a medida que estas células mueren o se dividen. Puede ser utilizado para detectar mutaciones genéticas específicas en CP (EGFR, KRAS, ALK, ROS1, BRAF, etc.). Además, se usa para identificar mutaciones asociadas a resistencia a tratamientos, como las relacionadas con inhibidores de tirosina quinasa. La cantidad de ctDNA circulante es significativamente menor que la cantidad de DNA libre circulante (cfDNA) pero significativamente mayor que otros componentes (células tumorales, exosomas, etc.).
- b) **ARN mensajero (mARN):** es el intermediario en la expresión génica que transporta la información genética desde el ADN hacia los ribosomas, donde se traduce en proteínas. Su análisis permite detectar la expresión de genes asociados al cáncer de pulmón y proporcionar información sobre la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento. Algunos genes de interés incluyen aquellos relacionados con la proliferación celular y la apoptosis.
- c) **MicroARN (miRNA):** son moléculas pequeñas de ARN no codificante que regulan la expresión génica y pueden estar involucrados en la progresión del cáncer. Los perfiles de miRNA en la sangre pueden usarse en el diagnóstico y como predictores de pronóstico. Los miRNA específicos, como el miR-21, miR-155, miR-210 y miR-34a, se han encontrado alterados en pacientes con cáncer de pulmón.

- d) Células tumorales circulantes (CTC):** se estudian más detalladamente en el siguiente apartado.
- e) Exosomas:** son pequeñas vesículas extracelulares que contienen ADN, ARN, proteínas y lípidos que pueden reflejar el perfil molecular del tumor. Son liberadas por células tumorales en el entorno extracelular. Se ha encontrado que los exosomas de CP contienen proteínas como EGFR y KRAS, entre otras. Las biopsias líquidas basadas en exosomas son especialmente prometedoras para detectar cánceres en etapas tempranas, ya que estas vesículas están presentes en mayores cantidades y son más accesibles en las muestras de sangre que las CTCs o el ctDNA.
- f) Proteínas plasmáticas:** pueden reflejar la actividad biológica del tumor y de las células inmunitarias, y son una fuente importante de biomarcadores. Algunas proteínas específicas asociadas al CP incluyen:
- CEA: elevado CP de tipo adenocarcinoma.
 - CYFRA 21-1: marcador de cáncer de pulmón no microcítico.
 - NSE: elevada en el cáncer de pulmón de células pequeñas.
 - ProGRP (Pro-Gastrin-Releasing Peptide): Usada en la detección del cáncer de pulmón de células pequeñas.
- g) Metilación del ADN:** la metilación del ADN implica la adición de grupos metilo a las bases del ADN, lo que puede alterar la expresión génica sin cambiar la secuencia del ADN. En CP la metilación anormal de genes específicos como p16INK4a, RASSF1A, y GSTP1, puede estar asociada con la carcinogénesis y servir como biomarcadores para la detección temprana y monitorización de la enfermedad.
- h) Biomarcadores inmunológicos:** son moléculas que reflejan la actividad inmunitaria y la interacción entre el tumor y el sistema inmunológico. Los biomarcadores inmunológicos como PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) y CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) son esenciales para la evaluación de la respuesta al tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunitarios en pacientes con CP, especialmente en aquellos con cáncer de pulmón no microcítico.
- i) Ácidos nucleicos circulantes:** Además del ADN y ARN mencionados, las células tumorales liberan otros tipos de ácidos nucleicos al torrente sanguíneo en estudio.

1.6.2. Utilidad, ventajas e inconvenientes de la biopsia líquida

Es una herramienta no invasiva, accesible y reproducible, que aporta ventajas frente a la biopsia tisular en cuanto a(61):

- a) Diagnóstico: permite una detección precoz y una monitorización de la enfermedad mínima residual.
- b) Pronóstico: ayuda a identificar el riesgo de recurrencia y establecer una correlación con la carga tumoral.

c) **Predictivo**: facilita una monitorización de la dinámica tumoral y permite evaluar en tiempo real la respuesta al tratamiento, así como posibles mutaciones de resistencia al mismo.

Sin embargo, también enfrenta desafíos en cuanto a sensibilidad, especificidad, y accesibilidad. Entre sus limitaciones está la posibilidad de falsos negativos en comparación con la biopsia tradicional, ya que la cantidad de ctDNA diseminado en sangre por el tumor puede ser escaso y variable en comparación con el número de células hematológicas, sobre todo en tumores pequeños o estadios tempranos. Además, tampoco existen protocolos estandarizados para su uso en la práctica clínica. En la actualidad, su utilidad se limita cuando no es posible obtener una biopsia convencional o ésta no es concluyente, tanto en cáncer de pulmón como colorrectal metastásicos para determinar ctDNA. De la misma manera, no existe unanimidad en cuál es el mejor método de análisis y detección de cDNA y/o CTCs, siendo métodos de gran complejidad técnica, elevado coste y especialización.

No obstante, el uso juicioso de la biopsia líquida puede mejorar los resultados diagnóstico y terapéuticos en la práctica clínica, complementando la biopsia tisular.

A continuación, detallamos una tabla resumen (Tabla 5) de las ventajas e inconvenientes de la biopsia líquida comparativamente con la biopsia tisular.

BIOPSIA TISULAR	BIOPSIA LÍQUIDA
Más invasivo	Menos invasivo
Permite un diagnóstico histológico y un estadiaje tumoral	No permite un diagnóstico histológico ni un estadiaje tumoral
Mayor tiempo para resultados	Menos tiempo para resultados
Menos representativo de la heterogeneidad tumoral	Más representativo de la heterogeneidad tumoral temporal
Menos accesible y repetible	Más facilidad para repetir la muestra
Mayor sensibilidad y especificidad	Sensibilidad y Especificidad variables
Estandarizado “gold estándar”	Falta de estandarización

Tabla 5: Comparativa de ventajas e inconvenientes entre biopsia tisular y biopsia líquida

1.7. CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

El proceso de diseminación tumoral, por vía sanguínea o linfática, es una de las principales características de los tumores con capacidad invasiva favoreciendo el desarrollo de metástasis. Es el proceso por el que algunas células se desprenden del tumor primario atravesando la matriz extracelular que las rodea, alcanzan el torrente sanguíneo y el sistema linfático sobreviviendo hasta alcanzar una nueva localización tumoral secundaria.

Las CTCs son células desprendidas de una neoplasia sólida o sus metástasis al torrente sanguíneo y pueden ser precursoras de futuras metástasis. Se ha estimado que la tasa de diseminación tumoral es de alrededor de 3,2 millones de células por gramo de tumor al día. La mayoría de estas células se eliminan rápidamente, aquellas que sobreviven en el torrente sanguíneo y evaden al sistema inmunitario tienen el mayor potencial metastásico(62). Su primera descripción data de 1869, propuesta por Thomas Ashworth, al describir en autopsias de pacientes con cáncer de próstata células idénticas al tumor primario en sangre periférica. Desde su descripción hasta la fecha, se confirma que este tipo de células participa en el proceso de diseminación tumoral de neoplasias de tipo epitelial, por lo que su estudio abre un amplio campo de investigación en oncología.

Una definición con carácter inmuno-histoquímico define las CTCs como células con proteínas de superficie positivas para EpCAM (molécula de adhesión de células epiteliales) y citoqueratinas 8, 18 o 19, con núcleo intracelular, sin expresión de CD45 y con al menos un tamaño de 4 µm. Estas características y tamaño hacen que su paso a la sangre se vea condicionado, dificultando así su detección; se estima una incidencia entre 1-10 CTCs por 1 ml de sangre, siendo mayor en tumores localmente avanzados y metastásicos. Por ello, sufren una serie de cambios fenotípicos o *fenómeno de transición epitelio-mesenquimal (EMT)*, por el que cambian algunas de sus propiedades inmuno-histoquímicas y morfológicas para pasar al torrente sanguíneo, evolucionando de una forma epitelial a una mesenquimal más agresiva(63), expresando marcadores mesenquimales (N-cadherin, Vimentin, Twist, Snail o Zeb, entre otros)(64). Además, las CTCs también pueden presentar marcadores específicos del cáncer, como el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2), receptores de estrógenos, el antígeno prostático específico de membrana y otros(65). Por el mismo proceso a la inversa (*MET- transición mesénquima-epitelial*) son capaces de pasar de la sangre a cualquier órgano, donde se depositan y pueden formar metástasis. Este proceso limita su detección, al perder biomarcadores de superficie específicos.

Pueden aislarse de forma individual o en forma de clústeres al agruparse dos o más, lo que también se denomina micro metástasis, agregados tumorales circulantes o micro émbolos tumorales circulantes, a los cuales pueden adherirse plaquetas, con mayor vida media y potencial metastásico. Las CTCs son células muy heterogéneas en su morfotipo y fenotipo debido a su distinto origen intratumoral, y a los cambios que sufren desde su desprendimiento del tumor primario, por lo que pueden identificarse distintas subpoblaciones(6). Su vida media suele ser 1-2,5 horas aunque esto varía, pudiendo quedar latentes en ganglios linfáticos, hígado o médula ósea, y reactivarse en condiciones idóneas originando recurrencias a largo plazo; esto se conoce como célula tumoral diseminada (*DTC*)(63).

1.7.1. *Sistemas de detección de CTCs*

A pesar del desarrollo en los últimos años, no existe un sistema de detección de CTCs estandarizado. Las técnicas actuales presentan limitaciones, ya que también detectan células epiteliales normales, CTCs sin potencial metastásico e infraestiman la subpoblación de CTCs-EMT al usar como marcadores de superficie EpCAM, por lo que la detección y cuantificación no es suficiente sin caracterización molecular (Figura 14)(66).

Para su aislamiento es necesaria una fase de enriquecimiento inicial basada en propiedades biológicas de inmuno selección (por ejemplo, proteínas de superficie como EpCAM o citoqueratinas) y/o físicas (tamaño, densidad, carga eléctrica, etc.), para posteriormente proceder a su identificación y caracterización(66)(61). A continuación, se describen algunos de los métodos de aislamiento según cada propiedad, siendo ilustrados a modo de resumen en la Figura 14.

a) **Métodos inmuno-magnéticos**

Su fundamento es el empleo de anticuerpos marcados dirigidos contra proteínas de superficie y citoqueratinas, principalmente contra EpCAM. Los sistemas más conocidos son **CellSearch®** e **Isoflux TM®**. Ambas técnicas obtienen un porcentaje de recuperación entre el 40-75%. El sistema CellSearch® es el único método de separación inmuno-magnético aprobado por la FDA para la detección y cuantificación de CTCs en el seguimiento de pacientes con cáncer colorrectal, de mama y próstata metastásico. Esta tecnología enriquece las CTCs con anticuerpos contra EpCAM unidos a ferrofluidos magnéticos para su aislamiento mediante gradiente de densidad inmuno-magnético (inmuno afinidad positiva). Después de la captura, las células son aisladas y contadas utilizando un sistema automatizado. Posteriormente, las CTCs aisladas se visualizan mediante fluorescencia dada la alta expresión de CK 8, 18 y la ausencia de expresión de CD45. Una posible limitación de esta técnica son los falsos negativos debido a la pérdida de marcadores de superficie epitelial que experimentan algunas CTCs en la transición epitelio mesenquimal (EMT), así como la incapacidad para capturar CTCs con baja o nula expresión de marcadores epiteliales(67). Otra limitación es la necesidad de fijación celular para su estabilización, lo que impide una mayor caracterización celular viable (como el cultivo de CTCs, cultivo de organoides 3D de CTCs o los xenoinjertos derivados de las mismas). Otra desventaja es la baja pureza de las células aisladas (60-70 %), al estar contaminadas con células sanguíneas o células epiteliales circulantes normales. En este sentido, Isoflux® y su enfoque basado en micro fluidos y separación por inmuno afinidad específica (método dual), tiene la ventaja de ofrecer un enriquecimiento y pureza más eficientes. Es un sistema más automatizado para la separación y análisis de CTCs, con mayor flexibilidad para la personalización de los marcadores según el tipo de cáncer, y aportando una mayor sensibilidad.

También pueden usarse el anticuerpo CD45, que es un antígeno leucocitario común para evitar falsos positivos con las células sanguíneas (inmuno afinidad negativa). La muestra se incuba con anti-CD45 unido a partículas magnéticas y se expone a un imán que retiene a los leucocitos marcados, separándolos así de las CTCs.

MACS® (Magnetic Activated Cell Sorting) es otra tecnología basada en el uso de anticuerpos conjugados a partículas magnéticas. Se fundamenta en el enriquecimiento inmuno-magnético de CTCs mediante anticuerpos contra marcadores de superficie celular o mediante un anticuerpo intracelular anti-pan-citoqueratinas (enriquecimiento tanto positivo como negativo) para aislar células de interés. Una vez que estas células están marcadas con las partículas magnéticas, se pueden separar utilizando un campo magnético. Sin embargo, esta tecnología presenta problemas como la dependencia de la presencia de EpCAM y citoqueratinas, así como la variación en su expresión entre los diferentes tipos de cáncer y estadios. Además, el uso de anticuerpos costosos conlleva a un aumento del coste de la detección y la internalización de micro y nano magnéticos afecta la viabilidad de las células capturadas. Además, tras la detección las CTCs no pueden analizarse en tiempo real ni en condiciones de células vivas, ya que las células se fijan durante el proceso(68). En comparativa, no dispone de una tecnología especializada ni automatizada como los sistemas previos.

b) Métodos de separación físicos

Esta tecnología de microfiltración separa las células por tamaño, evitando el uso de marcadores epiteliales. Las células tumorales son más grandes (15-40 μm de diámetro) que los leucocitos (< 10 μm de diámetro). Se basa en el paso de la sangre por membranas de policarbonato que presentan poros de 8 μm de tamaño, por donde fluyen las células quedando atrapadas las de mayor tamaño como las CTCs, bien de forma individual o a modo de pequeños clústeres, con una tasa de recuperación relativamente alta. El principal problema es la presión ejercida a su paso por el filtro que puede dañar las células y su vitalidad. En este grupo destaca el sistema **ISET®** (Isolation by Size of Epithelial Tumor cells). De forma similar, existen métodos de separación por gradiente de densidad que permiten separar las CTCs por su alta proporción de su núcleo respecto al citoplasma como el sistema **OncoQuickTM®**.

c) Métodos mixtos

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis de células en suspensión utilizando un láser para medir características como el tamaño, la forma, y la intensidad de la fluorescencia. Dentro de este grupo destaca la tecnología **FAST®** (tecnología de escaneo de fibra óptica).

Las plataformas microfluídicas utilizan micro canales para filtrar y capturar las CTCs sin necesidad de filtros. Incorporan tecnologías avanzadas de captura, análisis y clasificación de células a través de métodos como la dielectroforesis, que separa las células basándose en su comportamiento ante un campo eléctrico como el sistema **CTC-Chip**. Además, también se han desarrollado tecnologías basadas en la detección de sustancias producidas por CTCs como el **EPISPOT®** y en la inmunofluorescencia como el **NanoVelcro®**, entre otros.

En resumen, los métodos más utilizados para detectar CTCs incluyen inmuno magnética, citometría de flujo, filtración, microchip y secuenciación de ADN/ARN, siendo **CellSearch®** la única plataforma aprobada por la FDA en el momento actual.

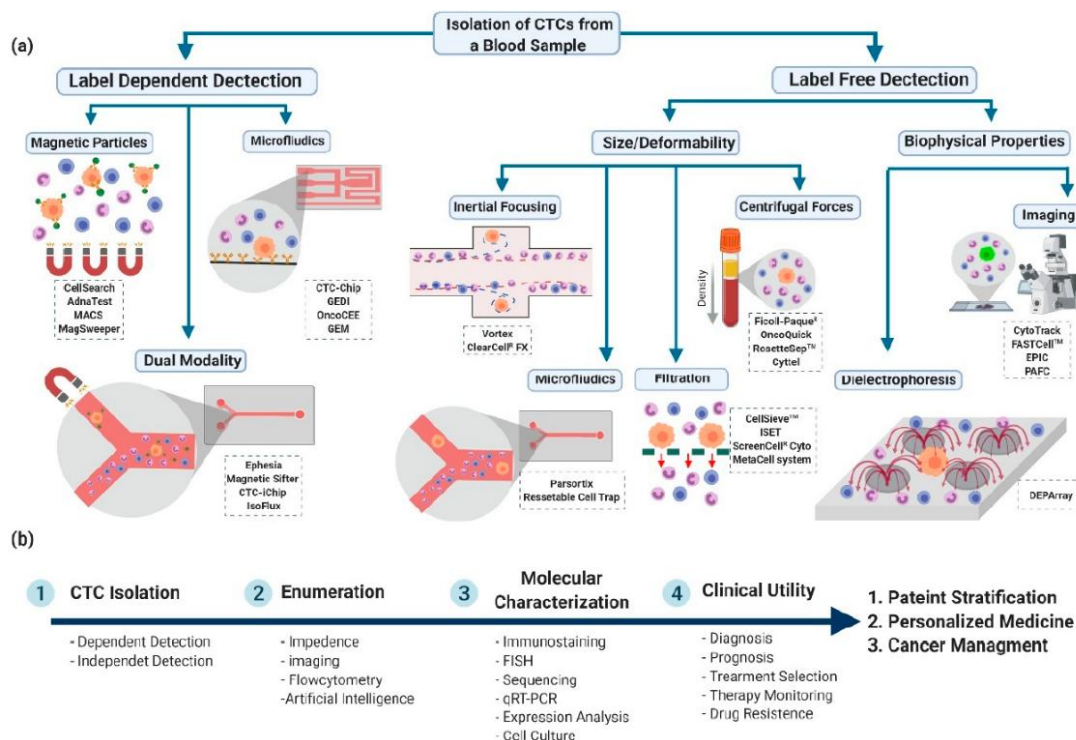


Figura 14: Métodos y tecnologías de detección y aislamiento de CTCs (A) y utilidad clínica del aislamiento y caracterización de CTCs en tiempo real (B). Fuente: Reproducido de Habli, Z et al. Cancers, 2020⁶⁵.

1.7.2. Caracterización de las CTCs

Además de la detección y enumeración de las CTCs, su caracterización es clave para confirmar el origen del tumor primario o metástasis y analizar posibles cambios durante el proceso evolutivo y el tratamiento. Esta caracterización es esencial para entender la biología del tumor, su agresividad, su heterogeneidad, y para guiar decisiones terapéuticas.

La tecnología FISH se ha puesto en uso para caracterizar CTCs en cáncer de mama, riñón, próstata y colon, demostrando aneuploidía en estas células coincidente con el tumor primario(69). Respecto a cáncer de pulmón, el grupo de Maheswaran, demostró la mutación *EGFR* en CTCs en pacientes con CP y mutación previamente conocida en el tumor primario(70). Durante el seguimiento con CTCs se detectó una mutación de resistencia para *EGFR*, coincidente con la resistencia al tratamiento con TKIs. Además, se detectaron mutaciones adquiridas para *EGFR* no presentes en el tumor primario, indicativo de la evolución de clones celulares tumorales dominantes tras el tratamiento selectivo. Por tanto, es posible caracterizar y conocer alteraciones genéticas de estos biomarcadores de biopsia líquida, coincidentes o no con los del tumor primario de la biopsia tisular, complementándose toda esta información. Esto nos permitirá un conocimiento más detallado y exhaustivo del tumor que queremos tratar, no solo en el momento del diagnóstico si no durante su evolución terapéutica.

Existen distintos métodos para la caracterización de CTCs, siendo los más empleados la microscopía de fluorescencia y citometría de flujo para la caracterización fenotípica, y las

técnicas de PCR y NGS para la caracterización genómica. Además de la caracterización descriptiva, los estudios funcionales como las tecnologías EPISPOT® y EPIDROP®, así como la expansión in vivo/in vitro de CTCs y los estudios metabolómicos, están en estudio para comprender mejor la biología de las CTCs(71).

A. Caracterización Fenotípica de las CTCs

La caracterización fenotípica se enfoca en las características observables de las CTCs, como la morfología, la expresión de biomarcadores de superficie y la capacidad de diferenciarlas de otros tipos celulares circulantes como los leucocitos. Los métodos más utilizados son:

- Citometría de flujo: consiste en analizar células en suspensión a medida que pasan a través de un láser, lo que permite medir características como el tamaño, la complejidad interna, y la intensidad de fluorescencia asociada a marcadores específicos de superficie, para lo que se usan anticuerpos marcados con fluorocromos. En cáncer de pulmón, se emplean marcadores como EpCAM, HER2, CD45 y citoqueratinas. Entre sus ventajas permite un análisis rápido y preciso de un gran número de células pudiendo detectar múltiples biomarcadores de forma simultánea. Al depender de la expresión de los biomarcadores seleccionados puede haber falsos negativos si las CTC no expresan dichos marcadores.
- Microscopía de fluorescencia: permite visualizar las CTC marcadas con anticuerpos fluorescentes específicos y observar directamente la morfología celular y la expresión de biomarcadores. Se usan anticuerpos específicos para marcar proteínas en la superficie de las CTCs, como EpCAM, Cytokeratin o Vimentina, y se visualizan bajo un microscopio de fluorescencia. También se puede combinar con tinciones morfológicas para estudiar la forma de las células, permitiendo identificar subtipos de CTCs. Requiere tiempo y personal altamente capacitado para interpretar los resultados. La capacidad de análisis es limitada en comparación con métodos automatizados como la citometría de flujo.
- Plataformas microfluídicas: las plataformas microfluídicas utilizan dispositivos pequeños (chips) para manipular fluidos y separar células basándose en sus propiedades físicas, como tamaño, forma y rigidez. Estas plataformas pueden detectar CTCs sin necesidad de anticuerpos específicos, incluso aquellas que no expresen los biomarcadores clásicos como EpCAM.

B. Caracterización Molecular de las CTCs

La caracterización molecular se refiere al análisis del contenido genético y transcriptómico de las CTCs, lo que permite obtener información sobre las mutaciones, alteraciones genéticas, y la expresión génica que caracterizan al tumor. Los métodos más empleados son:

- Secuenciación de nueva generación (NGS): la NGS permite secuenciar grandes cantidades de ADN o ARN, lo que proporciona una visión exhaustiva del perfil genético y transcriptómico de las CTCs. Este método es especialmente útil para identificar mutaciones, fusiones génicas, alteraciones estructurales y perfiles de

expresión génica. En cáncer de pulmón, se pueden detectar mutaciones clave en genes como *EGFR*, *KRAS*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, etc. que son relevantes para las decisiones terapéuticas. Como limitación, es un sistema costoso y requiere equipos especializados. Además, la cantidad de ADN/RNA disponible de las CTCs es limitada debido a su baja concentración en la sangre.

- PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): es una técnica que amplifica secuencias específicas de ADN o ARN. Se puede utilizar para detectar mutaciones en genes clave como *EGFR*, *KRAS*, *ALK* y *ROS1* entre otros. En cáncer de pulmón, la PCR se utiliza para detectar mutaciones específicas con alta sensibilidad que pueden guiar el tratamiento con medicamentos dirigidos. Es una técnica rápida, precisa y relativamente accesible. Como limitaciones, no proporciona información sobre otras alteraciones genéticas o la heterogeneidad del tumor, y requiere una cantidad suficiente de material genético.
- FISH (Hibridación in situ fluorescente): es una técnica que utiliza sondas fluorescentes para identificar y localizar secuencias específicas de ADN dentro de las células. En cáncer de pulmón, se utiliza principalmente para detectar fusiones del gen *ALK* y amplificaciones de *EGFR*. Es muy específica para la detección de fusiones génicas y alteraciones estructurales del ADN, pero puede no ser tan eficiente para la detección de mutaciones puntuales.
- Análisis de expresión génica (Microarrays y PCR en tiempo real): permite evaluar la cantidad de ARN mensajero (ARNm) de diferentes genes. Esto ayuda a identificar patrones de expresión génica relacionados con la progresión del cáncer o la resistencia a tratamientos. Se utiliza para identificar biomarcadores que pueden guiar la elección de tratamientos, como los inhibidores de puntos de control inmunitario o la quimioterapia.
- Proteómica: analiza las proteínas presentes en las CTCs, utilizando técnicas como la espectrometría de masas. Ayuda a identificar proteínas que están involucradas en la progresión tumoral y la resistencia a tratamientos. En cáncer de pulmón, el análisis proteómico de las CTCs permite identificar marcadores de resistencia a terapias dirigidas o a la inmunoterapia. Entre sus inconvenientes, es un proceso costoso y técnicamente desafiante, además de depender de la cantidad de proteínas disponibles de las CTCs.

1.7.3. Valor clínico de las CTCs en cáncer de pulmón

La mayoría de los estudios relacionan la presencia y mayor cuantificación de CTCs con una peor supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP). Estos hallazgos también se han observado en otros estudios con otros tumores epiteliales (pulmón, hepatocarcinoma, cabeza y cuello, etc.) con resultados similares. No obstante, el uso de diferentes tecnologías y la determinación de distintos puntos corte con carácter pronóstico dificultan el uso de CTCs y la estandarización en la práctica clínica, principalmente en tumores no metastásicos.

En CPNM en estadios avanzados varios meta-análisis (72)(4) han demostrado que la mera presencia de CTCs en sangre se considera un factor de mal pronóstico relacionado con peor SLP y SG. Además, las CTCs con expresión elevada de EpCAM también se han considerado factor de mal pronóstico en CPNM en estadios avanzados (IIb-IV) respecto a CTCs con baja expresión de EpCAM(73). Respecto a CPNM en estadios iniciales subsidiarios de cirugía, la detección de CTCs en algún momento evolutivo también se relaciona con un peor pronóstico.

Hofman estudió la presencia de CTCs en sangre preoperatoria de 208 pacientes mediante el método ISET®, observando durante el seguimiento (24 meses), que la presencia de 50 CTCs o más empeoraba la SG y supervivencia libre de enfermedad (SLE), independientemente del estadio del tumor(74). Este mismo grupo llegó a un resultado similar al comparar CellSearch® con ISET®. Nuestra compañera Bayarri, observó en una serie de 56 pacientes que la presencia de CTCs mediante MACS Technology® un mes después de la resección pulmonar se relacionó con una recurrencia precoz más alta y una SLE más corta(75). Del mismo grupo de trabajo y usando la misma tecnología, De Miguel observó en una serie de 97 pacientes intervenidos, y en concreto aquellos con subtipo histológico de adenocarcinoma, que la presencia de CTCs en el postoperatorio se asociaba a una peor SLP (76). En estadios iniciales, además, el aumento intraoperatorio de los niveles de CTCs en la vena pulmonar durante la cirugía también se ha correlacionado con un peor pronóstico (SG, SLE y tiempo hasta la metástasis) según el grupo de Francesca Chemi(77) y Masaki Hashimoto(78), aunque no queda claro si puede deberse a la manipulación quirúrgica. No obstante, las limitaciones en estadios iniciales son razonablemente mayores, debido a su menor cuantificación en sangre.

1.8. BIOLOGÍA MOLECULAR

1.8.1. Biomarcadores en CPNM

El estudio molecular en el cáncer es cada vez más importante, permitiendo un tratamiento dirigido e individualizado que ofrezca mejores resultados y menor toxicidad. Determinadas mutaciones somáticas en el genoma tumoral, conocidas como “drivers mutations” o “mutaciones conductoras”, son responsables del crecimiento, proliferación y mantenimiento de las células tumorales. Otras alteraciones moleculares, conocidas como “passenger mutations” o “mutaciones pasajeras”, son menos determinantes en el mantenimiento del fenotipo oncogénico. Estas mutaciones son específicas de las células tumorales (no existen en el genoma de la línea germinal -no cancerosa- del huésped) y normalmente son excluyentes (es poco probable que un cáncer tenga más de una mutación conductora). El estudio de biomarcadores e inmuno marcadores en CPNM es imprescindible para ofrecer un tratamiento dirigido y más específico respecto a la quimioterapia estándar.

Las determinaciones moleculares imprescindibles en CPNM en estadio avanzado, según el último consenso SEAP (Sociedad Española de Anatomía Patológica)-SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica) de 2019 son: *EGFR* (*Epidermal Growth Factor Receptor*), *ROS1* y reordenamiento *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), *BRAF* y PD-L1 en los CPNM no escamosos y en CPNM escamosos en pacientes menores de 50 años y/o no fumadores, y exclusivamente PD-L1 en CPNM escamoso en fumadores y/o mayores de 50 años(79)(Figura 15). La detección es posible mediante biopsia, citología, así como en biopsia líquida, según la experiencia de cada centro.

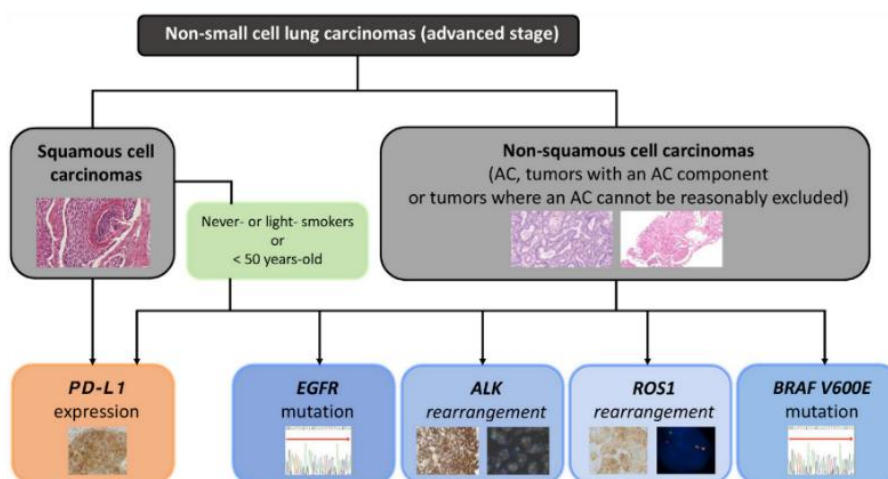


Figura 15: Biomarcadores imprescindibles en CPNM avanzado. Fuente: Reproducible de López-Ríos, F et al. *Revista Española de Patología*, 2020⁷⁶.

Mutación *EGFR*: presente en el 15% de adenocarcinomas de pulmón (y hasta el 60% en raza asiática) y en no fumadores. La mutación del receptor *EGFR* estimula varias vías de señalización intracelular como PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK y STAT, que están implicadas en el crecimiento y progresión tumoral. Las mutaciones más prevalentes (85-90%) son las mutaciones de sensibilidad a inhibidores de tirosina kinasa (TKIs), como la delección del

exón 19 y la mutación en el exón 21, seguida de la inserción del exón 20 (T790M) (50-60%), que proporciona resistencia a los TKIs. Existen distintas líneas de tratamiento dirigidas a la mutación *EGFR*, con mejores tasas de respuesta y supervivencia en comparación con la terapia con platino. Como primera línea de tratamiento se usa erlotinib y gefitinib, como segunda línea el afatinib, y como tercera línea y en las formas mutadas secundariamente (T790M) el osimertinib, según la guías de práctica clínica(80).

Traslocación *ALK*: presente en un 5% de los CPNM avanzados. Es resultado de la ruptura de los genes *EML4* (*echinoderm microtubule-associated proteine-like4*) y *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*), y posteriormente la fusión de los dos en dirección opuesta, resultando el oncogén *EML4-ALK* que inhibe la apoptosis y favorece la proliferación tumoral al activar diferentes vías de señalización como PI3K/AKT, RAS/RAF/ERK y STAT. La primera línea de tratamiento en estos pacientes es el crizotinib. Existen ensayos clínicos en fase 3, con ceritinib y alectinib para formas mutadas, como segunda línea con resultados prometedores.

Traslocación *ROS1* (1-2%): la traslocación más frecuente es resultado de la unión *CD74-ROS1*, de predominio en pacientes jóvenes con adenocarcinoma (componente sólido y células en anillo de sello, igual que los portadores de la traslocación *ALK*). Crizotinib es el tratamiento diana de primera línea. Actualmente existe ensayos clínicos para las formas mutadas con ceritinib, cabozantinib y foretinib, aún no aprobados.

Mutación *BRAF* (2%): la mutación más frecuente es la V600E, hasta en el 50% de las series. Es casi siempre mutuamente excluyente con las principales alteraciones mencionadas anteriormente. En la actualidad, está aprobado el tratamiento con dabrafeninb y trametinib en los pacientes con la mutación V600E.

PD-L1: es una proteína transmembrana y puede ser expresada tanto por células hematopoyéticas, como los linfocitos, como por células tumorales. Su sobreexpresión es predictiva de beneficio clínico con fármacos inhibidores de PD-1/PD-L1 (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, etc.) en CPNM avanzado o irresecable, en enfermedad metastásica, y en pacientes con CPCNP avanzado previamente tratados con otras líneas. En general, existe una correlación entre la positividad del biomarcador (cuantificación de la expresión) y la eficacia. Su evaluación es preferible en muestras de biopsia mediante distintos anticuerpos validados (22C3, 28.8, SP263 y SP242), con distintos puntos de corte, aunque considerándose positivo una expresión $\geq 1\%$.

K-RAS: la activación de la vía mediada por RAS, especialmente a través de *KRAS* (oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten), ocurre en el 30% de los ADC y en el 5% de los carcinomas de células escamosas. Las mutaciones de *KRAS* en CPNM ocurren en los codones 12 y 13 y están asociadas al hábito tabáquico. Aunque numerosos estudios atribuyen un valor pronóstico negativo a la presencia de estas mutaciones, no existe aún evidencia científica concluyente. Hasta el momento, no existe un inhibidor específico como tratamiento dirigido.

Amplificación de *MET*: *MET* es el gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento hepatocitario (HGFR) situado en el cromosoma 7q21- q31. Aunque las mutaciones *MET* son raras, la amplificación se ha descrito en un porcentaje variable de pacientes con CPNM

avanzado (1-21%). Se ha identificado tanto en ADC como en carcinomas de células escamosas y es independiente de la presencia de mutaciones *KRAS* o *EGFR*. De hecho, el 20% de los pacientes con tumores *EGFR* mutados adquieren la resistencia a los ITK-EGFR a través de la amplificación de *MET*. Existen diferentes inhibidores de MET en estudio, tanto anticuerpos monoclonales como TKIs.

Mutación de HER-2: el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2) está sobre expresado en el 20% de los pacientes con CPNM avanzado, mientras que la amplificación o mutación solo ocurre en el 2% de los casos. Aparece sobre todo en mujeres, no fumadores, ADC y en la población asiática. Suelen consistir en inserciones en el exón 20 y es excluyente con mutaciones *EGFR* o *KRAS*. Se cree que las inserciones en este tipo de mutaciones favorecen una activación constitutiva del receptor y una mayor sensibilidad a TKIs duales frente a *EGFR* y *HER2*, como lapatinib o BIBW 2292, pero no a inhibidores exclusivos de *EGFR*.

Mutación de PI3KCA: son muy poco frecuentes en CPNM.

1.8.2. Métodos y técnicas de detección de biomarcadores

La detección es posible mediante biopsia, citología, así como en biopsia líquida, según la experiencia de cada centro. Los métodos y técnicas de detección evolucionan continuamente y no existe una plataforma estándar única. Las más empleadas son la inmunohistoquímica (IHQ), técnicas citogenéticas (FISH) y técnicas moleculares (PCR o NGS) (Tabla 6).

Biomarcadores y técnica de detección en CPNM		
Gen/Proteína	Alteración	Técnica
EGFR	Mutación	PCR/NGS
ALK	Reordenamiento	IHQ/FISH/NGS
ROS-1	Reordenamiento	IHQ/FISH/NGS
BRAF	Mutación	PCR/NGS
PD-L1	Sobreexpresión	IHQ

Tabla 6: Alteraciones y técnicas de detección de biomarcadores en CPNM.

▪ PCR

La secuenciación directa examina la longitud completa de un solo gen para detectar la presencia de una mutación. El tiempo para obtener el resultado no llega a la semana. Sin embargo, la sensibilidad es menor que la de otros métodos, ya que la celularidad del tumor con la mutación debe ser alta (preferiblemente >10%) en la muestra de tejido para evitar así, un falso negativo.

- Pruebas de alelos específicos de ADN

Algunos centros la utilizan para evaluar el EGFR y otras anomalías. El ADN bruto se amplifica mediante reacciones de PCR antes de emprender la búsqueda del alelo mutado, lo que permite detectar señales raras con mayor sensibilidad. Supone un salto tecnológico respecto a la secuenciación directa, ya que es una prueba multiplexada y tiende a ser más rápida (días) y más económica. Sin embargo, sólo permite identificar objetivos preespecificados, limitándose así la identificación de nuevas anomalías.

- Secuenciación NGS (ADN y ARN)

La NGS supera las deficiencias de las dos técnicas anteriores. Esta técnica basada en la automatización, el almacenamiento de datos y el procesamiento computacional, permite el análisis cuantitativo de alelos poco frecuentes y la evaluación simultánea de múltiples genes o incluso genomas completos. Conserva la sensibilidad en muestras con baja celularidad tumoral y es lo suficientemente alta como para identificar muchos reordenamientos moleculares en la sangre (ADN tumoral circulante). Además, puede detectar alteraciones genéticas intrónicas que históricamente sólo serían identificadas mediante FISH. La NGS de ARN es más sensible para detectar fusiones de genes y alteraciones del exón-14 de MET que los métodos basados en ADN.

La medicina de precisión utiliza la NGS para identificar la heterogeneidad tumoral, predecir la evolución de la enfermedad y permitir orientar líneas de tratamiento según el potencial riesgo de recidiva(7)(81). Sin embargo, entre las diversas estrategias de NGS, los paneles genéticos se distinguen por su rentabilidad y precisión(82).

- FISH

Se utiliza normalmente para detectar reordenamientos genéticos, como translocaciones, amplificaciones o deleciones, por ejemplo, reordenamientos del oncogén 1 (ROS1) ALK o c-ROS. La identificación de reordenamientos utiliza dos sondas de ADN hibridadas de diferentes colores que se separan cuando dos partes de un gen se han roto.

- IHC

Se considera una alternativa sensible y específica para detectar la alteración ALK, permitiendo obtener resultados en un día. En CPNM es el único método para evaluar la tinción de la proteína PD-L1.

1.9. EZH2

1.9.1. Concepto y función de EZH2

La regulación epigenética juega un papel importante en la aparición y desarrollo de tumores. La modificación epigenética puede regular el estado de cromatina y la expresión genética a través de vías como la metilación y desmetilación de ADN, la modificación de histonas y la remodelación de la cromatina sin cambiar la secuencia del ADN.

El EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) es una proteína metiltransferasa que forma parte del complejo PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) y juega un papel crucial en la regulación epigenética de la expresión génica. EZH2 es una enzima encargada de metilar histonas, específicamente la histona H3 en el residuo de lisina 27 (H3K27me3), lo que lleva a una represión transcripcional de los genes asociados a esa modificación. De esta forma, EZH2 participa en procesos clave como la diferenciación celular, la proliferación, la auto renovación de células madre y el control de la genómica(83).

La sobreexpresión de EZH2 ha mostrado estar relacionada con la proliferación celular y la resistencia a la muerte celular programada (apoptosis). EZH2, a través de su actividad de metilación, regula la expresión de genes supresores de tumores, promoviendo así un ambiente más favorable para la progresión del tumor y también para el desarrollo de metástasis. Al regular la expresión de genes involucrados en la migración y adherencia celular, EZH2 facilita que las células tumorales se diseminen a otros órganos. En el contexto del cáncer, EZH2 ha sido implicado en la transformación maligna, el desarrollo de metástasis y la resistencia a tratamientos(83).

EZH2 también está implicado en la inducción y regulación del fenómeno de transición epitelio-mesenquimal (EMT) en células tumorales, por el cual éstas adquieren la capacidad de atravesar las barreras endoteliales y entrar en el torrente sanguíneo para luego colonizar otros órganos. Su acción puede producirse a través de varios mecanismos: regulación negativa de genes supresores de la EMT como E-cadherina, expresión de genes mesenquimatosos como vimentina, fibronectina y N-cadherina, regulación de la vía de señalización de TGF- β o regulación de la plasticidad celular en las CTCs, entre otros. Igualmente, puede colaborar con otros factores epigenéticos y transcripcionales, como SNAIL, TWIST y ZEB1, que son transcriptores clave en la inducción de la EMT. Estos factores inducen la represión de E-cadherina y la activación de genes mesenquimatosos, favoreciendo la motilidad celular y la invasión.

1.9.2. EZH2 y su implicación en el cáncer de pulmón

En el CPNM la sobreexpresión de EZH2 se ha asociado con un peor pronóstico. Niveles elevados de EZH2 se han asociado con peores resultados clínicos y una mayor recurrencia tumoral. Además, su expresión alta asociada con la presencia de mutaciones como KRAS y BRAF, también se ha asociado a un peor pronóstico(84). Algunos estudios han mostrado que la sobreexpresión de EZH2 está vinculada con la resistencia a la quimio e inmunoterapia, por lo que la inhibición de su actividad metiltransferasa podría restaurar la expresión de genes supresores de tumores y mejorar la respuesta a estos tratamientos.

Actualmente, existen varios inhibidores de EZH2 en desarrollo, como el tazemetostat(85), que ha mostrado eficacia en algunos tipos de cáncer como el sarcoma epitelioides avanzado, aunque su aplicación en cáncer de pulmón sigue siendo objeto de investigación. Con fin terapéutico, también se ha observado que EZH2 modula el microambiente tumoral inmuno supresivo al influir en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune. Algunos estudios sugieren que la inhibición de EZH2 podría restaurar la inmunidad antitumoral, mejorando la eficacia de la inmunoterapia en CP.

A pesar de que aún se requieren más estudios clínicos, los inhibidores de EZH2 podrían convertirse en una herramienta valiosa para mejorar los resultados clínicos de los pacientes con cáncer de pulmón, ya sea al revertir la resistencia a tratamientos o al restaurar la respuesta inmune.

2. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón es la causa oncológica con mayor mortalidad a nivel mundial. El tratamiento de elección en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en estadios iniciales es la cirugía, pero incluso en estadios precoces subsidiarios de resección quirúrgica la tasa de recurrencia es alta y la supervivencia global pobre. Esto se debe principalmente a la enfermedad residual mínima y la alta heterogeneidad genética. En un intento de mejorar los resultados en estadios iniciales quirúrgicos, se han planteado diversos esquemas de quimioterapia adyuvante, siendo los beneficios también bajos (5% de supervivencia global a los 5 años) o prácticamente nulo en el estadio I. Esto nos hace pensar que existen otras causas desconocidas que favorecen este pronóstico negativo y nos plantea la necesidad de investigar nuevos factores pronósticos.

El desarrollo de la biología molecular y el avance terapéutico con terapias dirigidas en el cáncer de pulmón han impulsado la investigación de alteraciones moleculares con potencial aplicación clínica, en cuanto a predicción y pronóstico en estadios avanzados CPNM. La secuenciación molecular de siguiente generación (NGS) o secuenciación masiva permite analizar grandes cantidades de ADN y ARN, aportando gran cantidad de información sobre el perfil genético y transcriptómico del tumor y de sus componentes liberados en sangre como las células tumorales circulantes (CTCs). De forma más específica, los paneles de genes se distinguen por su mayor precisión y rentabilidad.

En estadios iniciales de CPNM el enfoque terapéutico también está cambiando gracias a los resultados favorecedores de los últimos ensayos clínicos respecto a la inmunoterapia y terapias dirigidas solas o en combinación con quimioterapia. El pronóstico de estos estadios precoces se beneficiaría si se contara con biomarcadores específicos para dianas terapéuticas. En este sentido, la detección y caracterización genética y molecular de las CTCs ayudaría a identificar a pacientes con un peor pronóstico en estadios iniciales de CPNM, permitiendo establecer la indicación de terapias dirigidas y personalizadas. La combinación de esta información junto con la información genética y molecular del tumor primario proporcionaría más datos del genotipo tumoral específico de cada paciente, anticipándonos a su posible comportamiento evolutivo y, por tanto, mejorando los resultados en términos de supervivencia.

Por ello, consideramos que la combinación de la tecnología NGS basada en un panel genético personalizado y el análisis y caracterización de células tumorales circulantes (CTCs), pueden ayudar a identificar la heterogeneidad tumoral intra e inter paciente, estratificar a los casos de CPNM de alto riesgo y guiar las decisiones de tratamiento de forma más individualizada.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general se basa en la caracterización fenotípica de células tumorales circulantes (CTCs) y el estudio mutacional del tejido en pacientes con CPNM en estadios iniciales tratados mediante cirugía como tratamiento radical.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificación de CTCs, estudio de su dinámica pre y postquirúrgica y relación con las variables clínico-patológicas.
2. Caracterización fenotípica de EZH2 en CTCs en ambas determinaciones, dinámica y relación con las variables clínico-patológicas.
3. Análisis del valor pronóstico de CTCs y CTCs-EZH2 en términos de SG y SLE.
4. Determinación del perfil mutacional del tejido mediante un panel customizado de 50 genes involucrados en distintos procesos biológicos.
5. Análisis entre la caracterización molecular tisular y las CTCs y su valor pronóstico.

4. METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO, POBLACIÓN Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

4.1.1. Diseño

Estudio observacional prospectivo de pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico por cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), en los que se analizó mediante biopsia líquida la presencia de CTCs y su caracterización fenotípica, específicamente la expresión de EZH2, tanto antes como un mes después de la intervención, así como un análisis mutacional del tejido tumoral mediante secuenciación molecular de nueva generación.

4.1.2. Población de estudio

El estudio engloba un grupo de pacientes con diagnóstico de CPNM sometidos a cirugía con intención curativa como único tratamiento en el servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves durante el periodo comprendido entre julio de 2017 y diciembre de 2019.

4.1.3. Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión establecidos para el estudio y que cumplen todos los pacientes de la cohorte se detallan a continuación:

- a) Firma del consentimiento informado por parte del paciente para la intervención quirúrgica y del consentimiento específico para la toma de muestras.
- b) Diagnóstico preoperatorio de CPNM o alta sospecha por pruebas de imagen e historia clínica del paciente. Aquellos pacientes con resultado final distinto al criterio histológico de CPNM se excluyeron del estudio.
- c) Estadío clínico según la 8ª edición TNM: I, II y IIIA con criterios de resecabilidad.
- d) Criterios de operabilidad en base a pruebas de función respiratoria, estado general del paciente y ausencia de patología previa no controlada que contraindique la cirugía.
- e) Resección pulmonar anatómica y disección ganglionar sistemática para estadios II y III, y linfadenectomía lóbulo específica para estadios I. En pacientes con pruebas de función respiratoria límites o alto riesgo quirúrgico para lobectomía se contempló la resección pulmonar segmentaria no anatómica.
- f) Ausencia de tratamiento previo (quimioterapia o radioterapia neoadyuvante).
- g) Resección quirúrgica completa. Según la *IASLC* se define resección completa como:
 - Márgenes de resección libres demostrados microscópicamente.

- Disección ganglionar sistemática en su forma más amplia, o bien disección ganglionar sistemática lóbulo específica.
- No debe haber extensión extracapsular del tumor en los ganglios resecados de manera aislada o en los localizados en el margen del tumor pulmonar.
- El ganglio mediastínico extirpado más alto debe ser negativo.

Los criterios de exclusión incluyen cualquier situación distinta a los criterios previamente indicados, así como la muerte en el periodo postoperatorio de 30 días.

4.2. VARIABLES DE ESTUDIO

4.2.1. Variables clínico-demográficas

En todos los pacientes incluidos a estudio se recogieron diferentes variables clínico-demográficas de interés, las cuales se detallan a continuación:

1. Sexo: mujer y varón.
2. Edad: años.
3. Tabaco: nunca fumador y/o exfumador o fumador activo.
4. Antecedentes patológicos:
 - a. Sin patología previa
 - b. Patología cardiológica: cardiopatía isquémica, valvulopatía, arritmia, HTA y vasculopatía periférica.
 - c. Patología respiratoria: EPOC, fibrosis pulmonar (FP) y neumopatía no FP.
 - d. Obesidad: índice de masa corporal (IMC) superior a 30.
 - e. Patología neurológica: accidente cerebrovascular.
 - f. Patología oncológica: neoplasia previa no pulmonar con un año de anterioridad o más.
5. ASA (Sociedad Americana de Anestesiología): riesgo anestésico, clasificado de la siguiente manera:
 - g. ASA I: paciente sano sin patología previa salvo la cirugía que precisa.
 - h. ASA II: paciente con enfermedad sistémica leve o moderada compensada sin limitación funcional.
 - i. ASA III: paciente con enfermedad sistémica severa que le produce limitación funcional.
 - j. ASA IV: paciente con enfermedad sistémica grave e incapacitante que amenaza su vida.
 - k. ASA V: paciente agónico, moribundo, que no se espera que sobreviva a la cirugía.
 - l. ASA VI: paciente en muerte cerebral.
6. Clínica: asintomático (hallazgo casual) o síntomas asociados como hemoptisis, tos, dolor, disnea o pérdida de peso.

4.2.2. Variables diagnóstico-terapéuticas

De la misma manera, en todos los pacientes incluidos a estudio se recogieron diferentes variables de tipo diagnóstico-terapéuticas que se detallan a continuación:

1. Lateralidad: pulmón derecho o izquierdo.
2. Localización: lóbulo donde asienta el tumor (LSD, LM, LID, LSI o LII).
3. Captación de 18F-FDG por el tumor en PET-TAC medida en unidades SUV.
4. Estadío clínico cTNM según la 8ª edición: I, II y III.
5. Valores funcionales: FEV1, DLCOcVA y VO2 máximo, en casos que precisaron test de esfuerzo.
6. EBUS preoperatorio.
7. Tipo de resección: lobectomía, neumonectomía, segmentectomía anatómica y resección segmentaria no anatómica.
8. Abordaje: cirugía video asistida (VATS) o cirugía abierta por toracotomía.
9. Estancia hospitalaria: días desde el ingreso.
10. Complicaciones postoperatorias: ninguna, fuga aérea, sangrado, empiema, tromboembolismo, insuficiencia respiratoria y otras.

4.2.3. Variables histopatológicas

Así mismo, en todos los pacientes incluidos a estudio también se recogieron variables de tipo histopatológico como las que se detallan a continuación:

1. Histología: adenocarcinoma y carcinoma escamoso.
2. Histología de adenocarcinoma: se recogen los subtipos papilares, lepidico, acinar, sólido, mixto, indiferenciado y mucinoso.
3. Grado: describe el grado de diferenciación del tumor: grado 1 (bien diferenciado), grado 2 (moderadamente diferenciado), grado 3 (pobremente diferenciado) y grado 4 (indiferenciado).
4. Tamaño máximo del tumor medido en centímetros (cm).
5. Mutaciones: presencia o no de mutaciones diana (*EGFR*, *ROS1* o *ALK*).
6. PDL-1: si presenta o no expresión.
7. Afectación ganglionar: ninguna-N0, hilar-N1, mediastínica-N2, no identificada-Nx,
8. Estadío patológico pTNM según la 8ª edición. Se ha analizado en varias categorías:

- a. pTNM completo: IA1, IA2, IA3, IIA, IIB, IIIA y IIIB.
 - b. pTNM por estadios: I, II y III.
 - c. pTNM en estadios iniciales (I y II) y localmente avanzado (III).
9. Tratamiento adyuvante: si se ha realizado o no y qué tipo (quimioterapia, radioterapia u otra).

4.2.4. Variables relacionadas con las células tumorales circulantes

En todos los pacientes se realizaron dos determinaciones de células tumorales circulantes (CTCs), una antes de la cirugía y otra en el mes postoperatorio, cuantificando su detección y su variación temporal entre ambas determinaciones. De la misma manera, se analizó su expresión fenotípica, concretamente la expresión de la proteína de superficie EZH2 en ambas determinaciones. A continuación, se detallan las variables estudiadas respecto a las CTCs.

1. **CTCs basal (CTC1):** presencia y cuantificación de CTCs antes de la cirugía.
2. **CTCs postoperatoria (CTC2):** presencia y cuantificación de CTCs un mes después de la cirugía.
3. **Cambios dinámicos de las CTCs:** ascenso, descenso o mismo número de CTCs entre ambas determinaciones.
4. **EZH2-CTC1:** expresión y nivel de expresión de EZH2 en las CTCs aisladas a nivel basal preoperatorio.
5. **EZH2-CTC2:** expresión y nivel de expresión de EZH2 en las CTCs aisladas al mes postoperatorio.

4.2.5. Variables relacionadas con las mutaciones tumorales

1. El panel de genes personalizado utilizado cubre 50 genes (exones) involucrados en cuatro procesos biológicos:
 - Proliferación tumoral: *ROS1, ALK, TP53, APC, RB1, RET, FLT1, PTEN, STK11, TET2, CTNNB1, MLH1, EGFR, DDR2, SLC22A18 y AKT1.*
 - Genes asociados con la enfermedad EPOC: *ADAMTSL3, ADAM19, PTCH1, ADGRG6, HTR4, FAM13A, CHRNA4, RIN3, TGFB2, IREB2, SERPINA1, CHRNA3, STN1, CHRNA5 y AGER.*
 - Desarrollo embriológico pulmonar: *FGF10, FOXA1, FOXA2, FOXP2, FOXP4, HOXA2, HOXA5, HOXB2, PITX2, WNT2, ALX1 y NKX2-1.*
 - Inflamación: *CD163, S100A4, NLRP3, MUC5AC, EGR1, TLR4 y FPR2.*

2. Las mutaciones de cada par de genes se clasifican como mutuamente excluyentes o simultáneas o coocurrentes.
3. Las variantes analizadas se categorizan según la relevancia (variantes conocidas o variantes no codificadas) y según el valor clínico (benignas o potencialmente benignas, patogénicas o potencialmente patogénicas y de significado incierto).

4.2.6. Variables de valor pronóstico

Durante el seguimiento de la cohorte se estudió el pronóstico de cáncer de pulmón no microcítico tratado mediante cirugía radical con intención curativa en términos de recurrencia y supervivencia, tanto global como libre de progresión.

1. **Estado del paciente:** si estaba vivo o muerto al final del seguimiento.
2. **Recurrencia:** definida como la reaparición del tumor. Diferenciamos entre recurrencia loco regional (hemitórax ipsilateral, ganglios linfáticos hiliares y mediastínicos) y recurrencia a distancia (metástasis en el pulmón contralateral o en otros órganos).
3. **Supervivencia global (SG):** porcentaje de pacientes vivos al final del periodo del seguimiento.
4. **Supervivencia libre de progresión (SLP):** porcentaje de pacientes sin evidencia de recidiva tumoral al final del periodo de seguimiento.

4.3. PROTOCOLO DE ESTUDIO

Estudio observacional prospectivo de pacientes intervenidos de CPNM (estadios I-III) entre julio de 2017 y diciembre de 2019 por el servicio de cirugía torácica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. La indicación de la cirugía se realizó en consulta de cirugía torácica tras el análisis de todos los estudios complementarios necesarios en cada paciente. En el mismo acto, se explicó el estudio en cuestión y se firmaron los consentimientos informados tanto para la intervención quirúrgica como para la obtención de muestras. En la parte de Anexos, se incluye el modelo de consentimiento informado del estudio y de la cirugía de resección pulmonar.

La cirugía consistió en una resección anatómica, principalmente lobectomía, y linfadenectomía sistemática en estadios II y III y lóbulo específico en estadios I. En pacientes con limitación funcional para una lobectomía, se realizó una resección segmentaria no anatómica y linfadenectomía. En algunos casos, bien por tamaño o localización, se realizó bilobectomía o neumonectomía. El abordaje quirúrgico incluyó la cirugía por videotoracoscopia y la toracotomía.

La biopsia líquida se realizó en todos los pacientes sometidos a cirugía mediante la extracción de 10 ml de sangre, tanto antes de la intervención (CTC1) como un mes tras la misma (CTC2) por personal de enfermería entrenado y siguiendo la misma sistemática en todos los pacientes. La determinación CTC1 se realizó en el quirófano, una vez dormido el paciente antes de iniciar el procedimiento. La muestra de tejido tumoral y peri tumoral se obtuvo una vez extirpada la pieza quirúrgica en un subgrupo de pacientes, en un medio estéril mediante una incisión directa sobre el tumor y su periferia. La determinación CTC2 se realizó aproximadamente al mes, coincidiendo con la revisión postoperatoria, antes del tratamiento adyuvante en aquellos casos que estuviera indicado. El análisis de las muestras de sangre y tejido se llevó a cabo en el centro Pfizer-Junta de Andalucía-Universidad de Granada de Genómica investigación Oncológica (Genyo).

Tras la primera revisión, con el resultado histológico y la estadificación patológica definitiva según la 8ª edición TNM, se presentó cada caso en el comité multidisciplinar de oncología torácica para determinar la actitud a seguir, si seguimiento o tratamiento adyuvante. El tratamiento adyuvante se indicó en estadios de CPNM IIb y III, según las recomendaciones de práctica clínica ESMO (European Society of Medical Oncology), basado en un doblete de platino durante 3-4 ciclos. La radioterapia se indicó en algunos casos de borde quirúrgico afecto (R1) o afectación N2, según la práctica en ese momento.

El seguimiento se realizó cada 6 meses durante los 3 primeros años, con un TAC de tórax y abdomen. En casos necesarios, se completó con un PET-TAC. Posteriormente, el seguimiento pasó a ser de forma anual. El diagnóstico de recurrencia se estableció en base a criterios radiológicos y/o PET-TAC, confirmándose histológicamente en todos los casos posibles.

El presente estudio fue aprobado por el comité ético del hospital Virgen de las Nieves y ha seguido la normativa de protección bioética del protocolo de Helsinki.

4.4. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LAS MUESTRAS

4.4.1. *Biopsia líquida: CTCs*

a) Recogida de muestras

Se recolectaron 10 ml de sangre venosa en tubos EDTA BD Vacutainer®, los cuales fueron conservados a temperatura ambiente y protegidos de la luz, con el fin de preservar la integridad de las muestras hasta su procesamiento. Las muestras fueron procesadas dentro de las 4 horas posteriores a su extracción para garantizar la calidad de los análisis. El procedimiento de transporte se realizó siguiendo las medidas de bioseguridad establecidas por el centro, a fin de minimizar riesgos biológicos. Cada tubo fue identificado con un código único alfanumérico, permitiendo asegurar la trazabilidad de las muestras y el anonimato de los pacientes incluidos en el estudio.

De forma simultánea y siguiendo estrictamente el mismo protocolo aplicado a las muestras de los pacientes, se incluyeron controles negativos utilizando sangre de donantes sanos. El propósito de estos controles fue detectar posibles resultados falsos positivos y asegurar la validez del procedimiento analítico.

b) Validación y fiabilidad del método

La técnica fue optimizada utilizando controles positivos generados a partir de muestras de sangre de voluntarios sanos, en las que se incorporaron células tumorales derivadas de líneas celulares de cáncer de pulmón. Las líneas celulares empleadas fueron HT29 y T1975, ambas obtenidas de la Colección Europea de Cultivos Celulares (European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC; Salisbury, Reino Unido). Para evaluar la sensibilidad y eficacia del método en la recuperación de células tumorales circulantes (CTCs) a partir de sangre periférica, se realizaron triplicados biológicos. Esta estrategia permitió validar la capacidad del procedimiento para detectar CTCs en condiciones controladas, garantizando así su fiabilidad para aplicaciones posteriores.

c) Enriquecimiento y aislamiento

El aislamiento de células tumorales circulantes (CTCs) se realizó mediante un procedimiento manual, siguiendo el protocolo previamente establecido por el grupo de trabajo(75), fundamentado en la expresión de citoqueratinas (CK) como marcador tumoral, tecnología MACs®.

En primer lugar, se crea un gradiente de densidad con Ficoll Histopaque®-1119 (densidad = 1.119 g/ml) (Merck, Darmstadt, Germany) mediante centrifugación a 700g durante 45 minutos y sin freno. Este medio, compuesto por polisucrosa y diatrizoato de sodio, fue seleccionado por su eficacia para separar células sanguíneas según su densidad, permitiendo un enriquecimiento eficiente de las CTCs. A diferencia de otros métodos, Histopaque-1119 ofrece una mayor reproducibilidad y no requiere pasos adicionales para la sedimentación de eritrocitos, que permite separar las células en función de sus diferentes

densidades. Así, las células mononucleares, granulocitos y otras células con la misma densidad quedan retenidas en la interfase entre el plasma y la solución de Ficoll. Posteriormente, esta fracción fue sometida a un procedimiento de marcaje con anticuerpos específicos y aislamiento por selección positiva inmuno magnética, lo que permitió la recuperación selectiva de las CTCs (Figura 16).

Para la selección positiva inmuno magnética se utiliza el sistema de trabajo Carcinoma Cell Enrichment kit® (130-108-339, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Este sistema utiliza nanopartículas super magnéticas (microesferas) unidas a anticuerpos multi citoqueratina (CK3-6H5), que reconocen las citoqueratinas citoplasmáticas 7 y 8, que no se expresan en las células hematopoyéticas maduras, pero sí en las células epiteliales tumorales. Gracias a un campo magnético, las células marcadas magnéticamente con el anticuerpo conjugado con microesferas son retenidas en una columna (selección inmuno magnética positiva), dejando pasar las células hematopoyéticas (Figura 16).

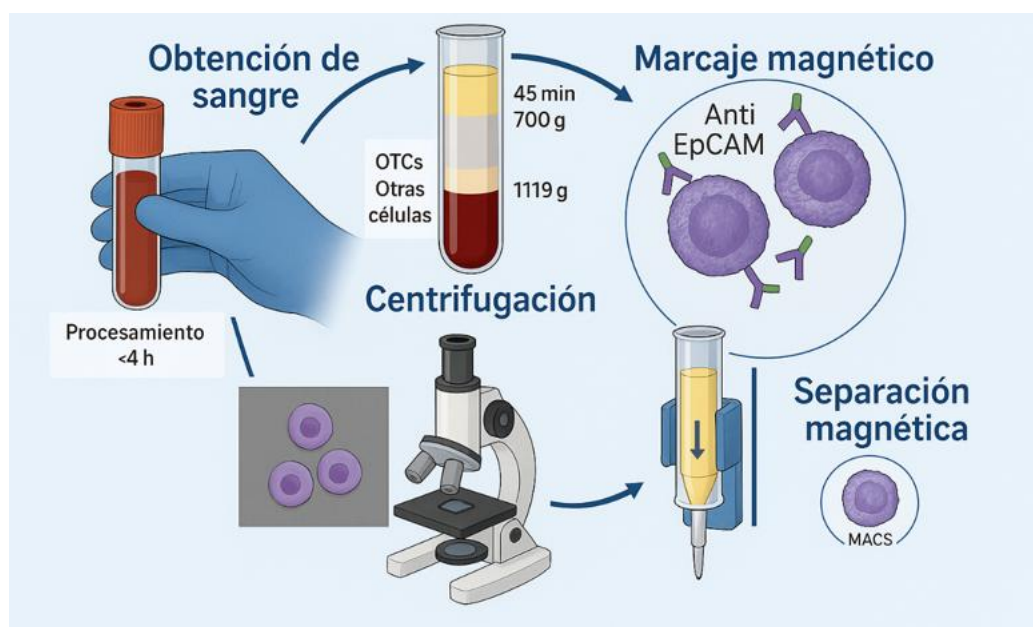


Figura 16: Proceso de enriquecimiento y aislamiento de CTCs: Separación por gradiente de densidad y aislamiento por selección positiva inmuno magnética. Imagen original generada por el autor mediante ChatGPT (OpenAI)(86).

d) Caracterización por inmunofluorescencia

La caracterización fenotípica de las células tumorales circulantes (CTCs) se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia indirecta, enfocada en la detección de citoqueratinas (CK) y de la proteína EZH2 utilizando microscopía confocal (Microscopio Láser Confocal Zeiss LSM 710) y microscopía de epifluorescencias (Microscopio Zeiss Axio Imager A.1). El área de trabajo fue delimitada con un marcador hidrofóbico (Dako) para evitar el esparcimiento de reactivos. Cada muestra fue hidratada en solución salina tamponada con fosfato (PBS 1×) durante 5 minutos, seguida de la incubación con el anticuerpo anti-citoqueratina conjugado con FITC (130-060-301, Miltenyi Biotec), dirigido contra las citoqueratinas 7 y 8. Este anticuerpo se diluyó 1:100 en PBS 1× suplementado con Tween 20 al 0.1% y albúmina sérica bovina (BSA) al 2%, que constituyó la solución de trabajo. La incubación se realizó

durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, condición que se mantuvo durante todo el procedimiento para preservar la fluorescencia.

Tras esta incubación, las muestras fueron lavadas con PBS 1× durante 5 minutos. Para minimizar la unión inespecífica, se efectuó un bloqueo con suero de cabra (dilución 1× en la solución de trabajo) durante 1 hora. La detección de la proteína EZH2 se llevó a cabo mediante incubación con un anticuerpo primario anti-EZH2 de conejo (#5246S, Cell Signaling Technology), diluido 1:100 en la misma solución de trabajo, durante 45 minutos en oscuridad. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS 1× y se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con Alexa Fluor 555 (ThermoFisher), diluido 1:200, durante 45 minutos.

La tinción nuclear se realizó con Hoechst 33342 (Fluorion) a una dilución 1×. Finalmente, las muestras se montaron utilizando SlowFade™ Diamond Antifade Mountant (S36972, ThermoFisher) y se analizaron mediante microscopía confocal en un sistema Zeiss LSM 710.

La especificidad del anticuerpo anti-EZH2 fue validada previamente en la línea celular A549 (CCL-185™, ATCC, Manassas, VA, USA), derivada de un carcinoma pulmonar de células alveolares humanas tipo II (Figura 17). Esta línea celular epitelial es ampliamente utilizada como modelo in vitro en estudios de cáncer de pulmón debido a su estabilidad fenotípica, alta expresión de marcadores tumorales y características moleculares representativas de tumores pulmonares no microcíticos. La validación previa permitió confirmar la reactividad del anticuerpo frente a EZH2 en un contexto tumoral conocido y homogéneo. Debido a la heterogeneidad observada en pacientes con CTCs, se calculó el porcentaje de expresión de EZH2 como el número de CTCs EZH2+ dividido entre el número total de CTCs. Este cálculo tuvo como objetivo cuantificar la heterogeneidad de las CTCs en los pacientes.

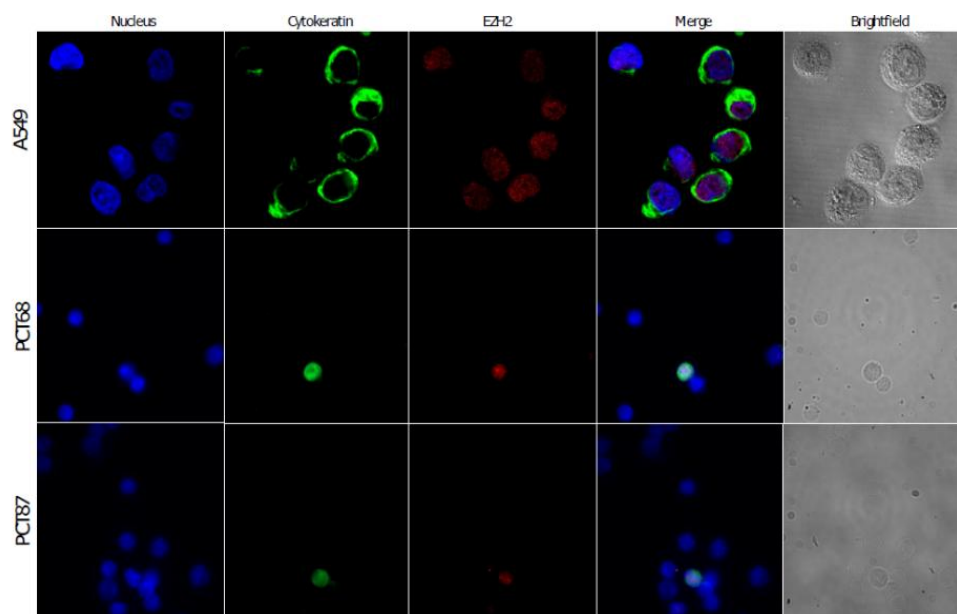


Figura 17: Caracterización EZH2 en CTCs. Línea 1: control positivo obtenido a partir de la línea celular A549, que muestra la coexpresión de citoqueratina (verde) y EZH2 (rojo), con los núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul). Líneas 2 y 3: ejemplos representativos de CTCs aisladas de pacientes con expresión positiva de citoqueratina y variabilidad en la expresión de EZH2. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 710).

4.4.2. Muestra de tejido tumoral

a) Extracción y cuantificación

Una vez extraída la pieza quirúrgica, en el mismo quirófano en un campo estéril distinto al de trabajo, se procedió a la extracción de tejido tumoral de forma directa mediante una incisión sobre el tumor, así como del tejido peri tumoral. Se evitó extraer tejido de zona necrótica para rentabilizar la muestra. Las muestras tisulares se conservaron en tubos RNA Later (AM7020, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

El ADN se extrajo utilizando el kit NucleoSpin®Tissue (740952.50, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizaron 25 mg de tejido para la extracción de ADN, previa homogeneización tisular. Posteriormente, las muestras se sometieron a un proceso de lisis, seguido de una purificación y precipitación y, finalmente, el ADN se extrajo en un volumen final de 75 µl. La concentración se midió mediante espectrofotometría utilizando el instrumento NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher) a una longitud de onda de 260 nm.

b) Preparación de librerías de secuenciación

Una librería de secuenciación consiste en una colección de fragmentos de ADN que han sido adaptados con secuencias específicas necesarias para su amplificación, hibridación y posterior lectura en plataformas de secuenciación masiva.

Las librerías de secuenciación se construyeron utilizando el flujo de trabajo KAPA HyperCap v3.0 (Roche, Basilea, Suiza), en combinación con un panel de captura personalizada diseñado para abarcar los exones de 50 genes implicados en cuatro procesos biológicos relevantes en la fisiopatología del cáncer de pulmón y comorbilidades asociadas:

- **Proliferación tumoral:** *ROS1, ALK, TP53, APC, RB1, RET, FLT1, PTEN, STK11, TET2, CTNNB1, MLH1, EGFR, DDR2, SLC22A18 y AKT1.*
- **Genes asociados con la enfermedad EPOC:** *ADAMTSL3, ADAM19, PTCH1, ADGRG6, HTR4, FAM13A, CHRN4, RIN3, TGFB2, IREB2, SERPINA1, CHRNA3, STN1, CHRNA5 y AGER.*
- **Desarrollo embriológico pulmonar:** *FGF10, FOXA1, FOXA2, FOXP2, FOXP4, HOXA2, HOXA5, HOXB2, PITX2, WNT2, ALX1 y NKX2-1.*
- **Inflamación:** *CD163, S100A4, NLRP3, MUC5AC, EGR1, TLR4 y FPR2.*

Una vez construidas las librerías individuales, se procedió a su evaluación tanto cuantitativa como cualitativa para verificar su correcta construcción conforme a las especificaciones del fabricante. La cuantificación se realizó mediante fluorometría con el Qubit 4.0 y el kit de ensayo de ADN de alta sensibilidad (HS DNA Assay Kit, ThermoFisher). La calidad de las librerías se evaluó mediante análisis con Bioanalyzer (Agilent Technologies), comprobando

la distribución adecuada de tamaños y la ausencia de artefactos como adaptadores libres o productos degradados.

Posteriormente, las librerías fueron diluidas y agrupadas de forma equimolar para asegurar una representación uniforme durante la secuenciación. Esta se llevó a cabo en la plataforma HiSeq X System (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) mediante el servicio de la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

c) Secuenciación molecular: análisis de datos

El análisis de datos derivados de la secuenciación se realizó siguiendo las mejores prácticas recomendadas por la herramienta GATK- Somatic Variant Pipeline Mutect2 (<https://www.clinbioinfospa.es/content/somatic-variant-pipeline>) a través del área de Bioinformática Clínica de la Fundación Progreso y Salud (Junta de Andalucía – Consejería de Salud y Familia).

La calidad de los datos crudos (raw data) fue evaluada con la herramienta FastQC (v0.11.9, Babraham Bioinformatics, Cambridge, Reino Unido), permitiendo comprobar la integridad y uniformidad de las lecturas. Posteriormente se alinearon las secuencias de alta calidad con el genoma de referencia humano (GRCh38) utilizando el algoritmo Burrow-Wheeler Aligner (<https://github.com/lh3/bwa>).

Para la identificación de variantes somáticas, se aplicó el algoritmo Mutect2 del paquete GATK (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>), mediante la comparación de las muestras tumorales con sus respectivas muestras peritumorales emparejadas, a través de un análisis conocido como *panel of normals*. Este enfoque permitió discriminar entre mutaciones germinales y variantes somáticas específicas del tumor.

Los archivos del llamado de variantes (VCF: Variant calling file) filtrados generados se anotaron utilizando la anotación Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) (v96, <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>), lo que permitió evaluar el impacto biológico potencial de cada variante.

La interpretación clínica de las variantes identificadas se evaluó siguiendo los criterios y directrices del American College of Medical Genetics (ACMG). El análisis estadístico, visualización de datos y representación gráfica se realizaron utilizando R (v4.2.1) y RStudio (versión 2022.12.0+353). Se empleó el paquete Maftools para la generación de gráficos tipo *oncoplot* y diagramas de interacción de mutaciones somáticas.

Todos los resultados fueron validados y revisados por investigadores especializados en bioinformática y genética molecular. Finalmente, las variantes somáticas identificadas fueron depositadas en la base de datos pública ClinVar (Accession numbers: SCV003806285–SCV003806424).

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico descriptivo de las variables recogidas en el estudio. Las variables cualitativas se resumieron utilizando frecuencias absolutas y relativas (porcentajes). Las variables numéricas paramétricas se expresaron como media con desviación estándar y las no paramétricas como mediana con rango intercuartílico.

La prueba de Shapiro Wilk se utilizó para ver si los datos de las variables clínicas se ajustaban a una distribución normal. Las características clínicas fueron evaluadas mediante la prueba Chi-cuadrado (Sexo, Procedimiento quirúrgico, Histología, Historia respiratoria, Estadio patológico-TNM, Adyuvancia, Recurrencia y Estado Vital), la prueba exacta de Fisher (Tabaco, Tipo de resección, Afectación ganglionar-N, Tipo de adyuvancia, Tipo de recurrencia y Causa de muerte). Las variables cuantitativas fueron evaluadas mediante la prueba T (Edad) y la prueba de Mann-Whitney (PET-valor SUVmax-, Tamaño del tumor, Supervivencia Global -SG- y Supervivencia Libre de Progresión -SLP-, ambos en meses).

Las CTCs se evaluaron tanto como una variable continua (número de CTC por 10 ml de sangre) como binaria (presencia y ausencia y un valor de corte de ≥ 2 CTC por 10 ml). Debido a la heterogeneidad observada en pacientes con CTCs, el porcentaje de expresión de EZH2 se calculó dividiendo el número de CTC-EZH2+ entre el número total de CTCs, y este se determinó mediante la aplicación web Cut-off Finder.

La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon comparó la mediana de los números de CTCs y la expresión de EZH2 entre los puntos de muestreo, para observar la dinámica de estas variables. La prueba univariante de Kaplan-Meier (log-rank test) se empleó para analizar la SG y SLP global de la serie y la influencia de las variables estadio y resección quirúrgica. Kaplan-Meier (log-rank test) también para analizar la influencia de CTCs y EZH2 con la SG y SLP. La prueba exacta de Fisher evaluó las interacciones somáticas entre pares de genes, mientras que las pruebas t y la prueba exacta de Fisher se utilizaron para comparar los perfiles de mutación en relación con la recurrencia y la presencia de CTC, respectivamente.

Los análisis estadísticos se realizaron con IBM SPSS Statistics (versión 25.0), GraphPad Prism (versión 9.0.2) y software R (v4.2.1) y RStudio (versión 2023.03.0 + 386), con un valor $p < 0,05$ que determina la significación estadística.

5. RESULTADOS

El estudio incluye un total de 76 pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y estadios TNM I, II y III con criterios de resecabilidad sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa. En todos los pacientes se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre para la determinación de CTCs antes y después de la intervención. En 23 de los 76 pacientes se obtuvo, además, una muestra de tejido tumoral y peri tumoral durante la intervención quirúrgica.

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Las variables de estudio se agruparon en distintos subgrupos: clínico-demográficas, diagnóstico-terapéuticas, histo-patológicas, relacionadas con las células tumorales circulantes (CTCs) y el tejido tumoral, y las relacionadas con el valor pronóstico. A continuación, se describen las variables más relevantes desde el punto de vista clínico y patológico de nuestro estudio y, posteriormente se resumen en la tabla 7.

De un total de 76 pacientes de la cohorte, el 60,5% fueron varones con una edad media de 67 años. El hábito tabáquico estaba presente en el 81,6% pero solo el 32% presentaba un diagnóstico de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

La lobectomía fue el tipo de resección pulmonar más frecuente (77,6%) con mayor prevalencia del abordaje mínimamente invasivo VATS (60%) frente a la toracotomía. El estadio patológico final según la 8ª edición TNM fue: estadio I (48,7%), estadio II (25%) y estadio III (26,3%). El 33% de la serie recibió tratamiento adyuvante con quimioterapia basada en un doblete de platino. El subtipo histológico adenocarcinoma fue el más frecuente (65,8%).

Se realizó un seguimiento durante 5 años desde la cirugía. Durante el mismo, 20 pacientes presentaron recurrencia (26,3%), siendo más frecuente la recurrencia local (65%) respecto a la recurrencia a distancia (35%). Al final del seguimiento el 29% de los pacientes habían fallecido.

Características clínico-patológicas			
Variable		N	%
Sexo	Varón	46	60,5
	Mujer	30	39,5
Edad (años)	Media	66,75 (9,29)	
Tabaco	Nunca fumador	14	18,4
	Fumador / Exfumador	62	81,6
PET (SUV)	Media	8,78 (7,22)	
Resección	Segmentaria no anatómica	5	6,6
	Segmentectomía	2	2,6
	Lobectomía	59	77,6
	Bilobectomía	6	7,9
	Neumonectomía	4	5,3
Abordaje	VATS	44	57,8
	Toracotomía	32	42,1
Histología	Adenocarcinoma	50	65,8
	Carcinoma escamoso	26	34,2
Tamaño tumoral (cm)	Media	3,8 (2,06)	
EPOC	Sí	26	34,2
	No	50	65,8
Adenopatías N	N0	54	71,1
	N1	8	10,5
	N2	10	13,1
	Nx	4	5,3
pTNM	I	37	48,7
	II	19	25
	III	20	26,3
Adyuvancia	Sí	25	32,9
	No	51	67,1
Recurrencia	Sí	20	26,3
	No	56	73,7
Tipo de recurrencia	Local	13	65
	Distancia	7	35
Estado vital	Vivo	54	71,1
	Muerto	22	28,9
Causa de la muerte	Tumoral	12	54,54
	Otras	10	45,45

Tabla 7: Resumen de las características clínico-patológicas de estudio.

Se recogieron otras variables dentro de los tres primeros subgrupos que también aportan información de interés a la cohorte de estudio. Las más relevantes, se detallan a continuación.

Desde el punto de vista **clínico-demográfico**, se analizó la presencia de antecedentes patológicos, siendo el más frecuente la patología respiratoria (27,6%), principalmente la EPOC, seguida de la patología cardiológica (19,7%). El 32% de la serie eran individuos sanos, sin antecedentes de interés. Respecto al debut clínico, la mayoría de los pacientes estaban asintomáticos en el momento del diagnóstico (60,5%).

Desde el enfoque **diagnóstico-terapéutico**, el 50% de los cánceres afectaban al hemitórax derecho y el otro 50% al hemitórax izquierdo, siendo el 25% de todos de localización más central, de los cuales el 22,5% tenía un EBUS (ecobroncoscopia) preoperatorio. El lóbulo pulmonar más frecuentemente afectado por neoplasia fue el lóbulo inferior izquierdo (26,3%), seguido del superior izquierdo (23,7%) y del superior derecho (22,4%). A excepción de un paciente, toda la cohorte disponía de un PET-TAC preoperatorio de extensión.

La estancia media hospitalaria fue de 6 días, desde el día de ingreso previo a la intervención. La complicación más frecuente fue la insuficiencia respiratoria aguda (5,3%), seguido del empiema y la fuga aérea (4%). El 83% de los pacientes no presentaron ninguna complicación médica ni quirúrgica.

A nivel **histo-patológico**, ya hemos referido el tipo histológico adenocarcinoma como el más frecuente (60,5%), seguido del carcinoma escamoso (32,9%). El subtipo de adenocarcinoma más frecuente fue el acinar (25%), seguido del tipo mixto (12%). El grado de diferenciación celular más prevalente de la serie fue el grado 2, moderadamente diferenciado (44,7%). Se analizaron mutaciones diana (*EGFR* y *ROS1*) en el 4%, siendo todos los casos en la recidiva. La expresión de PD-L1 se analizó en el 18,4% de la serie.

La media de ganglios linfáticos disecados fue de 8 no presentando la mayoría de los pacientes afectación ganglionar, es decir, eran N0 (71%). Como hemos descrito previamente, el estadio patológico pTNM más frecuente de la serie fue el I (48,7%), seguido del II (25%) y III (26,3%). El estadio I se subdividió en 4 subgrupos: IA1 (2,6%), IA2 (15,8%), IA3 (10,5%) y IB (19,7%); el estadio II en 2 subgrupos: IIA (7,9%) y IIB (17,1%); y el estadio III en otros 2: IIIA (19,7%) y IIIB (6,6%). Si reagrupamos los estadios, los estadios iniciales (I y II) suponen el 73,7% mientras que el estadio localmente avanzado (III) supone el 26,3%.

El 32,9% recibió tratamiento adyuvante tras la cirugía, siendo la quimioterapia basada en un doblete con platino el tratamiento más frecuente (84%).

5.2. RESULTADOS DEL TRATAMIENTO QUIRÚRGICO EN CPNM ESTADIOS I-III

Con una media de seguimiento de 37 meses, el 26,3% (20 pacientes) de la serie presentaron recurrencia. La recurrencia más frecuente fue de tipo local (65%) respecto a la recurrencia a distancia (35%).

Tras 5 años de seguimiento, 22 pacientes (29%) habían fallecido. La muerte fue por causa tumoral en 12 casos (54%) (Figura 18).

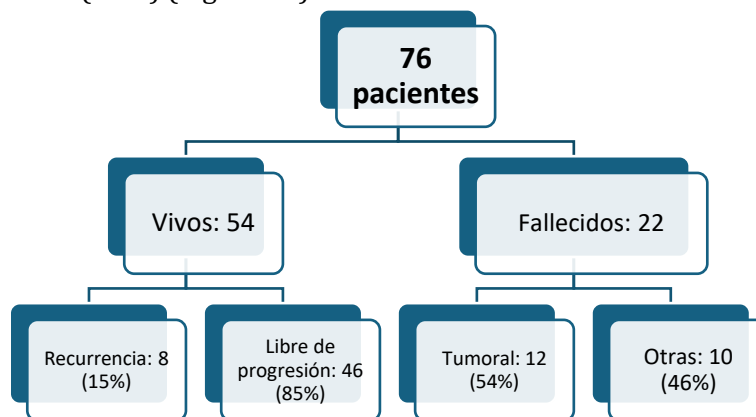


Figura 18: Estado de los pacientes al final de seguimiento.

5.2.1.

Supervivencia global

La supervivencia global (SG) de la serie a los 12 meses fue del 84.2% y a los 24 y 36 meses del 71% (Figura 19). La mediana de SG no fue alcanzada durante el período de seguimiento. La media de SG fue de 47,33 meses (IC 95% 42,36 - 52,29).

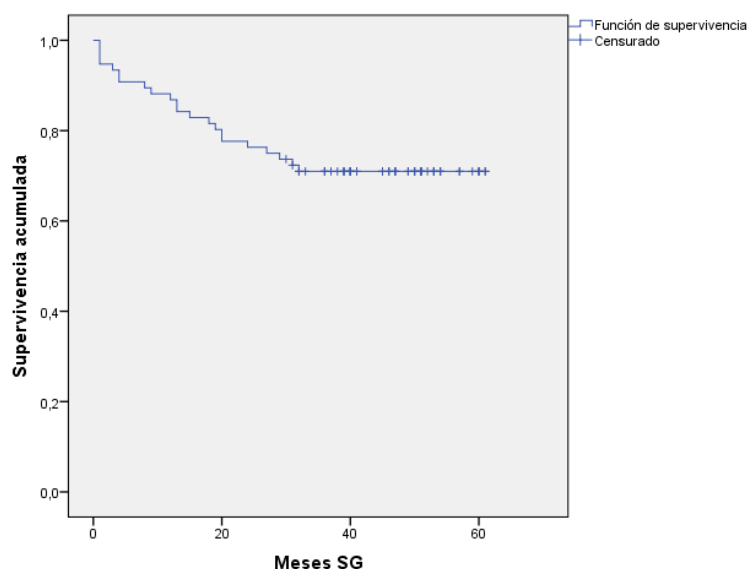


Figura 19: Curva de supervivencia global de la serie (Kaplan-Meier).

5.2.2. Supervivencia libre de progresión

La supervivencia libre de progresión (SLP) de la serie a los 12 meses fue del 90,2%, a los 24 meses del 78,6% y a los 55 meses del 67,4% (Figura 20). La mediana de SLP no fue alcanzada durante el período de seguimiento. La media de SLP fue de 47,73 meses (IC 95% 42,65 - 52,83).

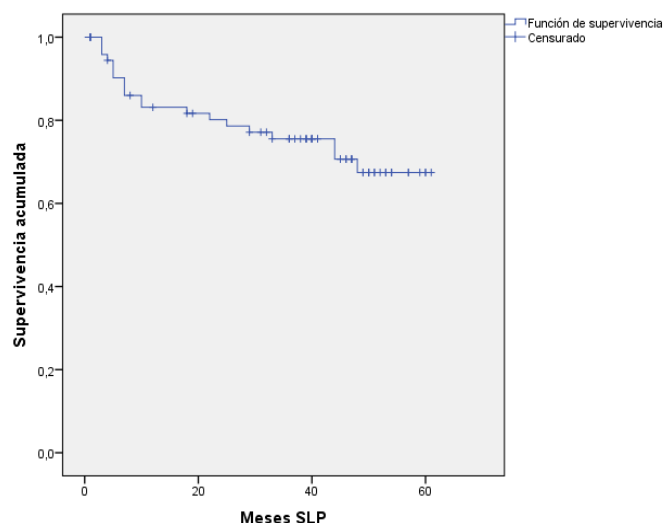


Figura 20: Curva de supervivencia libre de progresión de la serie (Kaplan-Meier).

5.2.3. Supervivencia global y libre de progresión según variables pronósticas

Se realizó un análisis univariante de la SG y SLP de la serie según variables pronósticas de distinto tipo: patológico (estadio pTNM) y terapéutico (tipo de resección quirúrgica), obteniéndose los siguientes resultados.

SG y SLP según pTNM

La media de SG para el estadio I fue 53,05 meses (IC 95% 47,64 - 58,46), para el estadio II fue de 47,68 meses (IC 95% 37,35 - 58,01) y para el estadio III de 35,95 meses (IC 95% 24,98 - 46,91). La SG según el estadio pTNM fue significativamente peor para el estadio III ($p = 0,029$).

La media de SLP para el estadio I fue de 54,24 meses (IC 95% 49,47 - 59,01), para el estadio II de 45,63 meses (IC 95% 35,20 - 56,07) y para el estadio III de 34,32 meses (IC 95% 42,65 - 52,82) (Figura 21). La SLP según el estadio pTNM fue significativamente peor para el estadio III ($p = 0,006$) (Figura 21).

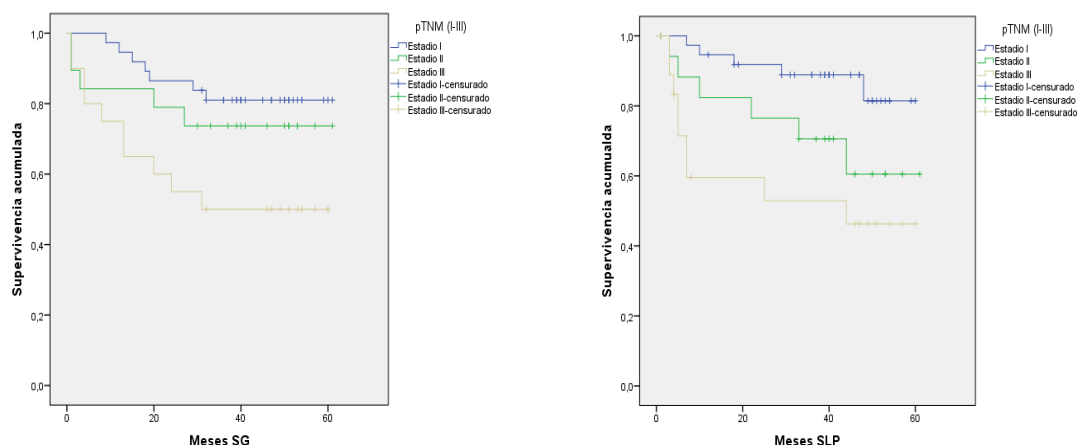


Figura 21: Curva de SG y SLP según el estadio pTNM (Kaplan-Meier), análisis univariante.

SG y SLP según el tipo de resección quirúrgica

La media de SG fue de 19,5 meses para la neumonectomía (IC 95% 0 – 40), 32 meses para la resección segmentaria no anatómica (IC 95% 19,85 – 44,34), 40 meses para la segmentectomía (IC 95% 24,75 – 55,24), 49,27 meses para la lobectomía (IC 95% 43,78 – 54,76) y 53,3 meses para la bilobectomía (IC 95% 41,40 – 65,26). La SG fue significativamente peor para la neumonectomía ($p = 0,030$), igual que para la SLP ($p = 0,006$) (Figura 22).

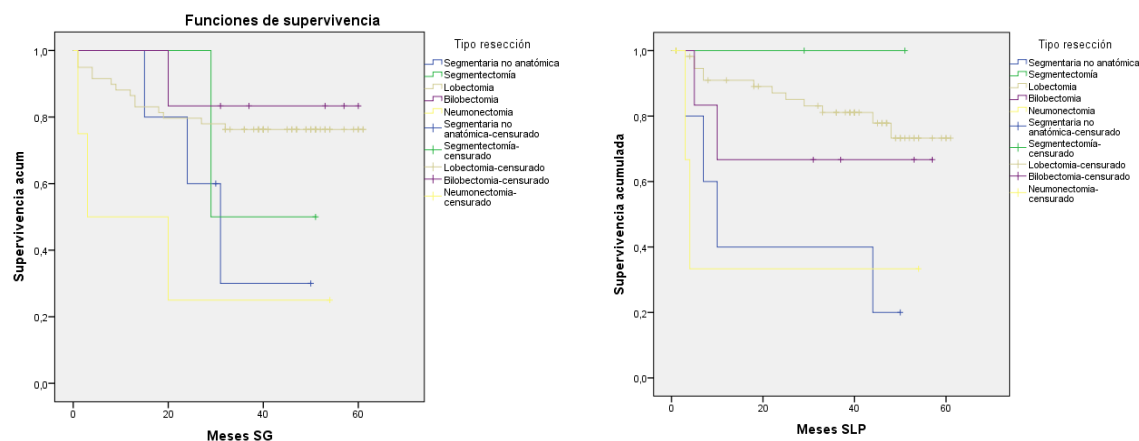


Figura 22: Curva de SG y SLP según el tipo de resección quirúrgica (Kaplan-Meier), análisis univariante.

5.3. ANÁLISIS DE LAS CTCs

5.3.1. Detección antes y después de la cirugía y dinámica

Se realizaron dos mediciones seriadas de células tumorales circulantes (CTCs) en cada paciente: una previa a la intervención quirúrgica (CTC1) y otra al mes posterior a la misma (CTC2). En la primera medición (CTC1), se detectó la presencia de CTCs en 26 pacientes (34,21%), con una mediana de 3 células (rango intercuartílico [IQR] = 3; rango total: 1–8). En la segunda medición (CTC2), la detección de CTCs se redujo significativamente, observándose solo en 3 pacientes (3,94%), con una mediana de 2 células (IQR = 3; rango: 1–4) (Tabla 8, Figura A). Se evaluaron las variaciones dinámicas en la tasa de detección y en los niveles de CTCs entre ambos puntos temporales, evidenciándose una disminución estadísticamente significativa en la carga de CTCs tras la intervención quirúrgica ($p < 0.0001$; prueba de Wilcoxon para muestras pareadas) (Tabla 8, Figura B).

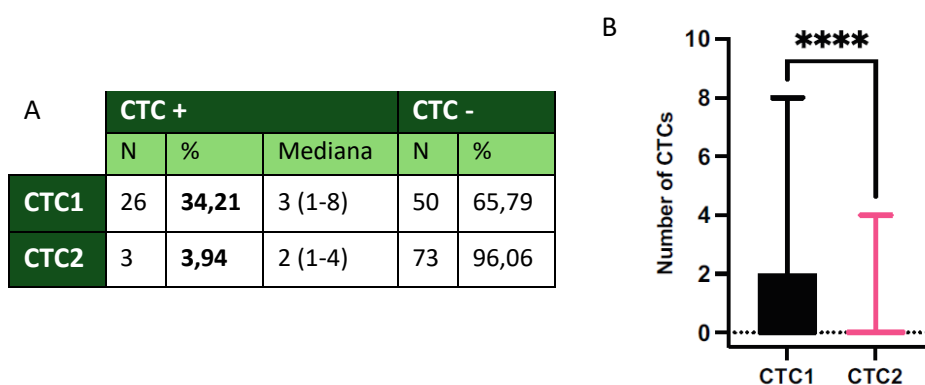


Tabla 8: A) Tasa de detección de CTCs antes (CTC1) y después de la intervención (CTC2) y media de células detectadas. B) Diferencias entre CTC1 y CTC2 ****: valor p para el test de Wilcoxon ($p = 0.0001$).

5.3.2. Caracterización de EZH2 en CTCs antes y después de la cirugía

Se realizó un análisis comparativo de la expresión del gen EZH2 en las CTCs identificadas en las dos determinaciones. En la evaluación prequirúrgica (CTC1), la expresión de EZH2 fue positiva en 13 de los 26 pacientes con CTCs detectadas (50%), con una media de expresión del 6,25% (rango intercuartílico [IQR]: 54,17%; rango: 0–100%). En la evaluación postquirúrgica (CTC2), se observó expresión positiva en 2 de los 3 pacientes con CTCs detectadas (66,67%), con una media de expresión del 100% (IQR: 100%; rango: 0–100%) (Tabla 9, Figura A).

El análisis estadístico mediante la prueba de Mann-Whitney U no evidenció diferencias estadísticamente significativas en los niveles de porcentaje de expresión de EZH2 entre ambos momentos de evaluación ($p = 0,256$), lo que sugiere una estabilidad relativa en la expresión de este marcador molecular tras la resección quirúrgica del tumor primario (Tabla 9, Figura B).

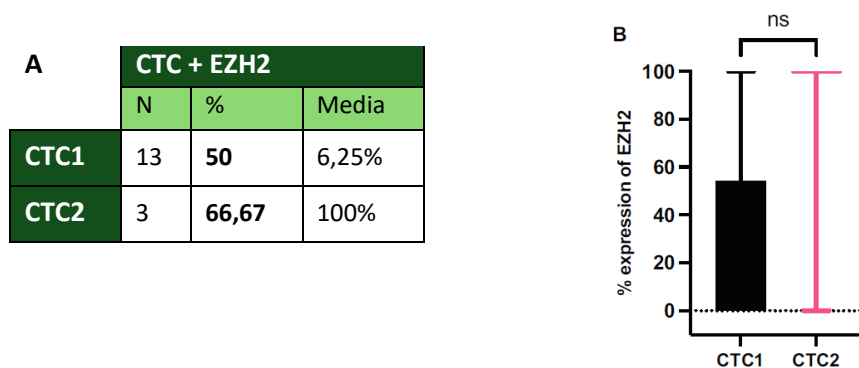


Tabla 9: A) Media de expresión de EZH2 antes (CTC1) y después de la intervención (CTC2). B) Comparativa no significativa (ns) del porcentaje de expresión de EZH2 entre CTC1 y CTC2 mediante la prueba de Mann-Whitney U, $p = 0.2562$.

5.3.3. Relación entre las variables clínico-patológicas y las CTCs

Se analizó la posible asociación entre la presencia o ausencia de células tumorales circulantes (CTCs) en ambas determinaciones (prequirúrgica y postquirúrgica) y las variables clínico-patológicas. Los resultados de este análisis se presentan de manera detallada en la Tabla 10, donde se exponen las correlaciones observadas entre el estado de las CTCs y las características clínicas y anatomopatológicas de la cohorte.

		CTC 1			CTC2		
Variables		CTC + (N=50)	CTC – (N=25)	p	CTC + (N=3)	CTC – (N=73)	p
Sexo	Varón	17 (37%)	29 (63%)	0.532	1 (2.2%)	45 (97.8%)	0.558
	Mujer	9 (30%)	21 (70%)		2 (6.7%)	28 (93.3%)	
Edad media (años)		70.50	64.80	0.003	67.00	68.00	0.779
Tabaco	Nunca fumadores	5 (35.7%)	9 (64.3%)	1	2 (14.3%)	12 (85.7%)	0.085
	Fumadores / Exfumadores	21 (33.9%)	41 (66.1%)		1 (1.6%)	61 (98.4%)	
PET (SUV) media		6.04 (3.67, 10.71)	7.69 (2.72, 11.78)	0.996	3.81 (3.19, 3.87)	7.84 (3.22, 11.83)	0.178
Resección	Sublobar	2 (40.0%)	3 (60.0%)	0.796	0 (0.0%)	5 (100.0%)	1
	Segmentectomía	0 (0.0%)	2 (100.0%)		0 (0.0%)	2 (100.0%)	
	Lobectomía	22 (37.3%)	37 (62.7%)		3 (5.1%)	56 (94.9%)	
	Bilobectomía	1 (16.7%)	5 (83.3%)		0 (0.0%)	6 (100.0%)	
	Neumonectomía	1 (25.0%)	3 (75.0%)		0 (0.0%)	4 (100%)	

5. Resultados

Abordaje	VATS	16 (36.4%)	28 (63.6%)	0.643	2 (4.5%)	42 (95.5%)	1
	Toracotomía	10 (31.2%)	22 (68.8%)		1 (3.1%)	31 (96.9%)	
Histología	Adenocarcinoma	15 (30.0%)	35 (70.0%)	0.283	2 (4.0%)	48 (96.0%)	1
	Carcinoma escamoso	11 (42.3%)	15 (57.7%)		1 (3.8%)	25 (96.2%)	
Tamaño tumoral (cm)		2.60 (2.23, 4.23)	3.50 (2.45, 5.45)	0.112	3.50 (2.75, 4.25)	3.20 (2.30, 4.70)	0.979
EPOC	Sí	11 (42.3%)	15 (57.7%)	0.283	0 (0.0%)	26 (100.0%)	0.547
	No	15 (30.0%)	35 (70.0%)		3 (5.1%)	47 (95.9%)	
Adenopatías	N0	24 (44.4%)	30 (55.6%)	0.023	3 (5.6%)	51 (94.4%)	0.736
	N1	1 (12.5%)	7 (87.5%)		0 (0.0%)	8 (100.0%)	
	N2	0 (0.0%)	10 (100.0%)		0 (0.0%)	10 (100.0%)	
	Nx	1 (25.0%)	3 (75.0%)		0 (0.0%)	4 (100.0%)	
pTNM	I	18 (48.6%)	19 (51.4%)	0.030	2 (5.4%)	35 (94.6%)	0.611
	II	5 (26.3%)	14 (73.7%)		1 (5.3%)	18 (94.7%)	
	III	3 (15.0%)	17 (85.0%)		0 (0.0%)	20 (100.0%)	
Adyuvancia	No	23 (45.1%)	28 (54.9%)	0.004	3 (5.9%)	48 (94.1%)	0.547
	Sí	3 (12.0%)	22 (88.0%)		0 (0.0%)	25 (100.0%)	
Recurrencia	No	19 (33.9%)	37 (66.1%)	0.931	3 (5.4%)	53 (94.6%)	0.562
	Sí	7 (35.0%)	13 (65.0%)		0 (0.0%)	20 (100.0%)	
Tipo recurrencia	Local	4 (30.8%)	9 (69.2%)	0.589	0 (0.0%)	13 (100.0%)	1
	Distancia	3 (42.9%)	4 (57.1%)		0 (0.0%)	7 (100.0%)	
Estado vital	Vivo	18 (33.3%)	36 (66.7%)	0.801	3 (5.6%)	51 (94.4%)	0.552
	Muerto	8 (36.4%)	14 (63.6%)		0 (0.0%)	22 (100.0%)	
Causa de la muerte	Cáncer	3 (42.8%)	4 (57.1%)	0.872	0 (0.0%)	8 (100.0%)	1
	Otra	4 (33.3%)	8 (66.7%)		0 (0.0%)	12 (100.0%)	

Tabla 10: Análisis bivalente entre la presencia o ausencia de CTCs antes (CTC1) y después (CTC2) de la cirugía con las variables clínico-patológicas.

En la determinación prequirúrgica (CTC1), se observó una asociación estadísticamente significativa entre la edad media y la presencia de CTCs, siendo mayor en el grupo CTC+ (70,5 años) en comparación con el grupo CTC- (64,8 años; $p = 0,003$). Asimismo, se encontraron diferencias significativas en función de la afectación ganglionar; la proporción de pacientes con CTCs positivas fue mayor en aquellos sin afectación ganglionar (N0), mientras que ningún paciente con estadio N2 presentó CTCs detectables ($p = 0,023$). De manera concordante se identificó una asociación significativa entre la presencia de CTCs y el estadio patológico (pTNM), siendo más frecuente en estadios tempranos (estadio I) que en estadios avanzados ($p = 0,030$). Con relación a la indicación de tratamiento adyuvante, los pacientes con CTC1 positivas y sin adenopatías recibieron con menor frecuencia tratamiento adyuvante postoperatorio en comparación con aquellos sin CTCs, pero con afectación ganglionar ($p = 0,004$).

En contraste, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de CTC1 y otras variables como el sexo, hábito tabáquico, tipo de resección quirúrgica, abordaje quirúrgico, histología tumoral, tamaño tumoral, presencia de EPOC, recurrencia tumoral, tipo de recurrencia, estado vital o causa de muerte.

5.3.4. Valor pronóstico de las CTCs en términos de SG y SLP

Con el objetivo de evaluar el valor pronóstico de las células tumorales circulantes (CTCs) en pacientes con cáncer de pulmón resecable, se realizó un análisis de supervivencia considerando tanto la supervivencia global (SG) como la supervivencia libre de progresión (SLP). Se analizó la posible influencia de distintos escenarios relacionados con la presencia de CTCs:

Presencia o ausencia de CTCs en las determinaciones pre (CTC1) y postquirúrgica (CTC2)

No se identificaron diferencias estadísticamente significativas en términos de SG ni SLP según la presencia o ausencia de CTCs en la evaluación prequirúrgica (CTC1). La mediana de SG fue de 38,5 meses (IQR: 22,0–45,0) para los pacientes con CTC1 positivas, frente a 46,5 meses (IQR: 29,25–53,0) en el grupo CTC1 negativo ($p = 0,543$) (Figura 23 superior, A). De igual modo, la mediana de SLP fue de 38,5 meses (IQR: 18,25–44,75) para CTC1 positivos y 40,0 meses (IQR: 8,5–51,0) para CTC1 negativos ($p = 0,907$), sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 23 superior, B).

En el caso de la determinación postquirúrgica (CTC2), el reducido número de pacientes con CTCs detectadas ($n = 3$) limitó la capacidad estadística del análisis. No obstante, se observó una mediana de SG de 33,0 meses (IQR: 32,5–41,5) en el grupo CTC2 positivo, frente a 40,0 meses (IQR: 27,0–51,0) en el grupo CTC2 negativo ($p = 0,3000$) (Figura 23 inferior, A). La mediana de SLP fue de 33,0 meses (IQR: 32,5–41,5) en pacientes con CTC2 positivas y 40,0 meses (IQR: 12,0–49,0) en aquellos sin CTCs postquirúrgicas ($p = 0,3220$), sin alcanzar significación estadística en ninguno de los casos (Figura 23 inferior, B).

Dada la baja frecuencia de detección de CTCs en la segunda determinación y el tamaño muestral limitado, se requieren estudios adicionales con un mayor número de pacientes y seguimiento prolongado para confirmar estos hallazgos.

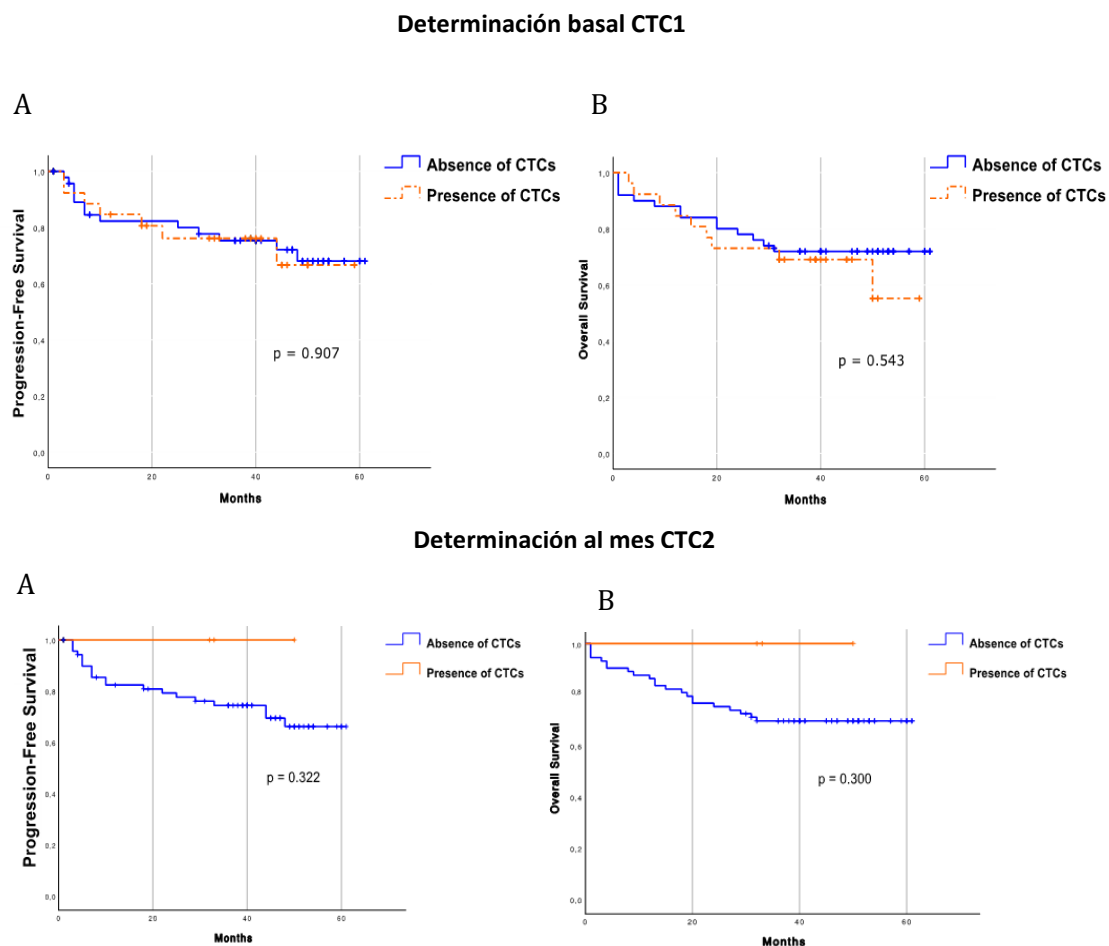


Figura 23: Kaplan-Meier de la influencia de la presencia y ausencia de CTCs en la SLP (A superior) y SG (B superior) en la primera determinación CTC1 ($p = 0.9070$ y $p = 0.5430$, respectivamente) y segunda determinación al mes postoperatorio CTC2 (A y B inferiores, respectivamente) ($p = 0.322$ y $p = 0.300$, respectivamente).
PFS: Supervivencia Libre de Progresión / OS: Supervivencia Global.
Presence: presencia / Absence: ausencia

Carga de CTCs según punto de corte (<2 vs ≥ 2 células)

Con el fin de explorar el posible valor pronóstico de la carga tumoral circulante, se estableció un punto de corte en ≥ 2 CTCs, definido a partir de la media de células detectadas en ambas determinaciones. En función de este umbral, los pacientes fueron clasificados en dos grupos: alta presencia (high) de CTCs (≥ 2 células) y baja presencia (low) de CTCs (<2 células).

Aunque no se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia hacia una mejor evolución clínica en aquellos pacientes con menos de dos CTCs en la determinación prequirúrgica (CTC1). En este subgrupo, la SLP fue superior respecto al grupo con carga elevada ($p = 0,4380$), al igual que la mediana de SG ($p = 0,1920$), sugiriendo un posible efecto protector asociado a una menor carga tumoral circulante (Figura 24 superior).

En la determinación postquirúrgica (CTC2), no se evidenciaron diferencias significativas en términos de SLP ($p = 0,4550$) ni SG ($p = 0,4010$), probablemente condicionado por el bajo número de pacientes con CTC2 detectadas (Figura 24 inferior).

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que una mayor carga de CTCs en etapas tempranas podría asociarse con un pronóstico menos favorable, aunque se requieren estudios con mayor poder estadístico para validar esta tendencia.

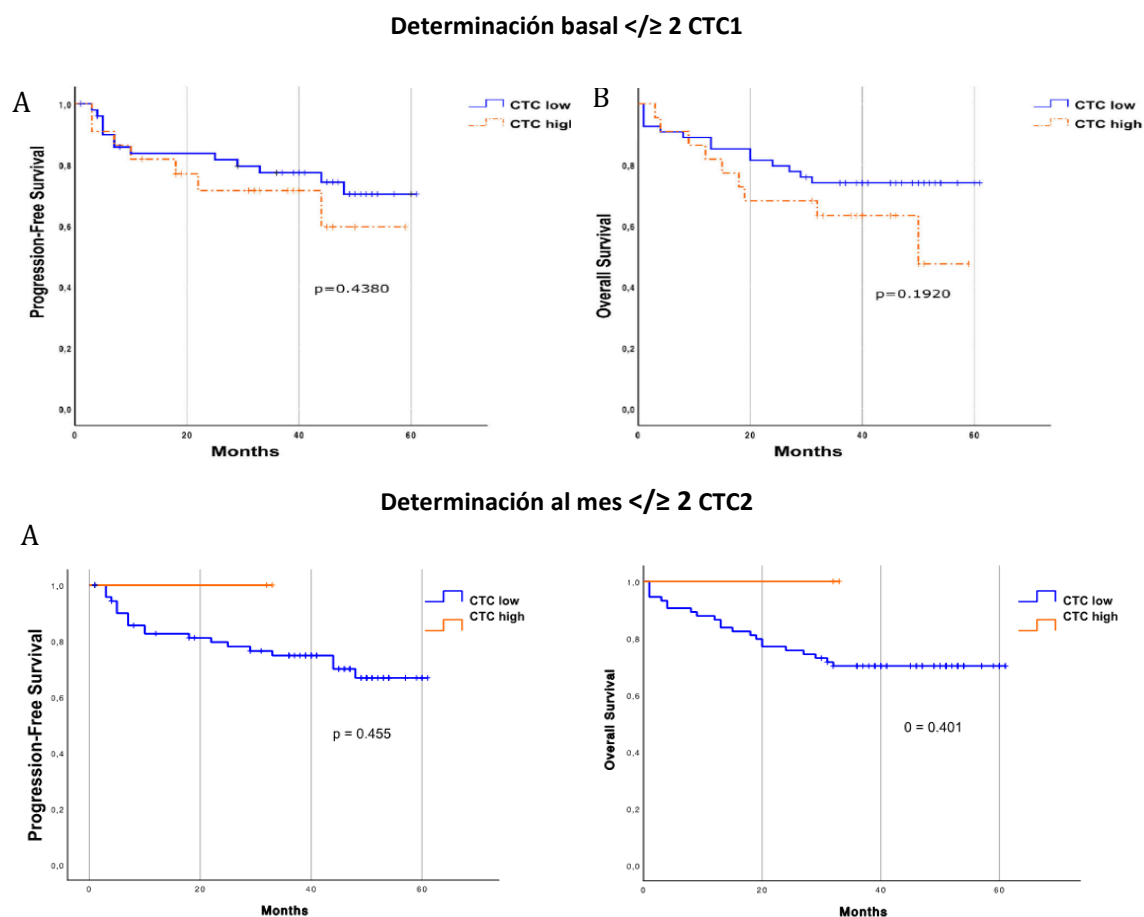


Figura 24: Kaplan-Meier de la influencia de corte $\leq/\geq 2$ en la SLP (A superior) y SG (B superior) en la primera determinación CTC1 ($p = 0.4380$ y $p = 0.1920$, respectivamente) y segunda determinación CTC2 (A y B inferiores, respectivamente) ($p = 0.4550$ y $p = 0.4010$, respectivamente)

PFS: Supervivencia Libre de Progresión / OS: Supervivencia Global.

Low: bajo / High: alto

Expresión de EZH2 en las CTCs

Se analizó la influencia pronóstica de la expresión del marcador epigenético EZH2 en las células tumorales circulantes (CTCs) detectadas en la evaluación prequirúrgica (CTC1). Para ello, se estableció un punto de corte basado en el porcentaje de expresión de EZH2, clasificando a los pacientes en dos grupos: expresión baja (<70%) y expresión alta ($\geq 70\%$), de acuerdo con valores previamente calculados.

El análisis de supervivencia evidenció una asociación estadísticamente significativa entre una alta expresión de EZH2 en CTC1 y una menor supervivencia global (SG) ($p = 0,0180$; test de Log-Rank, Mantel-Cox), lo que sugiere que la sobreexpresión de este marcador podría estar vinculada a un fenotipo más agresivo y a un peor pronóstico clínico. En contraste, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia libre de progresión (SLP) en función del nivel de expresión de EZH2 en CTC1 ($p = 0,9130$) (Figura 25).

En cuanto a la determinación postquirúrgica (CTC2), no fue posible realizar un análisis robusto del valor pronóstico de la expresión de EZH2 debido al escaso número de casos con CTCs detectadas y expresión evaluable, lo que limitó la potencia estadística del análisis.

Estos hallazgos respaldarían el potencial de EZH2 como biomarcador pronóstico, particularmente en el contexto preoperatorio, y refuerzan su posible implicación en mecanismos de progresión tumoral y resistencia terapéutica.

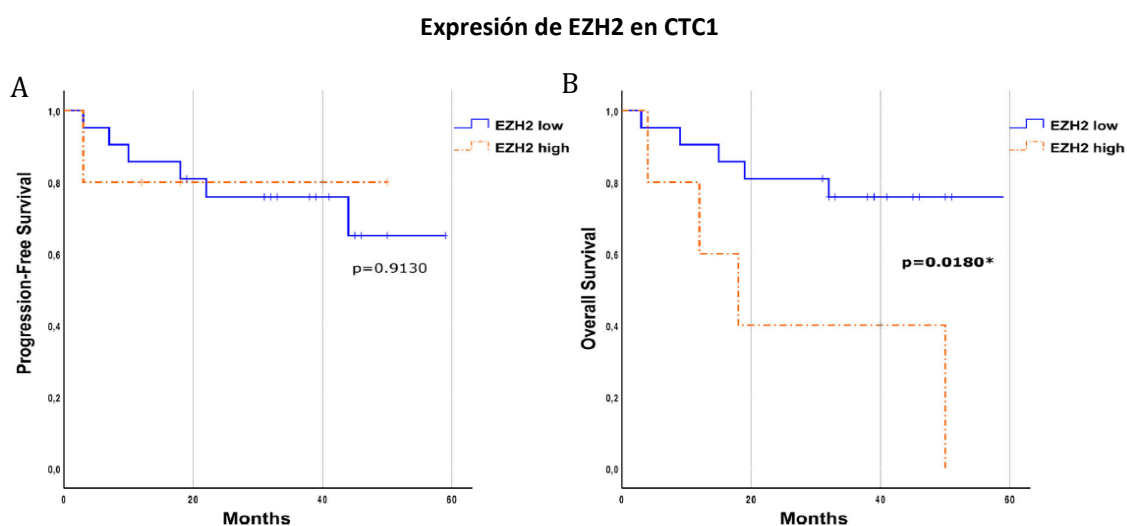


Figura 25: Kaplan-Meier de la influencia de la expresión EZH2 en la SLP (A) y SG (B) en la primera determinación CTC1 ($p = 0.9130$ y $p = 0.0180$, respectivamente).

PFS: Supervivencia Libre de Progresión / OS: Supervivencia Global

Low: bajo / High: alto

5.4. ANÁLISIS DEL TEJIDO TUMORAL

5.4.1. Librería de mutaciones en tejido tumoral y peri tumoral

Para el análisis molecular mediante secuenciación de nueva generación (NGS), se seleccionaron 23 pacientes que cumplieran con los criterios de calidad requeridos para la preparación de librerías y su posterior análisis. La concentración media de ADN genómico (gDNA) extraído del tejido tumoral fue de 316,53 ng/μl (rango: 43,85–946,85 ng/μl), siendo el mínimo necesario para la preparación de la librería de 500 ng. A pesar de ello, se logró una cobertura media de secuenciación de aproximadamente 500×, adecuada para la identificación de variantes somáticas en profundidad.

En total, se detectaron 143 variantes genéticas entre los 23 pacientes, con una media de 6 variantes por paciente (rango: 1–25). La mayoría correspondían a variantes no codificantes (61,5%) y fueron clasificadas como SNPs (del inglés Single Nucleotide Polymorphisms - polimorfismos de un solo nucleótido) (91,6%). Únicamente el 34,3% de las variantes estaban previamente descritas.

Según su significado clínico, las variantes se agruparon en 3 subgrupos (Figura 26):

- Benignas o potencialmente benignas: 9.8% (14/143)
- De significado incierto: 83.2% (119/143)
- Patogénicas o potencialmente patogénicas: 7.0% (10/143)

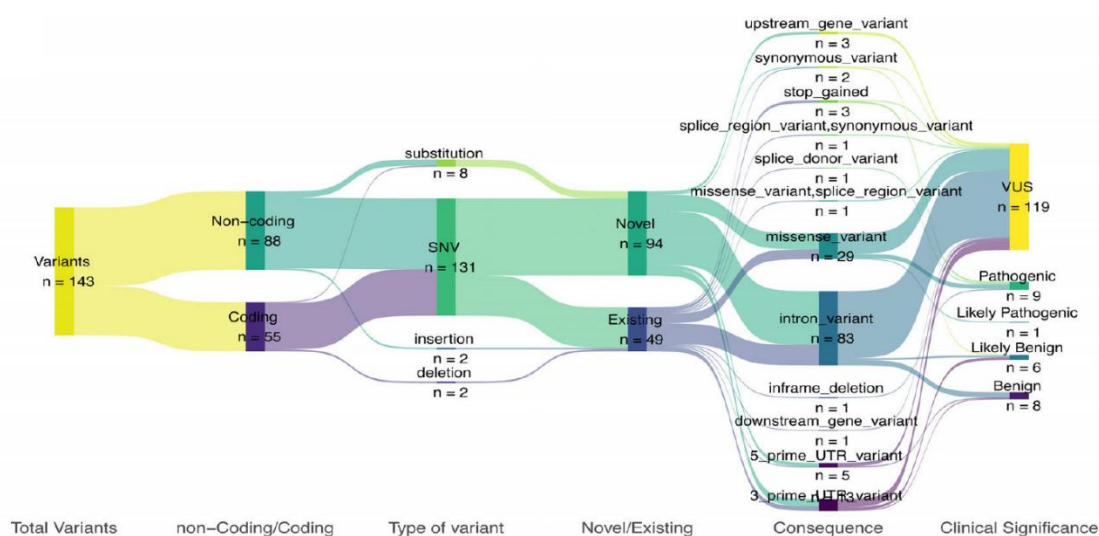


Figura 26: Esquema mutacional de todos los pacientes secuenciados (N = 23). Diagrama descriptivo (diagrama de Sankey) de todas las variantes encontradas en el tejido tumoral y sus distintos tipos.

Entre los genes más frecuentemente mutados se encontraron *TP53* (43%), *FLT1* (39%), *MUC5AC* (39%), *EGFR* (26%) y *NLRP3* (26%), todos ellos vinculados a procesos de progresión tumoral, inflamación y desarrollo pulmonar. Además, se identificaron interacciones somáticas relevantes, como la coocurrencia de mutaciones entre *CD163-TLR4*, *FGF10-FOXP2*, *ADAMTSL3-FLT1*, *ADAMTSL3-MUC5AC* y *MUC5AC-NLRP3*, mientras que *TP53* y *RIN3* presentaron un patrón de mutaciones mutuamente excluyentes, lo que podría reflejar rutas alternativas de activación oncogénica en el CPNM.

Según los resultados de nuestro estudio molecular, un total de 10 pacientes presentaron variantes de tipo patogénico, potencialmente patogénico o de significado incierto de riesgo, las cuales se analizan en detalle (Figura 28). Se observa que el gen con mayor frecuencia de mutación fue *TP53*, tanto primaria como secundaria. No existen diferencias entre el tipo de variante registrado o la frecuencia alélica respecto a las variables clínicas como el sexo, tipo histológico (adenocarcinoma o carcinoma escamoso) o antecedente de EPOC. El estadio patológico localmente avanzado (estadio III) es más frecuente en este grupo de pacientes (60 %).

En el análisis individualizado de casos (Figura 27), se observó que los pacientes PCT74 y PCT75, mujeres con subtipo histológico adenocarcinoma y estadio patológico III, desarrollaron recurrencia tumoral durante el seguimiento. Ambas pacientes presentaban mutaciones puntuales primarias en *EGFR* y *ROS1*, respectivamente, junto con mutaciones secundarias en *TP53*. Por el contrario, los pacientes PCT33 y PCT76 presentaban mutaciones primarias en *TP53* y mutaciones secundarias en *RB1*, sin evidencias de recurrencia. Aunque el tamaño muestral es limitado, estos hallazgos podrían sugerir que las mutaciones secundarias en *TP53*, cuando se combinan con mutaciones primarias en otros genes *drivers* como *EGFR* o *ROS1*, podrían estar asociadas a un mayor riesgo de recaída. No obstante, sería necesario un mayor tamaño muestral para confirmar esta observación, y explorar el impacto de otras combinaciones de mutaciones primarias y secundarias en el pronóstico clínico.

Por otro lado, al agrupar las variantes patogénicas (P) junto con las de significado incierto (VUS), se observó una mayor carga mutacional en los pacientes que experimentaron recurrencia en comparación con aquellos sin recaída (media de 11 vs. 4,8 variantes, $p = 0.0404$). En cambio, la combinación de VUS y variantes benignas no mostró diferencias significativas ($p = 0.0597$), lo cual podría reforzar el potencial de los perfiles genómicos como herramienta pronóstica en CPNM.

5. Resultados

GEN	HGVS	IDV	FA	Significado	Criterios ACMG	Paciente	Sexo	Histología	TNM	EPOC	Recurrencia	Estado	Causa
TP53	c.527G>A (p.Cys176Tyr)	rs786202962	0.192	P	PM1,PM2,PM5,PP2, PP3,PP5	PCT 68	M	SCC	I	Sí	No	Vivo	
TP53	c.584T>C (p.Ile195Thr)	rs760043106	0.15	P	PM1,PM2,PM5,PP3, PP5	PCT 80	M	ADC	I	Sí	No	Vivo	
TP53	c.469G>T (p.Val157Phe)	rs121912654	0.465	VSI	PM1,PM2,PP3	PCT 33	H	SCC	III	Sí	No	Muerto	Otra
RB1	c.1172C>G (p.Ser391*)	COSV57303024	0.374	PP	PVS1, PM2								
FAM13A	c.2465C>T (p.Pro822Leu)	rs377446507	0.174	VSI	PP3, PM2	PCT 65	H	SCC	II	No	No	Vivo	
RB1	c.380+2T>C	COSV57310513	0.006789	PP	PVS1, PM2	PCT 76	H	ADC	II	No	No	Vivo	
TP53	c.314G>T (p.Gly105Val)	rs587781504	0.079	PP	PM1,PM2,PM5,PP2, PP3, PP5								
TP53	c.818G>A (p.Arg273His)	rs28934576	0.009466	P	PS3,PS4,PM1,PM2, PM5, PP3,PP5	PCT 45	H	ADC	III	No	No	Vivo	
EGFR	c.2235 2249del (p.Glu746 Ala750del)	rs121913421	0.081	P	PS1, PM4,PM1,PM2	PCT 46	M	ADC	III	No	No	Muerto	Otra
TP53	c.622G>T (p.Asp208Tyr)	COSV52919029	0.031	PP	PM1,PM2,PP3	PCT 47	H	ADC	III	Sí	No	Vivo	
EGFR	c.2573T>G (p.Leu858Arg)	rs121434568	0.109	P	PM1, PM2, PM5, PP3,	PCT74	M	ADC	III	Sí	Sí	Muerto	Progresión
TP53	c.796G>T (p.Gly266*)	rs1057519990	0.084	P	PVS1, PM1,PM2, PP5								
ROS1	c.3388G> A (p.Gly1130Arg)	rs151330473	0.287	VSI	PM2, PP2, PP3	PCT 75	M	ADC	III	Sí	Sí	Muerto	Progresión
TP53	c.1051A>T (p.Lys351*)	COSV52944131	0.278	PP	PVS1, PM2								
	COSV52944131												

Figura 27: Análisis molecular de las variantes patogénicas, potencialmente patogénicas y de significado incierto de riesgo y las variables clínico-patológicas. HGVS: Human Genome Variation Society nomenclatura. IDV: Identificación de la Variante. FA: frecuencia alélica. Significado de variantes: P (patogénica), PP (potencialmente patogénica) y VSI (Significado Incierto).

Las mutaciones somáticas detectadas en genes específicos para cada paciente fueron representadas mediante un oncoplot, que permite visualizar de forma integrada el paisaje mutacional de la cohorte. En dicho gráfico (Figura 28), las filas corresponden a los genes evaluados y las columnas a las muestras individuales (pacientes). El gráfico superior muestra el número total de mutaciones identificadas por paciente, mientras que el gráfico lateral derecho indica el número de pacientes afectados por mutaciones en cada uno de los genes representados.

Adicionalmente, el oncoplot incorpora información clínica y molecular complementaria para cada muestra, incluyendo el estadio patológico TNM, la presencia o ausencia de células tumorales circulantes (CTCs), el nivel de expresión de EZH2 en CTCs, así como el tipo de alteraciones genómicas predominantes, diferenciadas como transiciones y transversiones (Figura 28). Esta representación gráfica permite una visión global de la heterogeneidad inter paciente y la posible correlación entre perfiles moleculares y características clínicas relevantes.

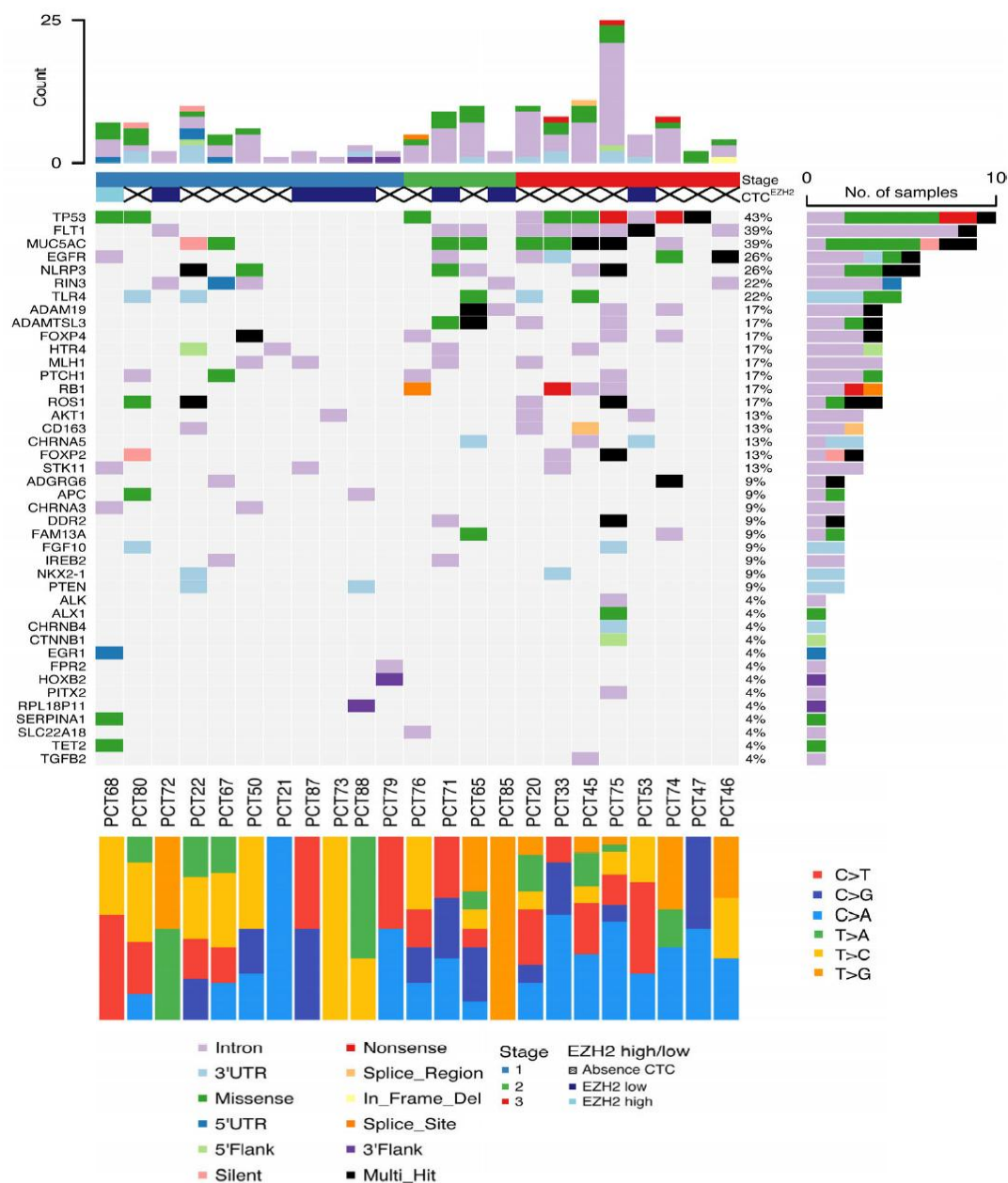


Figura 28: Oncoplot resumen del perfil mutacional a estudio. El gráfico de barras superior representa la cantidad de mutaciones de cada paciente. El gráfico de barras del lado derecho ilustra la cantidad de muestras afectadas por la mutación en el gen dado. El TNM de cada paciente también está presente debajo de los nombres de las muestras con las proporciones correspondientes de transiciones/transversiones, así como la presencia/ausencia de CTC y EZH2.

5.4.2. Análisis de eventos mutuamente excluyentes y coexistentes

Además de identificar variantes genéticas somáticas individuales mediante secuenciación de nueva generación (NGS), se realizó un análisis de interacciones genéticas para determinar si determinadas mutaciones tendían a aparecer de forma simultánea (coocurrentes) o si, por el contrario, eran mutuamente excluyentes dentro de la cohorte analizada. Este enfoque permite identificar patrones moleculares potencialmente relevantes en la biología tumoral y en la evolución clínica de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) reseccable.

El análisis reveló cinco pares de genes con mutaciones coocurrentes de significación estadística, lo cual sugiere posibles interacciones funcionales o rutas convergentes implicadas en el desarrollo tumoral. Estos pares fueron: *CD163-TLR4* ($p = 0,0056$), *FGF10-FOXP2* ($p = 0,0118$), *ADAMTSL3-FLT1* ($p = 0,0142$), *ADAMTSL3-MUC5AC* ($p = 0,0144$), y *MUC5AC-NLRP3* ($p = 0,0183$) (Figura 29). Estas combinaciones involucran genes relacionados con procesos inflamatorios, remodelado del tejido pulmonar, angiogénesis y desarrollo pulmonar temprano, destacando el papel potencial de mutaciones no tradicionales en la patogénesis del CPNM, especialmente en pacientes con enfermedad precoz y sin mutaciones clásicas en oncogenes mayores.

Por otro lado, se identificó un único par de genes con un patrón de mutaciones mutuamente excluyentes, correspondiente a *RIN3* y *TP53* ($p = 0,0457$). Esta exclusividad sugiere rutas alternativas de transformación tumoral, y plantea la hipótesis de que alteraciones en *RIN3* podrían inducir tumorigenicidad en ausencia de disfunción en *TP53*, lo cual concuerda con su implicación en procesos de remodelado citoesquelético a través de la regulación de la tirosina quinasa ABL.

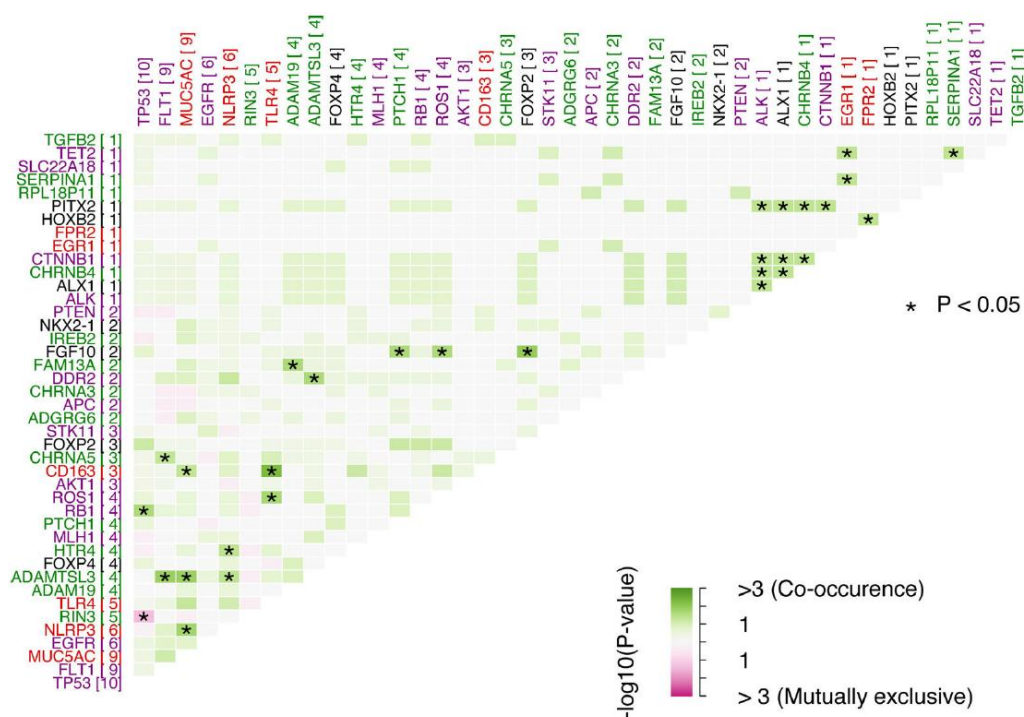


Figura 29: Interacciones somáticas entre pares de genes. El color verde indica las coexistentes y el rosa las mutuamente excluyentes. Los genes morados son genes tumorales, los rojos son genes de inflamación, los verdes son genes asociados a EPOC y los negros son genes de desarrollo pulmonar. El número entre paréntesis representa el recuento de mutaciones para un gen determinado.

*Valor $p < 0,05$ para la prueba exacta de Fisher.

Dado que la mayoría de las variantes identificadas fueron clasificadas como de significado clínico incierto (del inglés VUS – Uncertain Significant Variant), se procedió a su agrupación con variantes clínicamente relevantes (benignas y patogénicas) para evaluar su posible efecto en la recurrencia.

El grupo VUS + P mostró diferencias significativas ($p = 0.0404$) respecto a la recurrencia (Figura 30). Los pacientes que presentaron recurrencia durante el seguimiento tenían una media de 11 variantes detectadas (error estándar -SEM=5.54) a diferencia del grupo de pacientes sin recurrencia, que presentaban una media de 4.8 variantes (error estándar -SEM=0.65). Por otra parte, el grupo VUS + B no mostró diferencias significativas ($p = 0.0597$) entre los pacientes con recurrencia y los que no la presentaban (Figura 30).

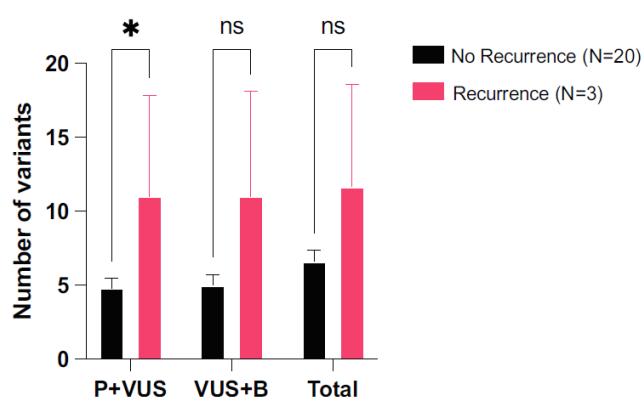


Figura 30: Diferencias en el número de variantes entre pacientes con y sin recurrencia agrupadas por significancia clínica.

P: patogénicas; B: benignas; VUS: Significado incierto

*=p-value < 0.05; NS: No Significance.

5.5. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE MUTACIONES TISULARES Y CTCs

Con el objetivo de explorar la posible correlación entre las alteraciones moleculares del tejido tumoral y la presencia de células tumorales circulantes (CTCs), se realizó un análisis integrador empleando los datos genómicos obtenidos tras la resección quirúrgica y los perfiles fenotípicos circulantes de cada paciente.

En la evaluación preoperatoria (CTC1), no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre la presencia o ausencia de CTCs y las variantes somáticas detectadas mediante NGS en el tejido tumoral. Este hallazgo sugiere que, al menos en el contexto basal, la presencia de CTCs no se asocia de manera directa con un perfil mutacional específico en la muestra tumoral resecada.

Sin embargo, al analizar la presencia de CTCs durante el seguimiento postquirúrgico (CTC2), se observó una posible relación con la variante de significado incierto (VUS) en el gen ADAM19. En concreto, dos de los tres pacientes que presentaron CTCs en la determinación postoperatoria mostraban una mutación VUS en ADAM19 y, además, ambos desarrollaron recurrencia tumoral durante el seguimiento clínico. Aunque este resultado no alcanzó significación estadística ($p = 0,1739$), sugiere una tendencia que podría ser clínicamente relevante.

En contraste, el único paciente que presentó CTCs tanto en la determinación prequirúrgica como postoperatoria, y que también portaba una variante en ADAM19, no presentó recurrencia hasta el momento del análisis. Este caso pone de manifiesto la complejidad biológica subyacente a la relación entre carga mutacional, diseminación tumoral y evolución clínica, y destaca la necesidad de estudios con mayor tamaño muestral para confirmar la posible implicación de ADAM19 como marcador de enfermedad residual mínima (MRD) o de riesgo de recaída.

6. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo(1). En los últimos años, los avances tecnológicos y el mayor acceso a técnicas diagnósticas por imagen han permitido un aumento del diagnóstico más precoz de esta patología, al igual que el desarrollo de nuevas técnicas y abordajes quirúrgicos han desafiado los límites de la resecabilidad, aumentando así el número de pacientes candidatos a cirugía. A pesar de esta mejoría diagnóstico-terapéutica, los resultados no son tan satisfactorios como nos gustaría.

El tratamiento quirúrgico radical basado en la resección pulmonar anatómica y linfadenectomía es el tratamiento de elección en pacientes con CPNM. La resecabilidad se establece por el sistema de clasificación pronóstico TNM, estando vigente la 9ª clasificación desde enero de 2025(37). Los estadios I y II se consideran quirúrgicos inicialmente. El estadio III es más heterogéneo, siendo la cirugía una opción de tratamiento en combinación con el tratamiento sistémico. La cirugía ofrece una supervivencia a los 5 años entre el 50% y 73% en el estadio IA y decae hasta el 19% y 24% para estadios IIIA. El tratamiento sistémico con quimioterapia adyuvante tras la cirugía ha mejorado levemente los resultados de pronóstico para estadios II y III(87), siendo más controvertido en estadio I.

Además del TNM, existen otros factores pronósticos propuestos como características histopatológicas del tumor (subtipo histológico, grado de diferenciación o metástasis ocultas), factores clínicos del paciente (comorbilidad, hábito tabáquico, etc.) y alteraciones moleculares asociadas al cáncer (biomarcadores, firmas genéticas, etc.). La presencia de CTCs en el CPNM ha demostrado de forma variable su influencia en el pronóstico tanto en pacientes con estadios iniciales como avanzados de la enfermedad(72)(4). El análisis mutacional del tumor es imprescindible para decidir el mejor tratamiento sistémico, principalmente en estadios avanzados(79). En estadios iniciales ya existe indicación de neoadyuvancia con quimio e inmunoterapia en pacientes con expresión de PD-L1, potenciando así la resecabilidad(49).

Sin embargo, existe una importante heterogeneidad clínica; pacientes con el mismo estadio tumoral y características clínicas (demográficas, histológicas y terapéuticas, entre otras) similares, presentan una evolución de la enfermedad divergente(88). Esta variabilidad sugiere que existen otros factores biológicos intrínsecos, como la heterogeneidad tumoral y la dinámica de subpoblaciones celulares, que podrían condicionar el pronóstico(89)(57).

El aislamiento y caracterización de CTCs como marcadores asociados al proceso metastásico ha supuesto un avance significativo en la investigación de los mecanismos de diseminación tumoral. La preservación de su integridad y viabilidad celular proporciona información valiosa sobre las características genéticas y moleculares de las CTCs(68), reflejando así diferentes aspectos biológicos (genéticos y proteicos) del tumor primario del que se originan. El estudio de modelos de CTCs in vitro, ex vivo e in vivo ofrecen información de valor para determinar las propiedades biológicas de los tumores primarios y las futuras células metastásicas, abriendo así nuevos horizontes para la investigación básica y traslacional(90).

Ante esta compleja realidad, resulta necesario la identificación de otros factores, marcadores y condiciones en un intento de mejorar el pronóstico en CPNM. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue analizar diferentes fuentes de información

biológica tumoral que pudieran aportar información de valor pronóstico; concretamente células tumorales circulantes y un perfil mutacional personalizado de 50 genes en pacientes con CPNM estadios I-III intervenidos con intención curativa. El objetivo final fue identificar aquellos pacientes con mayor riesgo de recurrencia y peor pronóstico del esperado, optimizando así las estrategias de seguimiento y tratamiento personalizado.

6.1. DESCRIPCIÓN DEL GRUPO

Las características sociodemográficas de nuestro grupo son similares a las registradas en la bibliografía previa, con una predominancia del sexo masculino (60,5%) pero con un número notable y creciente de casos en el sexo femenino (39,5%), tal cual la tendencia epidemiológica actual del CPNM(75)(76)(91).

Como ya se ha comentado, el principal factor de riesgo para el CPNM es el tabaco, incluso tras el cese del hábito(23). En nuestra serie el 81,6% de los pacientes eran o habían sido fumadores. La EPOC es un factor de riesgo independiente, que aumenta entre 2 y 5 veces el riesgo de CPNM en pacientes fumadores. En nuestro grupo, 26 pacientes tenían diagnóstico de EPOC.

El tipo histológico más frecuente fue el adenocarcinoma (65,8%), subtipo que ya ha superado al carcinoma escamoso en la actualidad(91)(92). El subtipo de adenocarcinoma más frecuente fue el acinar (25%), seguido del tipo mixto (12%).

Respecto a la cirugía, la lobectomía pulmonar y linfadenectomía sistemática fue el procedimiento más frecuente (77,6%), ya que se considera el tratamiento de elección(2). Como hemos descrito previamente, el estadio patológico pTNM más frecuente de la serie fue el I (48,7%), seguido del II (25%) y III (26,3%). Si reagrupamos los estadios, los estadios iniciales (I y II) suponen el 73,7% mientras que el estadio localmente avanzado (III) supone el 26,3%.

Se realizó un seguimiento durante 5 años en el que 20 pacientes presentaron recurrencia (26,3%), lo cual se ajusta a la tasa de recidiva en la literatura (20-35%) siendo más frecuente la recurrencia local (65%) respecto a la recurrencia a distancia (35%).

El 32,9% recibió tratamiento adyuvante tras la cirugía, siendo la quimioterapia única el tratamiento más frecuente (84%).

6.2. IDENTIFICACIÓN DE CTCs, DINÁMICA PRE Y POSTQUIRÚRGICA, RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMPLICACIÓN PRONÓSTICA.

Aunque el aislamiento de CTCs es un proceso conocido desde hace tiempo, no hay un protocolo generalizado y preestablecido en el que se indique cómo, cuándo y dónde hay que realizar la extracción sanguínea.

El calendario para la extracción de las muestras sanguíneas se decidió en base a un estudio previo del mismo grupo investigador liderado por Bayarri et al(75), también en pacientes con CPNM sometidos a cirugía. La primera determinación se realizó antes de iniciar la cirugía, y la segunda aproximadamente al mes, coincidiendo con la primera revisión postoperatoria y reduciendo así los traslados y visitas innecesarias por parte de los pacientes. Por otra parte, al espaciar esta determinación se disminuye la posibilidad de falsos positivos los primeros días postoperatorios secundarios a la propia manipulación quirúrgica.

La muestra fue de sangre periférica en todos los casos, a diferencia de otros trabajos con pacientes quirúrgicos en los que la determinación se hizo directamente de vena pulmonar como el grupo de Okumura, Crosbie o Murlidhar et al. Todos detectaron un mayor número de CTCs en sangre de vena pulmonar respecto a sangre periférica, lo cual tiene sentido ya que es el punto de drenaje de la sangre pulmonar antes de su paso sistémico, por lo que las células liberadas del tumor se concentrarán en mayor cantidad en este vaso sanguíneo. No obstante, la relación con el pronóstico fue dispar; mientras que Crosbie(93) y Murlidhar(94) sí relacionaron la detección de CTCs en vena pulmonar con un peor pronóstico, Okumura no pudo demostrar dicha relación(95). Aunque la detección de CTCs en vena pulmonar es mayor y sería más rentable, el procedimiento es más complejo y puede asociar riesgos quirúrgicos añadidos, además de no ser igualmente comparativo a la tasa de detección postoperatoria. Tampoco se ha demostrado su asociación significativa con el pronóstico.

Respecto al sistema de detección de CTCs, existen varias tecnologías según el método de aislamiento empleado, cuya eficacia varía, afectando directamente a los resultados obtenidos en los distintos estudios publicados. En 2011, Hoffman et al. realizaron un estudio comparativo entre dos sistemas de detección, CellSearch® e ISET®, obteniendo una tasa de detección del 39% mediante CellSearch® frente al 50% alcanzado con ISET® en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPNM) (15). A pesar de la diferencia, en ambos casos la detección de CTCs se relacionó con una peor supervivencia libre de enfermedad (SLE). Esta diferencia fue incluso más acusada en el estudio de Krebs, aunque éste se basó en estadios avanzados de CPNM(96). En la actualidad, CellSearch® es el único método aceptado por la FDA para la detección de CTCs en cáncer de mama, próstata y colorrectal en estadios avanzados. Su método clásico ofrece alta sensibilidad y especificidad para CTCs que expresan marcadores epiteliales como EpCAM y las citoqueratinas 8, 18 y 19. Sin embargo, esta tecnología inicialmente presentaba la limitación de no poder detectar células tumorales que hubieran adquirido un fenotipo mesenquimal, fenómeno asociado a la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y a un mayor potencial metastásico; además, también detecta CTCs que no son viables, siendo otro factor limitante. No obstante, para superar esta limitación, se desarrolló el CellSearch® EMT Kit, capaz de identificar CTCs que

expresan marcadores mesenquimales como vimentina y N-cadherina. A pesar de su utilidad en el ámbito de investigación, este kit aún no ha sido aprobado por la FDA para su uso clínico rutinario. Por otro lado, métodos alternativos basados en microfluídica y filtrado físico no dependen de la expresión de marcadores específicos, permitiendo el aislamiento de un mayor número de CTCs viables, incluyendo aquellas que han sufrido cambios fenotípicos. No obstante, el aislamiento de CTCs sigue representando un desafío, consecuencia de su gran heterogeneidad fenotípica y de su baja representación en sangre respecto al resto de células sanguíneas.

El método utilizado para el aislamiento de CTCs disponible en nuestro laboratorio fue el sistema MACS® (Magnetic Activated Cell Sorting) de Miltenyi Biotec, basado en la tecnología de separación inmuno magnética mediante el empleo de anticuerpos marcados dirigidos contra proteínas de superficie y citoqueratinas. Aunque permite la separación celular de CTCs, carece de una tecnología especializada y automatizada como CellSearch®, siendo la sensibilidad y especificidad menores, especialmente en muestras con pocas CTCs. Tecnologías como Isoflux®, basado en la detección y análisis de CTCs mediante un sistema de micro fluidos en función de su tamaño y deformabilidad, presenta mayor tasa de detección. Esta rentabilidad de detección aumenta cuando se combina con otras tecnologías como AdnaTest® y ImageStream®.

En nuestro estudio hemos analizado la presencia de CTCs antes y un mes después de la intervención. Antes de la cirugía, se aislaron CTCs en 26 pacientes (34%), con una media de 3 células por 10 ml, mientras que al mes postoperatorio solo se detectaron en 3 pacientes (3.9%) con una media de 2 células por 10 ml. Revisando la literatura, la detección de CTCs perioperatoria es variable y nuestra tasa de detección preoperatoria se asemeja a otros estudios. Yoon et al. en un estudio de 79 pacientes quirúrgicos con estadios I-III utilizando técnicas de PCR-RT, obtuvo una tasa de detección preoperatoria del 34% y postoperatoria del 37.5%(97). Crosbie et al., en un estudio con 30 pacientes y solo preoperatoriamente, detectó CTCs en el 22% de pacientes en sangre periférica y aumentó la tasa de detección al 43% en vena pulmonar mediante tecnología CellSearch®(93). Sawabata et al. utilizó el sistema ScreenCell® basado en la selección por tamaño en un estudio con 23 pacientes, obteniendo una tasa de detección preoperatoria del 30,4%; la tasa de detección postoperatoria fue inmediatamente después y a las 6 horas y muy variable(98). Bayarri et al. utilizando el mismo método de detección MACS, obtuvo una tasa de detección preoperatoria del 39% y postoperatoria del 27,5%(75). En comparación con los estudios anteriores, nuestra tasa de detección postoperatoria es notablemente inferior. No obstante, es importante señalar la heterogeneidad en el diseño de los estudios previos en relación con el momento de la segunda extracción sanguínea tras la cirugía. Esta variabilidad metodológica, junto con la conocida heterogeneidad biológica de las CTCs en cáncer de pulmón, mayor que en otros tumores epiteliales, así como la escasa disponibilidad de marcadores actuales de detección, podrían justificar en parte las diferencias observadas. Estos resultados refuerzan la necesidad de desarrollar métodos de detección más sensibles y específicos para las CTCs en cáncer de pulmón, así como de establecer protocolos estandarizados para la monitorización perioperatoria, que permitan una comparación más homogénea entre estudios y optimicen la identificación de pacientes en riesgo de recurrencia.

Respecto a la dinámica antes y después de la cirugía, se ha observado un descenso significativo entre ambas determinaciones ($p < 0.0001$, Wilcoxon test), siendo comparable al resto de estudios anteriores(97). Esta dinámica descendiente estaría justificada por la resección quirúrgica que elimina el tumor y, por tanto, la carga tumoral macroscópica.

La negativización de CTCs postoperatoria podría asociarse positivamente al pronóstico, mientras que la persistencia implicaría persistencia de enfermedad (enfermedad mínima residual) a pesar de la cirugía. Este hecho es de gran interés en el seguimiento de pacientes y podría ser un marcador predictivo de recidiva anticipándose a otros métodos diagnósticos por imagen. No obstante, también se conoce que las CTCs sufren cambios fenotípicos llamados fenómeno de transición-epitelio-mesenquimal (*EMT-Epithelial to Mesenchymal Transition*), por el que cambian algunas de sus propiedades inmuno-histoquímicas y morfológicas para pasar al torrente sanguíneo, evolucionando de una forma epitelial a una mesenquimal más agresiva(63). Por el mismo proceso a la inversa (*MET- Mesenchymal to Epithelial Transition*), son capaces de pasar de la sangre a cualquier órgano, donde se depositan y pueden formar metástasis. Este fenómeno limita su detección, al perder biomarcadores de superficie específicos, pudiendo generar falsos negativos.

Analizando la relación con las variables clínico-patológicas, observamos una asociación significativa entre la ausencia de CTCs preoperatorias y la afectación ganglionar (pN1-2), el estadio patológico (pTNM II-III) y, por ende, con la necesidad de adyuvancia postoperatoria. Sin embargo, un porcentaje de estos casos más avanzados son los que presentan recurrencia. Es por ello por lo que consideramos importante la caracterización fenotípica de las CTCs, para aumentar la rentabilidad de detección. Miguel et al., demostraron que la detección de CTCs con expresión de AXL y activación EMT, se relacionó con peor SLP y SG(76). Wan et al. intentaron caracterizar la expresión génica de las CTCs descubriendo que los genes NOTCH1, IGF2, EGFR y PTCH1 mutan en más de la mitad de estas células(99).

No observamos una asociación significativa entre la presencia o ausencia de CTC preoperatorias ni postoperatorias en términos de SLP y SG. Tampoco al establecer un punto de corte ≥ 2 aunque sí una tendencia a un mejor pronóstico en pacientes con menos de dos CTCs en la primera determinación (CTC1).

6.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE EZH2 EN CTCs, DINÁMICA PRE Y POSTQUIRÚRGICA, RELACIÓN CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E IMPLICACIÓN PRONÓSTICA.

A pesar de la reducida muestra de nuestro estudio, hemos observado una peor SG en aquellos pacientes con CTCs preoperatorias que expresaban EZH2 ($p = 0.0180$). La expresión de EZH2 alta ($\geq 70\%$) preoperatoria se asoció a mayor riesgo de muerte. Estos resultados son consistentes con otros estudios que asocian la expresión de la proteína EZH2 en el cáncer de mama con recurrencia metastásica y peores cifras de supervivencia libre de progresión (SLP)(100), así como en cáncer de pulmón(101). En cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), se ha demostrado que EZH2 promueve la progresión tumoral mediante la inducción del fenómeno de transición epitelio-mesenquimal (EMT). Se ha observado que un aumento en la expresión de EZH2 se correlaciona con características mesenquimales, contribuyendo así a un fenotipo más agresivo y una mayor capacidad metastásica. Además, se ha descrito que la proteína NOP2 estabiliza el ARNm de EZH2 en el adenocarcinoma pulmonar (LUAD), facilitando la EMT y promoviendo la progresión tumoral. La inhibición de NOP2 resulta en una disminución de la expresión de EZH2, así como de la invasión y metástasis en modelos preclínicos(102). Por otra parte, Duan J et al. demostraron que el microARN miR-4448 inhibe la expresión de EZH2 en el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM), lo que resulta en la supresión de la EMT y de la tumorigenicidad, a través de la modulación de la vía Girdin/Akt/AMPK(103).

La expresión de EZH2 podría reflejar mayor agresividad en subpoblaciones celulares desprendidas del tumor primario, considerándose un marcador de mal pronóstico. Debido al papel esencial y heterogéneo de EZH2 en la regulación de varios conjuntos de genes en el cáncer, han surgido ensayos clínicos para probar inhibidores contra esta diana(104). Estos resultados demuestran una vez más, la necesidad de caracterizar CTCs.

6.4. PERFIL MUTACIONAL TISULAR, PANEL DE GENES E IMPLICACIÓN PRONÓSTICA.

El análisis molecular realizado mediante secuenciación de nueva generación (NGS) en nuestra cohorte ha permitido identificar variantes patogénicas, potencialmente patogénicas o de riesgo incierto en un 10 de los 23 pacientes.

Entre todas las alteraciones genéticas, la mutación en TP53 fue la más frecuente, tanto a nivel primario como secundario, observándose principalmente en estadios patológicos localmente avanzados (estadio III) (60%). Aunque no se identificaron diferencias en la frecuencia alélica ni en el tipo de mutación respecto a otras variables clínico-patológicas, la alta prevalencia de mutaciones en TP53 subraya su papel en la evolución del cáncer de pulmón, como ya ha sido ampliamente reportado en la literatura.

Un hallazgo relevante de nuestro estudio es la relación entre las mutaciones en RIN3 y TP53, siendo mutaciones mutuamente excluyentes en los casos analizados. Este hecho sugiere que alteraciones en RIN3 podrían favorecer el desarrollo tumoral de manera independiente a la vía clásica mediada por la disfunción de TP53. RIN3, implicado en la remodelación del citoesqueleto a través de la regulación de la tirosina quinasa ABL, podría facilitar procesos clave para la migración e invasión celular(105). Este dato podría ser de especial interés en pacientes con EPOC, donde la presencia de variantes en RIN3 podría representar un biomarcador de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón.

Asimismo, observamos la coexistencia de variantes en ADAMTSL3 y FLT-1, genes asociados con procesos de remodelación tisular, angiogénesis y progresión tumoral, tanto en el contexto de EPOC como en el cáncer de pulmón. La baja expresión de ADAMTSL3 y la activación de FLT-1(106) se han relacionado previamente con un peor pronóstico, indicando que estas alteraciones podrían estar implicadas en fenómenos de enfermedad mínima residual (MRD) y en la predisposición a la recurrencia.

Otro aspecto destacable es la detección de mutaciones en NLRP3 y MUC5AC, genes asociados a inflamación crónica y producción de mucinas, respectivamente. Como sabemos, el adenocarcinoma de pulmón es el subtipo histológico más frecuente de CPNM, siendo los principales impulsores oncogénicos EGFR y K-RAS. Las formas que expresan K-RAS contienen niveles más altos de mucina, lo cual se asocia a un peor pronóstico. Alison K. Bauer et al., propusieron que MUC5AC/Muc5ac, un gen de mucina que se expresa en el adenocarcinoma pulmonar, se relacionaba con peor pronóstico en tumores con expresión de K-RAS(107). En modelos preclínicos, la eliminación de MUC5AC redujo significativamente la progresión tumoral, lo que sugiere su potencial como futura diana terapéutica.

Pese al tamaño limitado de nuestra cohorte, nuestros datos sugieren que el análisis de variantes tisulares podría ofrecer una mayor capacidad de predicción de recurrencia que la monitorización basada exclusivamente en CTCs. La presencia de mutaciones de significado patológico o potencialmente patológico fue más frecuente en los pacientes que desarrollaron recurrencia, resaltando la necesidad de ampliar el estudio de genes poco caracterizados para una mejor estratificación pronóstica. De hecho, las variantes en genes

menos estudiados del panel customizado podrían, con el tiempo y el avance de la evidencia científica, ser reclasificadas como variantes patogénicas, fortaleciendo su valor clínico.

En conjunto, nuestros resultados refuerzan la importancia de integrar el análisis molecular profundo en la evaluación de pacientes intervenidos por CPNM, no solo para identificar factores de riesgo de recurrencia, sino también para abrir nuevas vías de investigación y desarrollo de terapias dirigidas en subgrupos de alto riesgo.

7. CONCLUSIONES

7.1. CONCLUSIONES RESPECTO A LAS CTCs.

1. La detección y cuantificación de CTCs es posible en estadios iniciales de cáncer de pulmón no microcítico, tanto antes como después del tratamiento quirúrgico, así como el análisis de su comportamiento dinámico.
2. La caracterización fenotípica de la proteína EZH2 en CTCs es factible y podría aportar información pronóstica adicional.
3. Tras la cirugía se produjo un descenso en la carga de CTCs de los pacientes intervenidos al mes postoperatorio, alcanzando este descenso significación estadística.
4. Respecto a las variables clínico-patológicas, se observó que la presencia de CTCs antes de la cirugía (CTC1) se relacionó de forma significativa con una edad más avanzada, con la ausencia de afectación ganglionar y con un estadio TNM más precoz. Sin embargo, no mostró relación con otras variables de interés como la recurrencia, el tamaño tumoral, el tipo histológico o el tipo de resección quirúrgica. Tampoco se observaron diferencias entre las variables clínico-patológicas y la presencia de CTCs en la segunda determinación.
5. La presencia de CTCs antes y después de la cirugía no se asoció de forma significativa con el pronóstico. Se observó que la mediana de SG y SLP fue mayor para pacientes que no presentaban CTCs antes de la cirugía, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. De forma similar ocurre con la segunda determinación postoperatoria, aunque su análisis se vio limitado por el número de pacientes.
6. Los niveles de expresión de EZH2 en las CTCs tras la cirugía se mantuvieron relativamente estables respecto a la determinación preoperatoria, sin observarse diferencias significativas.
7. Niveles elevados de expresión de EZH2 (punto de corte $\geq 70\%$) en la determinación preoperatoria (CTC1) se asociaron a una peor SG. Para la SLP no hubo significación estadística. Tampoco hubo significación para CTC2, limitado probablemente por el escaso número de pacientes.

7.2. CONCLUSIONES RESPECTO AL TEJIDO TUMORAL

1. El análisis mutacional mostró que el gen más frecuentemente mutado fue el *TP53*, sin observarse relación con las variables clínico-patológicas.
2. Las variantes de significado incierto (VUS) fueron las más frecuentes. Su agrupación con las variantes de significado patogénico se asoció a mayor carga mutacional en los pacientes que presentaron recurrencia, mostrando este hallazgo significación estadística.
3. En el análisis de interacciones genéticas, se observaron 5 mutaciones coocurrentes con significación estadística: *CD163-TLR4*, *FGF10-FOXP2*, *ADAMTSL3-FLT1*, *ADAMTSL3-MUC5AC* y *MUC5AC-NLRP3*, así como una excluyente: *RIN3-TP53*. Estas interacciones sugieren posibles rutas convergentes implicadas en el desarrollo tumoral, así como rutas alternativas de transformación tumoral, respectivamente.
4. Al analizar la relación entre las CTCs antes y después de la cirugía con las variantes somáticas detectadas en el tejido tumoral mediante NGS no se observó ninguna relación significativa.

A modo de conclusión, nuestro estudio propone que la combinación de la biopsia líquida y el análisis molecular del tejido tumoral podría aportar información complementaria y más representativa de la heterogeneidad tumoral. Esto podría contribuir a la identificación de pacientes con CPNM en estadios iniciales con peor pronóstico, a los que se les podría ofrecer un tratamiento alternativo. Para ello, un estudio más extenso con una población más amplia permitiría confirmar estos hallazgos.

8. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las limitaciones más importantes que encontramos en nuestro estudio fueron las siguientes:

- El número de pacientes con muestra de tejido tumoral es reducido respecto a la muestra de pacientes con biopsia líquida. Por motivos en la disponibilidad de la biopsia tumoral, se obtuvo tejido en 27 pacientes para NGS. Finalmente, hubo 4 muestras de tejido tumoral que no pasaron los filtros de selección de variantes y fueron eliminados del análisis posterior, por lo que la muestra final para estudio tisular resultó en 23 pacientes.
- La técnica usada para el aislamiento de CTCs (MACs®) se basa en la expresión de marcadores epiteliales en las CTCs, por lo que si se producen cambios fenotípicos de transición epitelio-mesenquimal (EMT), podrían no detectarse dicha subpoblación de CTCs, suponiendo posibles falsos negativos. Además, el no estar automatizado como ocurre con tecnologías como IsoFlux® o CellSearch® e ImageStream®, la rentabilidad puede verse limitada.
- Se trata de un estudio con un periodo de seguimiento prolongado, con posibles pérdidas durante el mismo que pueden dar lugar a sesgos de selección. El diseño del estudio se realizó para evitar visitas, exploraciones o técnicas adicionales y minimizar así las posibles pérdidas en el seguimiento. Así mismo, en el cuestionario inicial se recogieron datos de filiación que permitieran contactar con el paciente.

***** Financiación:** Este trabajo fue financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía y GlaxoSmithKline España (GSK España) (número de subvención: PIP-0192-2020).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–63.
2. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* [Internet]. 2017;28(Supplement 4):iv1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdx222>
3. C A, Tomohiro, Carlo V di, Harewood R, Matz M, Bonaventura A. Concord-3. *Lancet.* 2018;391(10125):1023–75.
4. Ma XL, Xiao ZL, Liu L, Liu XX, Nie W, Li P, et al. Meta-analysis of circulating tumor cells as a prognostic marker in lung cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2012;13(4):1137–44.
5. Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: Comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2025 May 1];129(7):1651–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21128227/>
6. Keller L, Pantel K. Unravelling tumour heterogeneity by single-cell profiling of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2019;19(10):553–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-019-0180-2>
7. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors guideline from the college of American pathologists, the international association for the study of lung cancer, and the a. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(3):321–46.
8. World Health Organisation. Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022 [Internet]. International Agency for Research of Cancer. 2022 [cited 2024 Apr 18]. Available from: https://www-dep.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&populations=900
9. World Health Organisation. Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022 [Internet]. International Agency for Research of Cancer. 2022 [cited 2024 Apr 18]. Available from: https://www-dep.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&populations=900&types=1&sort_by=value0&sexes=0
10. World Health Organisation. Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022, Trachea, bronchus and lung [Internet]. International Agency for Research of Cancer. 2022 [cited 2024 Apr 18]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/maps-heatmap?mode=population&cancers=15&sexes=0>
11. World Health Organisation. Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Males and Females, in 2022 [Internet]. International Agency for Research of Cancer. 2022 [cited 2024 Apr 18]. Available from: https://www-dep.iarc.fr/today/en/dataviz/bars-compare-populations?mode=cancer&group_populations=1&populations=724&types=0&sort_by=value0&sexes=1_2
12. Cáncer EL, España EN, De FDERYP, En D, Punto EL. Perfiles nacionales de cáncer.

- 2023;
13. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte más frecuente (España) - Resultados definitivos 2023 y provisionales 1er semestre 2024 [Internet]. [Internet]. 17-12-2024. Available from: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175
 14. INE. Defunción por Cáncer de bronquios y pulmón en mujeres en España [Internet]. 17-12-2024. Available from: https://www.ine.es/dyngs/INEbase/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176780&menu=ultiDatos&idp=1254735573175
 15. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN). Estimaciones de la incidencia del cáncer en España, 2022. Red Española Regist Cáncer [Internet]. 2022;1-22. Available from: <https://redecana.org/storage/documents/b05bfad2-4b48-4519-9f56-6aad911e80b0.pdf>
 16. Gatta G, Mallone S, van der Zwan JM, Trama A, Siesling S, Capocaccia R, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: Results of EUROCARE-5 - A population-based study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014;15(1):23-34. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70546-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70546-1)
 17. Chirlaque MD, Salmerón D, Galceran J, Ameijide A, Mateos A, Torrella A, et al. Cancer survival in adult patients in Spain. Results from nine population-based cancer registries. *Clin Transl Oncol*. 2018;20(2):201-11.
 18. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: Preliminary report. *Bull World Health Organ*. 1999;77(1):84-93.
 19. Harris JE, Thun MJ, Mondul AM, Calle EE. Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8. *Br Med J*. 2004;328(7431):72-6.
 20. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. 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.
 21. Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene*. 2004;23(38):6392-403.
 22. Brennan P, Buffler PA, Reynolds P, Wu AH, Wichmann HE, Agudo A, et al. Secondhand smoke exposure in adulthood and risk of lung cancer among never smokers: A pooled analysis of two large studies. *Int J Cancer*. 2004;109(1):125-31.
 23. Markowitz SB, Levin SM, Miller A, Morabia A. Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer: New findings from the north american insulator cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1):90-6.
 24. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *Br Med J*. 2005;330(7485):223-6.
 25. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: Prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*. 2013;14(9):813-22.
 26. Lorigan P, Radford J, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: A systematic review. *Lancet Oncol* [Internet]. 2005;6(10):773-9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70387-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70387-9)
 27. Huang YJ, Huang TW, Lin FH, Chung CH, Tsao CH, Chien WC. Radiation Therapy for

- Invasive Breast Cancer Increases the Risk of Second Primary Lung Cancer: A Nationwide Population-Based Cohort Analysis. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2017;12(5):782–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2017.01.021>
28. Alberg AJ, Brock M V., Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* [Internet]. 2013;143(5 SUPPL):e1S-e29S. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-2345>
 29. Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, Redd SC. Low lung function and incident lung cancer in the United States: Data from the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Arch Intern Med*. 2003;163(12):1475–80.
 30. Bronconeumol A. Archivos de Bronconeumología Archivos de Bronconeumología. 2010;46(Supl X):1–21.
 31. 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>
 32. Jin Y, Xu Y, Xu M, Xue S. Increased risk of cancer among relatives of patients with lung cancer in China. *BMC Cancer*. 2005;5:1–7.
 33. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005;93(7):825–33.
 34. Ost DE, Yeung SCJ, Tanoue LT, Gould MK. Clinical and organizational factors in the initial evaluation of patients with lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* [Internet]. 2013;143(5 SUPPL):e121S-e141S. Available from: <http://dx.doi.org/10.1378/chest.12-2352>
 35. Kulpa J, Wójcik E, Reinfuss M, Kołodziejski L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. *Clin Chem*. 2002;48(11):1931–7.
 36. Ravenel JG, Rosenzweig KE, Kirsch J, Ginsburg ME, Kanne JP, Kestin LL, et al. ACR Appropriateness Criteria non-invasive clinical staging of bronchogenic carcinoma. *J Am Coll Radiol*. 2014;11(9):849–56.
 37. Rami-Porta R, Nishimura KK, Giroux DJ, Detterbeck F, Cardillo G, Edwards JG, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groups in the Forthcoming (Ninth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2024;19(7):1007–27.
 38. Remon J, Soria JC, Peters S. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer: an update of the ESMO Clinical Practice Guidelines focusing on diagnosis, staging, systemic and local therapy. *Ann Oncol*. 2021;32(12):1637–42.
 39. Lou F, Huang J, Sima CS, Dycoco J, Rusch V, Bach PB. Patterns of recurrence and second primary lung cancer in early-stage lung cancer survivors followed with routine computed tomography surveillance. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2013;145(1):75–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2012.09.030>
 40. Group NMC. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet* [Internet]. 2010;375(9722):1267–77. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60059-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60059-1)
 41. Burdett S, Jp P, Tierney J, Tribodet H, Stewart L, C LP, et al. Adjuvant chemotherapy for resected early-stage non-small cell lung cancer (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(3):72.

42. Le Pechoux C, Pourel N, Barlesi F, Lerouge D, Antoni D, Lamezec B, et al. Postoperative radiotherapy versus no postoperative radiotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer and proven mediastinal N2 involvement (Lung ART): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(1):104–14.
43. Hui Z, Men Y, Hu C, Kang J, Sun X, Bi N, et al. Effect of Postoperative Radiotherapy for Patients with pIIIA-N2 Non-Small Cell Lung Cancer after Complete Resection and Adjuvant Chemotherapy: The Phase 3 PORT-C Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2021;7(8):1178–85.
44. Besse B, Adjei A, Baas P, Meldgaard P, Nicolson M, Paz-Ares L, et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: Non-small-cell lung cancer first-line/second and further lines in advanced disease. *Ann Oncol.* 2014;25(8):1475–84.
45. Reck M, Delvys Rodríguez-Abreu ;, Robinson AG, Hui R, Cs} Oszi ; Tibor, Andrea ;, et al. KEYNOTE-024 (UPDATE): Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *J Clin Oncol [Internet].* 2019;37:537–46. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2019.01.0101>.
46. Lavaud P, Bortolot M, Zullo L, O'Reilly D, Naidoo J, Mountzios G, et al. Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer: New Challenges with Immune Checkpoint Blockers and Targeted Therapies. *Cancers (Basel).* 2024;16(16).
47. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csősz T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2021;398(10308):1344–57.
48. Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(21):1973–85.
49. Provencio M, Nadal E, Insa A, García-Campelo MR, Casal-Rubio J, Dómine M, et al. Neoadjuvant chemotherapy and nivolumab in resectable non-small-cell lung cancer (NADIM): an open-label, multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2020;21(11):1413–22.
50. Wakelee H, Liberman M, Kato T, Tsuboi M, Lee S-H, Gao S, et al. Perioperative Pembrolizumab for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2023;389(6):491–503.
51. Heymach J V., Harpole D, Mitsudomi T, Taube JM, Galffy G, Hochmair M, et al. Perioperative Durvalumab for Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2023;389(18):1672–84.
52. Sorin M, Prost C, Ghaleb L, Nie K, Katergi K, Shahzad MH, et al. Neoadjuvant Chemoimmunotherapy for NSCLC: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Oncol.* 2024;10(5):621–33.
53. Yue D, Xu S, Wang Q, Li X, Shen Y, Zhao H, et al. Erlotinib versus vinorelbine plus cisplatin as adjuvant therapy in Chinese patients with stage IIIA EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EVAN): a randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Respir Med [Internet].* 2018;6(11):863–73. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30277-7](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30277-7)
54. Wu Y-L, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. Osimertinib in Resected EGFR -Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer . *N Engl J Med.* 2020;383(18):1711–23.
55. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, 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.

56. Garinet S, Wang P, Mansuet-Lupo A, Fournel L, Wislez M, Blons H. Updated Prognostic Factors in Localized NSCLC. *Cancers (Basel)*. 2022;14(6):10–5.
57. Dagogo-Jack I, Shaw AT. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(2):81–94.
58. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2019;20(8):1057–67. Available from: <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759>
59. Shields MD, Chen K, Dutcher G, Patel I, Pellini B. Making the Rounds: Exploring the Role of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022;23(16).
60. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid biopsy: From discovery to clinical application. *Cancer Discov*. 2021;11(4):858–73.
61. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2022;15(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y>
62. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of Cell Shedding Into Efferent Blood of Mammary Adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1975;35(3):512–6.
63. Pantel K, Speicher MR. The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*. 2016;35(10):1216–24.
64. Jie XX, Zhang XY, Xu CJ. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget*. 2017;8(46):81558–71.
65. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1).
66. Heidrich I, Ačkar L, Mossahebi Mohammadi P, Pantel K. Liquid biopsies: Potential and challenges. *Int J Cancer*. 2021;148(3):528–45.
67. Lemma S, Perrone AM, De Iaco P, Gasparre G, Kurelac I. Current methodologies to detect circulating tumor cells: a focus on ovarian cancer. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2021;11(9):4111–26. Available from: www.ajcr.us/
68. Habli Z, Alchamaa W, Saab R, Kadara H, Khraiche ML. Circulating tumor cell detection technologies and clinical utility: Challenges and opportunities. *Cancers (Basel)*. 2020;12(7):1–30.
69. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol*. 2011;192(3):373–82.
70. Maheswaran S, Sequist L V, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura C V, et al. Detection of Mutations in. 2008;
71. Cortés-Hernández LE, Eslami ZS, Pantel K, Alix-Panabières C. Molecular and functional characterization of circulating tumor cells: From discovery to clinical application. *Clin Chem*. 2020;66(1):97–104.
72. Lindsay CR, Blackhall FH, Carmel A, Fernandez-Gutierrez F, Gazzaniga P, Groen HJM, et al. EPAC-lung: pooled analysis of circulating tumour cells in advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2019;117(April):60–8.
73. de Wit S, Rossi E, Weber S, Tamminga M, Manicone M, Swennenhuis JF, et al. Single tube liquid biopsy for advanced non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2019;144(12):3127–37.
74. Hofman V, Bonnetaud C, Ilie MI, Vielh P, Vignaud JM, Fléjou JF, et al. Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell

- method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):827–35.
75. Bayarri-Lara C, Ortega FG, Cueto Ladrón De Guevara A, Puche JL, Ruiz Zafra J, De Miguel-Pérez D, et al. Circulating tumor cells identify early recurrence in patients with non-small cell lung cancer undergoing radical resection. *PLoS One*. 2016;11(2):1–14.
 76. De Miguel-Pérez D, Bayarri-Lara CI, Ortega FG, Russo A, Rodriguez MJM, Alvarez-Cubero MJ, et al. Post-surgery circulating tumor cells and AXL overexpression as new poor prognostic biomarkers in resected lung adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11).
 77. Chemi F, Rothwell DG, McGranahan N, Gulati S, Abbosh C, Pearce SP, et al. Pulmonary venous circulating tumor cell dissemination before tumor resection and disease relapse. *Nat Med*. 2019;25(10):1534–9.
 78. Hashimoto M, Tanaka F, Yoneda K, Takuwa T, Matsumoto S, Okumura Y, et al. Positive correlation between postoperative tumor recurrence and changes in circulating tumor cell counts in pulmonary venous blood (pvCTC) during surgical manipulation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2018;10(1):298–306.
 79. López-Ríos F, Paz-Ares L, Sanz J, Isla D, Pijuan L, Felip E, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: A National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Rev Esp Patol [Internet]*. 2020;53(3):167–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.patol.2019.11.004>
 80. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol [Internet]*. 2018;29(October 2018):iv192–237. Available from: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy275>
 81. Choudhury Y, Tan MH, Shi JL, Tee A, Ngeow KC, Poh J, et al. Complementing Tissue Testing With Plasma Mutation Profiling Improves Therapeutic Decision-Making for Patients With Lung Cancer. *Front Med*. 2022;9(February):1–11.
 82. Access O. Comprehensive gene panels provide advantages over clinical exome sequencing for Mendelian diseases. *Genome Biol*. 2015;16(1).
 83. Yamagishi M, Uchamaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy. *Curr Opin Oncol*. 2017;29(5):375–81.
 84. Fan K, Zhang CL, Qi YF, Dai X, Birling Y, Tan ZF, et al. Prognostic Value of EZH2 in Non-Small-Cell Lung Cancers: A Meta-Analysis and Bioinformatics Analysis. *Biomed Res Int*. 2020;2020.
 85. Gounder M, Schöffski P, Jones RL, Agulnik M, Cote GM, Villalobos VM, et al. Tazemetostat in advanced epithelioid sarcoma with loss of INI1/SMARCB1: an international, open-label, phase 2 basket study. *Lancet Oncol*. 2020;21(11):1423–32.
 86. OpenAI. Imagen generada con ChatGPT [Internet]. Available from: <https://chat.openai.com>
 87. Butts CA, Ding K, Seymour L, Twumasi-Ankrah P, Graham B, Gandara D, et al. Randomized phase III trial of vinorelbine plus cisplatin compared with observation in completely resected stage IB and II non-small-cell lung cancer: Updated survival analysis of JBR-10. *J Clin Oncol*. 2010;28(1):29–34.
 88. Gerlinger M, Rowan AJ, Sc B, Horswell S, Math M, Larkin J, et al. Europe PMC Funders Group Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. 2016;366(10):883–92.

89. McGranahan N, Swanton C. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. *Cell* [Internet]. 2017;168(4):613–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.018>
90. Alix-Panabières C, Bartkowiak K, Pantel K. Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients. *Mol Oncol*. 2016;10(3):443–9.
91. Garitaonaindia Y, Aguado-Noya R, Garcia-Grande A, Cordoba M, Albi MJ, Cañaveral JLC, et al. Monitoring with circulating tumor cells in the perioperative setting of patients with surgically treated stages I-IIIa NSCLC. *Transl Lung Cancer Res*. 2023;12(7):1414–24.
92. Hofman V, Ilie MI, Long E, Selva E, Bonnetaud C, Molina T, et al. Detection of circulating tumor cells as a prognostic factor in patients undergoing radical surgery for non-small-cell lung carcinoma: Comparison of the efficacy of the CellSearch Assay™ and the isolation by size of epithelial tumor cell method. *Int J Cancer*. 2011;129(7):1651–60.
93. Crosbie PAJ, Shah R, Krysiak P, Zhou C, Morris K, Tugwood J, et al. Circulating tumor cells detected in the tumor-draining pulmonary vein are associated with disease recurrence after surgical resection of NSCLC. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2016;11(10):1793–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtho.2016.06.017>
94. Murlidhar V, Reddy RM, Fouladdel S, Zhao L, Ishikawa MK, Grabauskienė S, et al. Poor prognosis indicated by venous circulating tumor cell clusters in early-stage lung cancers. *Cancer Res*. 2017;77(18):5194–206.
95. Okumura Y, Tanaka F, Yoneda K, Hashimoto M, Takuwa T, Kondo N, et al. Circulating Tumor Cells in Pulmonary Venous Blood of Primary Lung Cancer Patients. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2009;87(6):1669–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2009.03.073>
96. Krebs MG, Hou JM, Sloane R, Lancashire L, Priest L, Nonaka D, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and -independent approaches. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2012;7(2):306–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e31823c5c16>
97. Yoon SO, Kim YT, Jung KC, Jeon YK, Kim BH, Kim CW. TTF-1 mRNA-positive circulating tumor cells in the peripheral blood predict poor prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* [Internet]. 2011;71(2):209–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.04.017>
98. Sawabata N, Funaki S, Hyakutake T, Shintani Y, Fujiwara A, Okumura M. Perioperative circulating tumor cells in surgical patients with non-small cell lung cancer: does surgical manipulation dislodge cancer cells thus allowing them to pass into the peripheral blood? *Surg Today*. 2016;46(12):1402–9.
99. Wan L, Liu Q, Liang D, Guo Y, Liu G, Ren J, et al. Circulating Tumor Cell and Metabolites as Novel Biomarkers for Early-Stage Lung Cancer Diagnosis. *Front Oncol*. 2021;11(May):1–13.
100. Cardenas H, Zhao J, Vieth E, Nephew KP, Matei D. EZH2 inhibition promotes epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(51):84453–67.
101. Gallardo A, Molina A, Asenjo HG, Lopez-Onieva L, Martorell-Marugán J, Espinosa-Martinez M, et al. EZH2 endorses cell plasticity to non-small cell lung cancer cells facilitating mesenchymal to epithelial transition and tumour colonization. *Oncogene*. 2022;41(28):3611–24.

102. Yang Y, Fan H, Liu H, Lou X, Xiao N, Zhang C, et al. NOP2 facilitates EZH2-mediated epithelial–mesenchymal transition by enhancing EZH2 mRNA stability via m5C methylation in lung cancer progression. *Cell Death Dis* [Internet]. 2024;15(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-024-06899-w>
103. Koyama N, Ishikawa Y, Ohta H, Aoki T, Kyoyama H, Aoshiba K, et al. miR-4448/Girdin/Akt/AMPK axis inhibits EZH2-mediated EMT and tumorigenesis in small-cell lung cancer. *Cancer Med*. 2024;13(19):e70093.
104. Hanaki S, Shimada M. Targeting EZH2 as cancer therapy. *J Biochem*. 2021;170(1):1–4.
105. Luttman JH, Colemon A, Mayro B, Pendergast AM. Role of the ABL tyrosine kinases in the epithelial–mesenchymal transition and the metastatic cascade. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2021;19(1):1–16. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00739-6>
106. Volm M, Koomägi R, Mattern J. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptor Flt-1 in squamous cell lung cancer. *Int J cancer* [Internet]. 1997 Feb 20 [cited 2025 Apr 10];74(1):64–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9036871/>
107. Bauer AK, Umer M, Richardson VL, Cumpian AM, Harder AQ, Khosravi N, et al. Requirement for MUC5AC in KRAS-dependent lung carcinogenesis. *JCI insight*. 2018;3(15):1–14.

10. ANEXOS

10.1. ABREVIATURAS

CP: Cáncer de Pulmón

CPCP: Cáncer de Pulmón de Célula Pequeña (o Microcítico)

CPNM: Cáncer de Pulmón No Microcítico

IARC: International Agency for Research of Cancer

OMS: Organización Mundial de la Salud

INE: Instituto Nacional de Estadística

REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer

ESCAPE: European Study of Cohorts for Air Pollution Effects

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

FPI: Fibrosis Pulmonar Idiopática

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

ATS: American Thoracic Society

ERS: European Respiratory Society

CYFRA 21.1: Cytokeratin 19 Fragment Antigen 21-1

SCCA: Squamous Cell Carcinoma Antigen

CEA: CarcinoEmbryonic Antigen

NSE: Neuron Specific Enolase

TAC: Tomografía Axial Computarizada

PET: Tomografía por Emisión de Positrones

18F-FDG: 18F-fluordexosiglucosa

EBUS: ecobroncoscopia

EUS: ecoendoscopia

BAG: Biopsia con Aguja Gruesa

PAAF: Punción Aspiración con Aguja Fina

UICC: Union for International Cancer Control
 TNM: Tumor, Node and Metastasis
 SCIS: Carcinoma Epidermoide In Situ
 AIS: Adenocarcinoma In Situ
 VATS: cirugía torácica videotorascópica
 RATS: cirugía torácica robótica
 SBRT: Radioterapia Estereotáctica Extracraneal
 RT: Radioterapia
 QT: Quimioterapia
 TKI: Inhibidor de la Tirocin Kinasa
 EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
 ALK: Anaplastic Lymphoma Kinasa
 FDA: Food and Drugs Administration
 EEUU: Estados Unidos
 EMA: Agencia Europea del Medicamento
 AEM: Agencia Española del Medicamento
 SSC: supervivencia sin complicaciones
 SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad
 SG: Supervivencia Global
 BL: Biopsia Líquida
 ISLB: Sociedad Internacional de Biopsia Líquida ISLB
 cfDNA: ADN libre circulante
 ctDNA: ADN tumoral circulante
 NGS: Secuenciación de nueva generación
 PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
 TEPs: Tumor Educated Platelets

TANs: Tumor Associated Neutrophils

CAFs: Cancer Associated Fibroblast

mRNA: ARN mensajero

miRNA: micro ARN

CTCs: Células Tumorales Circulantes

PD-L1: Programmed Death-Ligand 1

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

EpCAM: molécula de adhesión de células epiteliales

EMT: fenómeno de Transición Epitelio-Mesenquimal

HER2: Receptor 2 del factor de Crecimiento Epidérmico Humano

MET: fenómeno de transición Mesénquima-Epitelial

DCT: Célula Tumoral Diseminada

MACS®: Magnetic Activated Cell Sorting

ISET®: Isolation by Size of Epithelial Tumor cells

FISH: Hibridación In Situ por Fluorescencia

SLP: Supervivencia Libre de Progresión

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

EML4: Echinoderm Microtubule-associated proteine-Like4

KRAS: oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten

HGFR: Factor de Crecimiento Hepatocitario

IHQ: Inmunohistoquímica

EZH2: Enhancer of Zeste Homolog 2

PRC2: Polycomb Repressive Complex 2

ACMG: American College of Medical Genetics

10.2. FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1: Incidencia (izquierda) y Mortalidad (derecha) mundial absoluta según el tipo de cáncer. Fuente: World Health Organization Cancer Mortality Database (Base de datos de mortalidad de la OMS), año 2022,3.
- Figura 2: Tasa de incidencia ajustada a la población estándar mundial de CP según zonas geográficas. Fuente: World Health Organization Cancer Mortality Database (Base de datos de mortalidad de la OMS), año 2022,4.
- Figura 3: Tasa de incidencia ajustada a la población mundial de cáncer en España (2022). Fuente: World Health Organization Cancer Mortality Database (Base de datos de mortalidad de la OMS), año 2022,5.
- Figura 4: Defunciones según la causa de muerte en España. Fuente: INE, 2024,6.
- Figura 5: Mortalidad por CP en mujeres en España. Fuente: INE, 2024,7.
- Figura 6: Supervivencia relativa a los 5 años para el CP en Europa, por regiones y periodos de diagnóstico. Fuente: Reproducido de Gatta, G et al. The Lancet Oncology, 2014,8.
- Figura 7: Abordaje torácico tipo VATS a la izquierda (A) y tipo RATS a la derecha (B).
- Figura 8: Abordaje torácico abierto por toracotomía.
- Figura 9: Algoritmo de tratamiento de CPNM según las recomendaciones ESMO,9.
- Figura 10: Resumen de los ensayos clínicos y estrategias de tratamiento con inmunoterapia perioperatoria en estadios resecables de CPNM. Fuente: Reproducido de Lavaud, P et al. Cancers, 2024,10.
- Figura 11: Supervivencia global por estadios patológicos según la 8ª edición TNM. Fuente: Reproducido de Goldstraw, P et al. Journal of Thoracic Oncology, 2016,11.
- Figura 12: Supervivencia global por estadios patológicos según la 9ª edición TNM. Los datos involucran a todos los pacientes evaluables con CPCNP, M0 y sometidos a resección pulmonar, excluyendo aquellos con terapia neoadyuvante. Fuente: Reproducido de Rami-Porta, R et al. Journal of Thoracic Oncology, 2024,12.
- Figura 13: Sangre centrifugada y moléculas predominantes tanto en plasma (amarillo) como en la porción celular (rojo). Fuente: Reproducido de Alix-Panabières, C et al. Cancer Discovery, 2021,13.
- Figura 14: Métodos y tecnologías de detección y aislamiento de CTCs (A) y utilidad clínica del aislamiento y caracterización de CTCs en tiempo real (B). Fuente: Reproducido de Habli, Z et al. Cancers, 2020,14.

- Figura 15: Biomarcadores imprescindibles en CPNM avanzado. Fuente: Reproducido de López-Ríos, F et al. Revista Española de Patología, 202076.
- Figura 16: Proceso de enriquecimiento y aislamiento de CTCs: Separación por gradiente de densidad y aislamiento por selección positiva inmuno magnética. Imagen creada por el autor con ChatGPT (OpenAI).
- Figura 17: Caracterización EZH2 en CTCs. Línea 1: control positivo obtenido a partir de la línea celular A549, que muestra la coexpresión de citoqueratina (verde) y EZH2 (rojo), con los núcleos teñidos con Hoechst 33342 (azul). Líneas 2 y 3: ejemplos representativos de CTCs aisladas de pacientes con expresión positiva de citoqueratina y variabilidad en la expresión de EZH2. Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 710).
- Figura 18: Estado de los pacientes al final de seguimiento
- Figura 19: Curva de supervivencia global de la serie (Kaplan-Meier).
- Figura 20: Curva de supervivencia libre de progresión de la serie (Kaplan-Meier).
- Figura 21: Curva de SG y SLP según el estadio pTNM (Kaplan-Meier), análisis univariante.
- Figura 22: Curva de SG y SLP según el tipo de resección quirúrgica (Kaplan-Meier), análisis univariante.
- Figura 23: Kaplan-Meier de la influencia de la presencia y ausencia de CTCs en la SLP (A superior) y SG (B superior) en la primera determinación CTC1 ($p = 0.9070$ y $p = 0.5430$, respectivamente) y segunda determinación al mes postoperatorio CTC2 (A y B inferiores, respectivamente) ($p = 0.322$ y $p = 0.300$, respectivamente).
- Figura 24: Kaplan-Meier de la influencia de corte ≤ 2 en la SLP (A superior) y SG (B superior) en la primera determinación CTC1 ($p = 0.4380$ y $p = 0.1920$, respectivamente) y segunda determinación CTC2 (A y B inferiores, respectivamente) ($p = 0.4550$ y $p = 0.4010$, respectivamente). *PFS: Supervivencia Libre de Progresión / OS: Supervivencia Global. Presence: presencia / Absence: ausencia*
- Figura 25: Kaplan-Meier de la influencia de la expresión EZH2 en la SLP (A) y SG (B) en la primera determinación CTC1 ($p = 0.9130$ y $p = 0.0180$, respectivamente). *PFS: Supervivencia Libre de Progresión / OS: Supervivencia Global. Low: bajo / High: alto.*
- Figura 26: Esquema mutacional de todos los pacientes secuenciados (N = 23). Diagrama descriptivo (diagrama de Sankey) de todas las variantes encontradas en el tejido tumoral y sus distintos tipos.
- Figura 27: Análisis molecular de las variantes patogénicas, potencialmente patogénicas y de significado incierto de riesgo y las variables clínico-patológicas.

HGVS: Human Genome Variation Society nomenclatura. IDV: Identificación de la Variante. FA: frecuencia alélica. Significado de variantes: P (patogénica), PP (potencialmente patogénica) y VSI (Significado Incierto).

- Figura 28: Oncoplot resumen del perfil mutacional a estudio. El gráfico de barras superior representa la cantidad de mutaciones de cada paciente. El gráfico de barras del lado derecho ilustra la cantidad de muestras afectadas por la mutación en el gen dado. El TNM de cada paciente también está presente debajo de los nombres de las muestras con las proporciones correspondientes de transiciones/transversiones, así como la presencia/ausencia de CTC y EZH2.
- Figura 29: Interacciones somáticas entre pares de genes. El color verde indica las coexistentes y el rosa las mutuamente excluyentes. Los genes morados son genes tumorales, los rojos son genes de inflamación, los verdes son genes asociados a EPOC y los negros son genes de desarrollo pulmonar. El número entre paréntesis representa el recuento de mutaciones para un gen determinado. *Valor $p < 0,05$ para la prueba exacta de Fisher.
- Figura 30: Diferencias en el número de variantes entre pacientes con y sin recurrencia agrupadas por significancia clínica. P: patogénicas; B: benignas; VUS: Significado incierto. *= $p\text{-value} < 0.05$; NS: *No Significance*.
- Tabla 1: Clasificación OMS 2015 del Carcinoma de pulmón no microcítico.
- Tabla 2: Clasificación de los subtipos de adenocarcinoma pulmonar.
- Tabla 3: 8ª Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón no microcítico. Fuente: Reproducido de Ost D et al. Chest, 201329. En rojo se resaltan los subgrupos subsidiarios de cambio en la 9ª clasificación TNM.
- Tabla 4: Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón no microcítico. Fuente: Reproducido de Rami-Porta R et al. Journal of Thoracic Oncology, 2024. En rojo se resaltan los cambios realizados respecto a la 8ª.
- Tabla 5: Comparativa de ventajas e inconvenientes entre biopsia tisular y biopsia líquida.
- Tabla 6: Alteraciones y técnicas de detección de biomarcadores en CPNM.
- Tabla 7: Resumen de las características clínico-patológicas de estudio.
- Tabla 8: A) Tasa de detección de CTCs antes (CTC1) y después de la intervención (CTC2) y media de células detectadas. B) Diferencias entre CTC1 y CTC2 ****: valor p para el test de Wilcoxon ($p = 0.0001$).
- Tabla 9: A) Media de expresión de EZH2 antes (CTC1) y después de la intervención (CTC2). B) Comparativa no significativa (ns) del porcentaje de expresión de EZH2 entre CTC1 y CTC2 mediante el test de Mann-Whitney U, $p = 0.2562$.

- Tabla 10: Análisis bivariante entre la presencia o ausencia de CTCs antes (CTC1) y después (CTC2) de la cirugía con las variables clínico-patológicas.

10.3. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

ANEXO 3

CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un programa de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación, de acuerdo con la legislación vigente.

Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación.

Participación voluntaria

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno sobre su atención médica o tratamiento.

Propósito de esta investigación científica

Usted ha sido diagnosticado de un tumor en el pulmón. Cómo le ha explicado el cirujano se encuentra en una fase en la que el tratamiento indicado es la resección quirúrgica del mismo. En función de determinados parámetros clínicos y anatomopatológicos se determinará el pronóstico de su enfermedad y si serán necesarios otros tratamientos adicionales a la cirugía.

La institución que le va a tratar está realizando un proyecto de investigación que consiste en la determinación de células tumorales circulantes en pacientes que son intervenidos cómo usted por un tumor pulmonar con el fin de conocer el valor pronóstico de la presencia de dichas células en sangre periférica.

Este estudio puede ayudar a conocer más y mejor su enfermedad, lo que puede ayudar a diseñar mejor los tratamientos en un futuro inmediato.

Su participación en esta investigación no supone ningún beneficio directo para usted, si bien otros pacientes en el futuro podrían beneficiarse de los resultados de su colaboración.

Descripción de las pruebas

Para participar en el estudio necesitamos que nos permita obtener una muestra de 20 ml de sangre periférica antes de la cirugía y en las primeras visitas a los tres y seis meses tras la cirugía. Este procedimiento no supondrá ningún riesgo para usted, ya que la extracción se hará coincidir con una venopunción prevista para el estudio preoperatorio y en las pruebas de vigilancia que son las habituales para el seguimiento de su enfermedad, por lo que no será necesario realizar ningún procedimiento adicional ni exploración. La participación no supondrá ninguna modificación con respecto al protocolo establecido por el Hospital para el tratamiento de su patología.

Si otorga su consentimiento para participar en este estudio, su muestra de sangre se analizará de acuerdo con la normativa vigente. La muestra será recogida en tubos con reactivos específicos para su análisis, por lo que una vez procesada, la muestra será destruida.

Confidencialidad

Toda su información de carácter personal se tratará con arreglo a la Directiva 95/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 24 de octubre de 1995, relativa a la protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales, a la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y a su normativa de desarrollo.

La información que se solicita es necesaria para el desarrollo del estudio científico y se encontrará referenciada por medio de un código numérico asignado por orden de entrada en el estudio, no vinculados en ningún caso con su nombre y apellidos. Los resultados del estudio podrán ser dados a conocer a la comunidad científica a través de congresos o publicaciones, de forma que no sea posible la identificación de los participantes en el mismo. De acuerdo con la ley vigente, tiene usted derecho al acceso de sus datos personales y a su rectificación, cancelación y oposición, que podrá ejercer dirigiéndose al médico que le atiende en este estudio.

Información adicional:

Su médico estará encantado de contestar cualquier pregunta adicional que usted pudiera tener. Si las investigaciones adicionales hacen surgir nuevas circunstancias que hagan necesario obtener su consentimiento para continuar en el estudio, su médico le informará en seguida.

Se le proporcionará una copia de esta hoja de información y de su consentimiento informado firmado, para que los guarde.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal del Servicio de Cirugía Torácica en el teléfono: 958020607

CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE

VALOR PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO RESECADO

Yo (Nombre y Apellidos): ...

.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio VALOR PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO RESECADO
- He recibido suficiente información sobre el estudio VALOR PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO RESECADO
- He hablado con el profesional sanitario informador:
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si

No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el *proyecto titulado* VALOR PRONÓSTICO DE LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO RESECADO

Firma del paciente

Firma del profesional sanitario informador

(o representante legal en su caso)

Nombre y apellidos:

Nombre y apellidos:

Fecha:

Fecha:

10.4. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS PARA CIRUGÍA

FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

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

CENTRO SANITARIO A.H. Virgen de las Nieves	SERVICIO/Unidad Gestión Clínica de
--	---

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

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

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

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

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

1.1 LO QUE USTED DEBE SABER:

EN QUÉ CONSISTE. PARA QUÉ SIRVE:

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

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

CÓMO SE REALIZA:

La toracotomía estándar es la intervención más habitual en estos casos. Requiere una anestesia general, ventilación separada de ambos pulmones, colocación de diversas sondas

y catéteres corporales para la monitorización de las funciones vitales durante la intervención. Estas intervenciones pueden requerir uso de sangre y/o hemoderivados durante la cirugía o en el postoperatorio. También la colocación y mantenimiento postoperatorio durante un periodo de tiempo variable de uno o dos drenajes torácicos. El periodo postoperatorio inicial transcurrirá en la sala de reanimación o en la unidad de cuidados intensivos (UCI) según valoración del médico, donde el paciente podrá ser visitado por su familia en el horario establecido en la unidad.

Las opciones de esta operación son:

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

QUÉ EFECTOS LE PRODUCIRÁ:

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

Molestias postoperatorias variables en intensidad y tiempo.

Cicatriz torácica. La desaparición del tumor o zona del pulmón enferma.

EN QUÉ LE BENEFICIARÁ:

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

OTRAS ALTERNATIVAS DISPONIBLES EN SU CASO:

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

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

En su caso:

QUÉ RIESGOS TIENE:

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

- **LOS MÁS FRECUENTES:**
Hemorragia intraoperatoria o postoperatoria que puede requerir el uso de sangre y/o hemoderivados, colocación de nuevos drenajes torácicos e incluso realizar una nueva operación para solucionar el problema. Infección de la herida quirúrgica con o sin infección pleural (zona de los pulmones) que igualmente puede requerir colocación de nuevos drenajes, e incluso nuevas operaciones para su solución, además de uso de antibióticos y otros productos farmacéuticos.
Es de especial gravedad la infección de la cavidad pleural vacía después de la extirpación de todo un pulmón, que generalmente se acompaña de apertura de la sutura del muñón bronquial y fístula (herida), obliga a dejar abierto el tórax (toracostomía abierta).
Infección pulmonar (neumonía) bien por el empeoramiento y extensión de una infección previa, bien por ser adquirida en el hospital. Dolor postoperatorio que en muy raras ocasiones puede derivar en neuralgia persistente.
 - **LOS MÁS GRAVES:**
Hemorragia, Infección, Neumonía en grados importantes.
 - **LOS DERIVADOS DE SUS PROBLEMAS DE SALUD:**
-

SITUACIONES ESPECIALES QUE DEBEN SER TENIDAS EN CUENTA:

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

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

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

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

OTRAS CUESTIONES PARA LAS QUE LE PEDIMOS SU CONSENTIMIENTO:

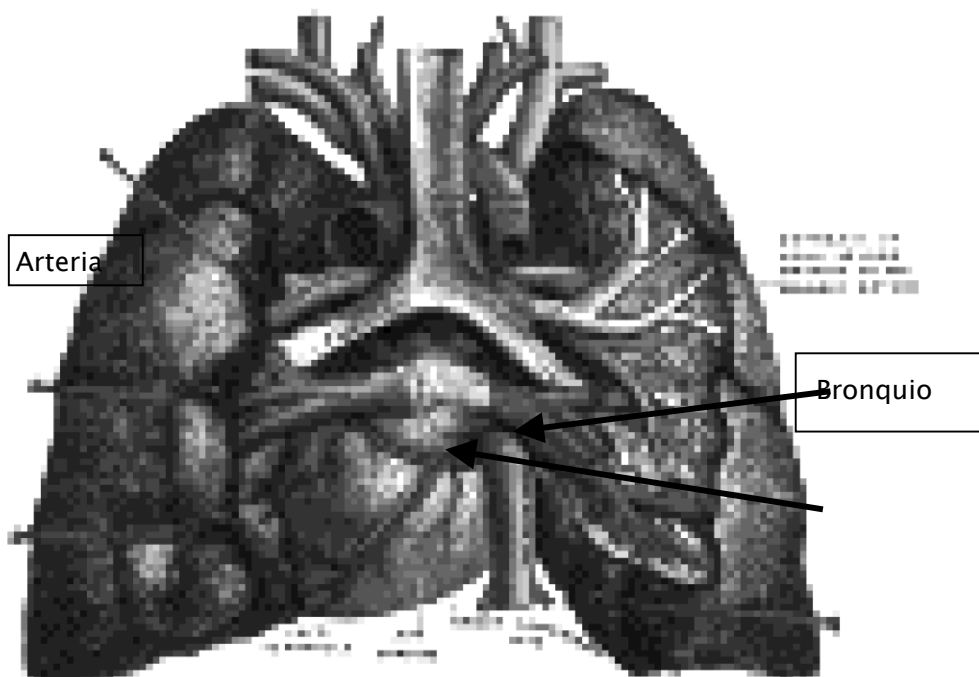
- A veces, durante la intervención, se producen hallazgos imprevistos. Pueden obligar a tener que modificar la forma de hacer la intervención y utilizar variantes de la misma no contempladas inicialmente.
- A veces es necesario tomar muestras biológicas para estudiar mejor su caso. Pueden ser conservadas y utilizadas posteriormente para realizar investigaciones relacionadas con la enfermedad que usted padece. No se usarán directamente para fines comerciales. Si fueran a ser utilizadas para otros fines distintos se le pediría posteriormente el consentimiento expreso para ello. Si no da su consentimiento para ser utilizadas en investigación, las muestras se destruirán una vez dejen de ser útiles para documentar su caso, según las normas del centro. En cualquier caso, se protegerá adecuadamente la confidencialidad en todo momento.
- También puede hacer falta tomar imágenes, como fotos o videos. Sirven para documentar mejor el caso. También pueden usarse para fines docentes de difusión del conocimiento científico. En cualquier caso, serán usadas si usted da su autorización. Su identidad siempre será preservada de forma confidencial.

1.2 IMÁGENES EXPLICATIVAS:

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



El pulmón derecho tiene tres lóbulos y el izquierdo dos. Cada uno de los lóbulos se subdivide en segmentos.



Arteria

Bronquio

ena

Ganglio

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

CENTRO SANITARIO A.H. Virgen de las Nieves	SERVICIO/Unidad Gestión Clínica de
--	---

2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

APELLIDOS Y NOMBRE, DEL PACIENTE DNI / NIE

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

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

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

2.3 CONSENTIMIENTO

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

__SI __NO Autorizo a que se realicen las actuaciones oportunas, incluyendo modificaciones en la forma de realizar la intervención, para evitar los peligros o daños potenciales para la vida o la salud, que pudieran surgir en el curso de la intervención.

__SI __NO Autorizo la conservación y utilización posterior de mis muestras biológicas para investigación relacionada directamente con la enfermedad que padezco.

__SI__NO Autorizo que, en caso de que mis muestras biológicas vayan a ser utilizadas en otras investigaciones diferentes, los investigadores se pongan en contacto conmigo para solicitarme consentimiento.

__SI__NO Autorizo la utilización de imágenes con fines docentes o de difusión del conocimiento científico.

(NOTA: Márquese con una cruz.)

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

Fdo.: Fdo.:

2.4 RECHAZO DE LA INTERVENCIÓN

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

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

Fdo.: Fdo.:

2.5 REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

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

En a de de

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

Fdo.: Fdo.:
