

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA



PROGRAMA DOCTORADO: BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

***PERFIL INMUNOLÓGICO E IMPLICACIONES PRONÓSTICAS EN
CANCER DE PULMÓN***

María del Mar Valenzuela Membrives

Granada, 2016

“Hay en el mundo un lenguaje que todos comprenden:
es el lenguaje del entusiasmo, de las cosas hechas con amor y con voluntad, en busca de
aquello que se desea o en lo que se cree”.
(Paulo Coelho)

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: María del Mar Valenzuela Membrives

ISBN: 978-84-9163-214-6

URI: <http://hdl.handle.net/10481/46538>

Agradecimientos

Volviendo la vista atrás, en estos tres años se han sucedido etapas difíciles y duras aunque guardando un equilibrio con momentos de satisfacción. Quiero aprovechar el espacio que me brinda el finalizar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral para hacer una reflexión y rendir un merecido homenaje a todas aquellas personas que me ayudaron en este proyecto.

A la Prof. D^a Esther Farez Vidal, que confió en mí desde el momento en que me presenté en la puerta de su despacho, recomendada por el Dr. Sánchez-Palencia; mi inmenso reconocimiento por su apoyo incondicional y, sobre todo, por su optimismo. Sé que sin ella no hubiera podido conseguirlo.

Al Dr. Abel Sánchez- Palencia Ramos, magnífica personal, excelente profesional. Gracias por facilitarme el contacto con los pacientes con cáncer de pulmón y enseñarme lo difícil que resulta enfrentarse a esta enfermedad.

A la Dra. María Teresa Miranda León por todo el tiempo que me ha dedicado (a pesar de que no lo tuviera), pocas persona consiguen hacer su trabajo con tanto amor.

Al Servicio de Neumología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada por su apoyo incondicional en la elaboración de este trabajo.

A los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular, Anatomía Patológica y al Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, por su colaboración.

A los pacientes que participaron en este proyecto ya que sin ellos no hubiera sido posible llevarlo a cabo.

Finalmente a mi familia, lo más importante de mi vida. A mis padres, por su comprensión y ayuda en los momentos malos. Gracias por inculcarme todo lo que soy, por los valores y principios que me han hecho intentar ser mejor persona y profesional. A Miguel Ángel, mi hermano, que con su sentido del humor me ayudó a evadirme en los momentos difíciles.

Índice

	Página
Introducción	7
1. Contextualización del problema de salud	7
1.1 Epidemiología y evolución histórica del CP	7
1.2 Factores de riesgo	10
1.2.1 Tabaco	11
1.2.2 Tabaquismo pasivo	12
1.2.3 Contaminación atmosférica	12
1.2.4 Contaminación laboral	12
1.2.5 Contaminación doméstica	13
1.2.6 Dieta	13
1.2.7 Enfermedades respiratorias previas	14
1.2.8 Infecciones	14
1.2.9 Antecedentes familiares	15
1.3. Histología	15
1.3.1 Carcinoma epidermoide	15
1.3.2 Adenocarcinoma	16
1.3.3 Carcinoma de células grandes	18
1.3.4 Adenoescamoso	18
1.4. Clínica	19
1.4.1 Manifestaciones clínicas iniciales	19
1.4.2 Manifestaciones clínicas debidas al crecimiento y la extensión regional del CP	19
1.4.3 Manifestaciones clínicas debidas a metástasis a distancia	20
1.4.4 Síndromes paraneoplásicos	21
1.5 Diagnóstico	23
1.5.1. Radiografía de tórax	23
1.5.2 Tomografía axial computerizada	24
1.5.3 Resonancia magnética	25
1.5.4. PET	25
1.5.5 Citología de esputo	26
1.5.6. Ecografía de tórax	26
1.5.7. Broncoscopia flexible	26
1.5.8. Técnicas endoscópicas guiadas por US (USEB)	28
1.5.9. Toracocentesis	29
1.5.10. Biopsia pleural	29
1.5.11. Punción transtorácica	29
1.5.12. Procedimientos quirúrgicos	30
1.6 Estadificación. Clasificación TNM para CP	30
1.6.1. Tumor primario	31

1.6.2 Ganglios linfáticos regionales	32
1.6.3 Metástasis a distancia	32
1.7 Tratamiento	33
1.7.1. Tratamiento del CP en estadios IB, IIA, IIIA	33
1.7.2. Tratamiento de la enfermedad localmente avanzada	34
1.7.3. Tratamiento quirúrgico	34
1.8 Alteraciones moleculares carcinogénicas	35
1.8.1. Protooncogenes	36
1.8.2. Genes supresores	36
1.8.3. Mutaciones del receptor de la tirosín-quinasa	37
1.9 Respuesta inmunológica en CP	37
1.9.1 El sistema inmune	38
1.9.2 Mecanismos de escape en la respuesta inmunológica	41
1.9.3 Respuesta inmunológica en CP	42
1.9.4 Efectos del humo del tabaco en la respuesta inmunológica	43
1.9.5. Inmunoterapia en CP	45
Justificación y objetivos	48
Material y métodos	52
3.1 Selección de sujetos	53
3.2 Fuentes de información	54
3.3 Obtención de muestras y procesamiento	55
3.4 Análisis de citometría de flujo	57
3.5 Estudio histológico	60
3.6 Estudio de inmunohistoquímica	60
3.7 Análisis estadístico	61
Resultados	64
4.1. Caracterización de la muestra	65
4.2. Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en muestras de sangre periférica	68
4.3. Análisis de las subpoblaciones en pacientes con NSCLC	69
4.4. Análisis de las subpoblaciones en relación a las características clínico- patológicas	73
4.5. Localización de las subpoblaciones y valor pronóstico. Análisis de inmunohistoquímica	74
Discusión	78
Conclusiones	87
Bibliografía	90
Anexos	105

Introducción

1. Introducción

1. CONTEXTUALIZACIÓN DEL PROBLEMA DE SALUD

1.1 EPIDEMIOLOGÍA Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón (CP) es la principal causa neoplásica de muerte en el mundo y la segunda causa de muerte en los países desarrollados y en algunos en vías de desarrollo, después de las enfermedades vasculares, que siguen ocupando el primer lugar. Se prevé un incremento de la tendencia del cáncer de pulmón hasta el 2030. Entre hombres tiene la mayor incidencia en todo el mundo, seguida por el cáncer de próstata y el de estómago. Entre mujeres el CP es el cuarto tumor más diagnosticado después del de mama, colorrectal y cuerpo del útero (1).

En el año 2012 se diagnosticaron en el mundo 1.8000.000 casos al año y se produjeron 1.600.000 muertes/año. En España se diagnosticaron 23.000 casos al año y murieron 20.500 casos/año.

A nivel global, se observan diferencias en la evolución de la mortalidad por CP entre los diferentes países que está relacionada con los patrones de consumo tabáquico. Así, en países con tasas muy elevadas de mortalidad como en Reino Unido y algunos países del Norte de Europa han experimentado una disminución progresiva a partir de las últimas décadas del siglo pasado, que se inició primero en los varones y, posteriormente, en las mujeres; en estos países ya se había iniciado, más de 30 años antes, un declive en la prevalencia del tabaquismo. Por el contrario, en los países del Este y Sur de Europa la disminución del consumo de tabaco se inició más tarde (2).

Se han encontrado diferencias raciales y socio-económicas en la incidencia del CP. Así por ejemplo en EEUU las tasas de incidencia y mortalidad son mayores en caucásicos y afroamericanos que otros grupos étnicos. También la edad y la localización geográfica son factores importantes (3) y existen variaciones a nivel global.

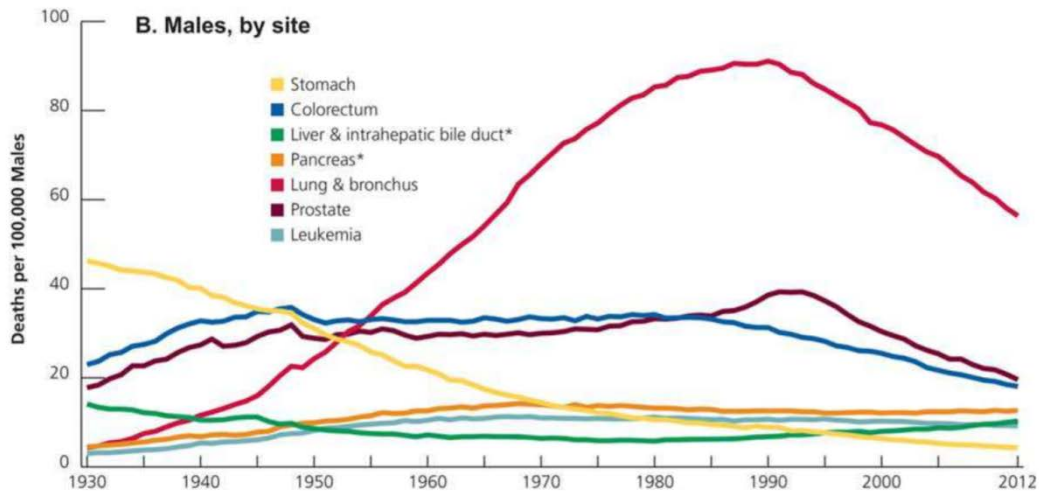


FIGURA 1: Tendencias en la tasas de mortalidad por órganos en varones desde 1930 hasta 2012. Imagen tomada de Cancer statistics, 2016.

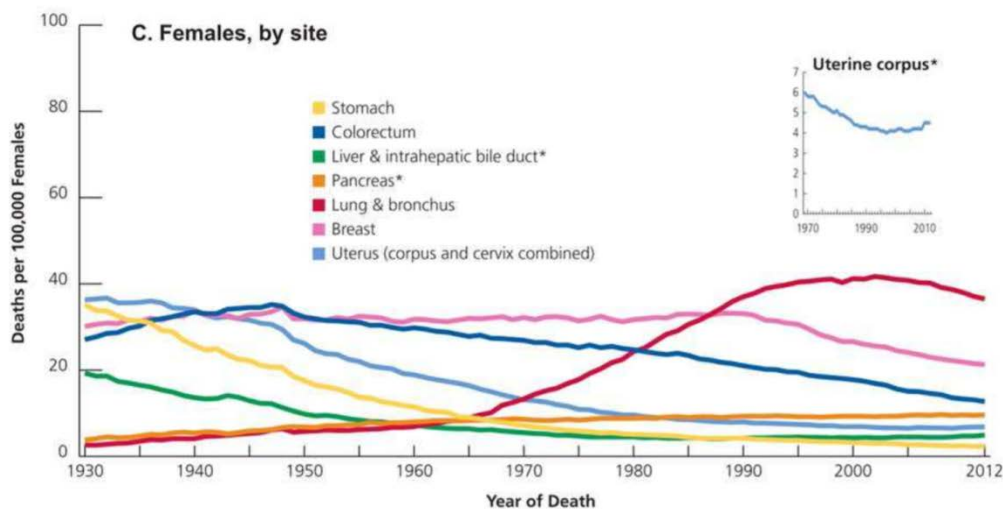


FIGURA 2: Tendencias en la tasas de mortalidad por órganos en mujeres desde 1930 hasta 2012. Imagen tomada de Cancer statistics, 2016.

En España se diagnostican unos 20.000 casos anuales, lo que representa el 18,4% de los tumores entre los hombres (18.000 casos) y el 3,2 % entre las mujeres (2.000 casos). Por géneros, este cáncer supuso 17.661 muertes en varones y 3.826 en mujeres, segunda y decimotercera causa de muerte para cada sexo respectivamente (4). Hay que destacar que en la última década, el número de muertes por CP en mujeres españolas ha experimentado un aumento anual del 4-6% debido al aumento del consumo de tabaco en las mujeres españolas en las últimas dos-tres décadas. Sin embargo, en las mujeres, el hallazgo más notable fue el exceso de riesgo observado para los municipios de Pontevedra y Ourense. Esto podría estar relacionado con una mayor exposición a radón en los hogares, ya que los mapas de distribución de radiación coinciden con este hallazgo.

Otro hallazgo es que en el último período de cinco años, el riesgo de padecer CP, en mujeres, se centró en zonas urbanas, coincidiendo con que la prevalencia de fumadores es mayor en las ciudades que en las zonas rurales, y donde, además, el efecto de la contaminación del aire también tendría que ser tomada en cuenta.

En Andalucía, la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón ajustada por edad en varones pasó, en el período de estudio, de 50,1 por 100.000 varones en 1975 a 74,5 en el año 2002, con un incremento anual medio del 1,7% ($p < 0,05$). Sin embargo, el análisis joinpoint (5) nos permite diferenciar 2 períodos de aumento: 1975-1982 y 1982-1994, con incrementos del 4,9 y el 2,0%, respectivamente ($p < 0,05$), tras los cuales las tasas descienden (un 1,6% anual; $p < 0,05$). El análisis por provincias muestra que en el período completo las tasas estandarizadas globales se incrementan de forma significativa en todas ellas. Sin embargo, el análisis joinpoint permite delimitar 3 tendencias diferenciadas en los últimos años: descenso en Cádiz y Sevilla; estabilización en Almería y Córdoba, e incremento en Granada, Huelva, Jaén y Málaga (6). Posiblemente haya una subestimación de la incidencia que afecte a los grupos de edad más avanzada y a los cánceres de peor pronóstico, por ser estos donde se concentran, fundamentalmente, los casos cuya única información procede de un Certificado de Defunción (7).

En el periodo 2010-2012, la incidencia media anual de cáncer en Granada presentó unas tasas brutas de 666 y 494 por 100.000 hombres y mujeres, respectivamente. Siendo esta incidencia más elevada en los hombres que en las mujeres, con una razón de tasas estandarizadas de 1,5. Las tasas acumulativas calculadas hasta los 74 años fueron de un 46,6% y 30,1% para hombres y mujeres, respectivamente, lo que significa que, si las tendencias temporales no se modifican, casi 1 de cada 2 hombres y 1 de cada 3 mujeres residentes en la provincia de Granada desarrollará un cáncer antes de los 75 años de edad (8).

La mortalidad en España no ha dejado de aumentar desde 1980, tanto en varones como en mujeres. De los casos nuevos en el momento del diagnóstico tan sólo el 20% se encuentra en estadios tempranos (estadios I y II de la clasificación TNM) y hasta el 40% de los casos tienen enfermedad diseminada.

Aunque con diferencias temporales según las zonas geográficas, hay una tendencia universal al aumento de la proporción de adenocarcinomas y a la disminución del tipo histológico epidermoide, tendencia que ya se registró a partir de los años setenta en EE.UU., donde los primeros son hoy, con mucho, la variedad más común. En nunca fumadores (definido como individuo que ha fumado menos de 100 cigarrillos durante toda su vida o menos de un cigarrillo al día durante un período máximo de 6 meses) y en mujeres predomina la variante adenocarcinoma, representando más del 70% de los casos frente a un 40% aproximadamente en fumadores (9). Esto podría atribuirse al

paso paulatino de tabaco negro a tabaco rubio y al descenso en la cantidad de nicotina, que produce caladas más profundas y tumores más periféricos como el adenocarcinoma frente a tumores más propios de bronquios principales o de zonas centrales como el carcinoma epidermoide.

Este cambio en la histología del CP podría deberse a los cambios que se han producido en la composición de los cigarrillos que podría conllevar a modificaciones en la dosis de carcinógenos inhalados y en el patrón de deposición en los pulmones (10). En las últimas décadas ha aumentado el volumen de inhalación, lo que podría conllevar una mayor deposición de partículas en las vías aéreas más periféricas y alveolos. Esta hipótesis también es válida para nunca fumadores expuestos al humo del tabaco (tabaquismo pasivo).

Con respecto a la edad de diagnóstico el CP se diagnostica a menudo a una edad tardía (47% de los casos diagnosticados en personas de 70 años o más) y en una etapa tardía (alrededor del 50% ha avanzado la enfermedad en el momento del diagnóstico).

Los datos de 2004 a 2008 de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER) informaron la edad media de diagnóstico en 71 años. Aproximadamente el 0,2% de los cánceres de pulmón se diagnostican en pacientes entre 20 y 34 años de edad, sin casos diagnosticados en pacientes menores de 20 años; el 1,5% entre 35 y 44 años; el 8,8% entre 45 y 54 años; el 20,9% entre 55 y 64 años; el 31,1% entre 65 y 74 años; el 29% entre 75 y 84 años; y el 8,3% a partir de los 85 años.

La edad media de diagnóstico es generalmente más temprana en pacientes caucásicos, sobre todo entre los no fumadores. Esta diferencia entre los asiáticos y los caucásicos se justifica por la presencia de diferentes susceptibilidades genéticas para el cáncer de pulmón (11-12).

1.2 FACTORES DE RIESGO

Los eventos específicos que conducen a la transformación maligna de las células broncoepiteliales son desconocidos. Los datos epidemiológicos indican que la exposición ambiental a carcinógenos, como los encontrados en el humo del tabaco o en las fibras de asbesto, inducen o facilitan la transformación (componente extrínseco). La contribución de los carcinógenos extrínsecos viene modulada por las variaciones genéticas (componente intrínseco) que afectan a aspectos del metabolismo de los carcinógenos como la conversión de procarcinógenos a carcinógenos y su inactivación. Cada uno de estos pasos críticos sigue siendo el foco de investigación clínica (13, 14).

1.2.1 Tabaco

El humo del tabaco es una mezcla de casi 5.000 sustancias tóxicas y un número aproximado de 60, están clasificados como cancerígenos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer. La fase gaseosa contiene moléculas potencialmente carcinogénicas como óxidos de nitrógeno, isopreno, butadieno, benceno, estireno, formaldehído, acetaldehído, acroleína y furano, mientras que la fase de partículas cuenta con carcinógenos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), nitrosaminas, aminas aromáticas y metales (cromo, níquel, cadmio). Si bien el efecto individual de los carcinógenos del tabaco es difícil de estudiar a nivel molecular ya que estamos tratando un problema de exposición crónica a una mezcla compleja de moléculas carcinógenas y/o procarcinógenas, numerosas evidencias experimentales han demostrado la implicación del tabaco en todos los pasos de la carcinogénesis (15). En las células diana la mayoría de estos carcinógenos se convierten en compuestos intermediarios por la enzimas del citocromo P450, que catalizan la adición de oxígeno al carcinógeno, incrementando así, su solubilidad en agua. Los metabolitos resultantes son rápidamente convertidos en formas solubles secretables por la glutatión S-transferasa, que provee un eficiente mecanismo de detoxificación. Sin embargo durante este proceso se forman intermediarios electrofílicos (deficientes en electrones) que reaccionan con el ADN formando aductos con las bases nitrogenadas. Si estos aductos no se reparan convenientemente mediante los mecanismos celulares pertinentes (nucleotide excision repair pathway) pueden llevar a que, durante la replicación del ADN, se introduzcan errores en la copia, dando lugar a mutaciones. La existencia de diferentes polimorfismos en estas enzimas detoxificadoras de xenobióticos (CYP, GST) explicarían en parte las diferentes susceptibilidades individuales a la acción de los carcinógenos, al igual que ocurre con las proteínas responsables de la reparación del DNA, que podríamos considerar como genes supresores de tumores.

Todos los tipos histológicos de CP están relacionados con el humo del tabaco, aunque la asociación crece en el epidermoide y en el microcítico, siendo menor en el adenocarcinoma y en el carcinoma de células grandes. El riesgo de desarrollar CP aumenta en función de la cantidad de cigarrillos fumados cada día y de los años de hábito tabáquico, ya que la dosis de cancerígenos es acumulativa (16).

La patogenia del tabaco sobre el pulmón se desarrolla con la llegada del humo del tabaco a los alveólos donde no se pueden absorber los hidrocarburos policíclicos aromáticos por ser sustancias liposolubles. Estas sustancias cancerígenas son fagocitadas por los macrófagos alveolares, que se eliminan con la expectoración. En muchas ocasiones, los macrófagos se rompen liberando las sustancias fagocitadas a nivel de la superficie bronquial que irrita la mucosa obligando a la membrana basal a proliferar. Esto supone un daño lesivo para el epitelio produciéndose una metaplasia

de las células escamosas que evolucionará a displasia, posteriormente a carcinoma in situ y finalmente hacia carcinoma invasivo.

Los cigarrillos de **marihuana** contienen más alquitrán que los de tabaco. Igualmente, el humo se inhala profundamente y se retiene en los pulmones por largo tiempo. Además, los cigarrillos de marihuana se fuman hasta el final, donde el contenido de alquitrán es mayor (17).

1.2.2 Tabaquismo pasivo

En los últimos 20 años se ha documentado repetidamente que la exposición a humo de tabaco de segunda mano causa cáncer de pulmón en no fumadores. La asociación causal del tabaquismo involuntario con el cáncer de pulmón es biológicamente plausible, por la presencia de carcinógenos con demostrada actividad genotóxica en el humo secundario. También se ha demostrado la excreción urinaria de una nitrosamina (4 metilnitrosamina-1-3pyridyl-1-butanona), un potente carcinógeno específico del tabaco, en no fumadores expuestos al humo de tabaco de segunda mano (18).

En 1992 la Environmental Protection Agency de Estado Unidos (USEPA), en un metaanálisis de 30 estudios concluyó que el tabaquismo pasivo estaba asociado causalmente al CP contribuyendo a unas 3000 muertes anuales en EEUU. Análisis posteriores han confirmado estos datos, concluyendo que el efecto de estar expuesto al humo ambiental del tabaco por tener un cónyuge fumador y por exposición en el lugar del trabajo se asocia con un exceso de riesgo de CP del 20-25% (19). Basándose en estos resultados, la USEPA y la International Agency for Research on Cancer (IARC) han designado oficialmente el tabaquismo pasivo como un carcinógeno humano (20, 21). No obstante, la evidencia disponible indica que el tabaquismo pasivo es un carcinógeno relativamente débil y la gran mayoría de los casos de CP en nunca fumadores no pueden ser explicados únicamente por la exposición al humo ambiental del tabaco.

1.2.3 Contaminación atmosférica

La exposición a partículas contaminantes ambientales como el dióxido de sulfuro producido por los humos de los coches y calefacciones, está en relación con el desarrollo de CP. Según varios estudios prospectivos multicéntricos, un aumento en la concentración de estas partículas de polución está asociado a un aumento de la mortalidad por CP (22).

1.2.4 Contaminación laboral

El **radón** es un gas noble, ubicuo, incoloro, inodoro e insípido que se origina durante el proceso de desintegración del uranio 238. Las primeras investigaciones sobre cáncer de pulmón y radón residencial comenzaron a realizarse a finales de los 80 y en la

década de los 90. Todos son estudios de casos y controles y tienen un método similar, a pesar de lo cual los resultados han sido muy heterogéneos, si bien la mayoría de los trabajos han puesto de manifiesto un aumento del riesgo de cáncer de pulmón en relación con la exposición a radón residencial. Estos resultados se han visto claramente influenciados por la zona en la que se ha llevado a cabo la investigación, de manera que en áreas geográficas con concentraciones elevadas de radón residencial se ha encontrado con frecuencia un mayor efecto que en los estudios realizados en zonas con bajas concentraciones de radón (23).

El asbesto se ha relacionado con el aumento de riesgo de padecer CP. Se ha encontrado diferente riesgo según el nivel de exposición y el tipo de fibras que se utilizaban para la creación de materiales ignífugos, materiales aislantes, uralitas y otros productos utilizados, fundamentalmente, en la construcción. Actualmente su uso está prácticamente eliminado en muchos países (24).

Estudios en cohortes en fundidores de cobre y mineros de estaño, expuestos al **arsénico**, demostraron una mayor incidencia en CP. También se ha demostrado esta relación, en expuestos a agua para consumo doméstico con elevados niveles de **arsénico**. En cuanto al sílice, parece demostrada una mayor incidencia de CP entre las personas con silicosis, incluso en ausencia de hábito tabáquico (25).

1.2.5 Contaminación doméstica

La mitad de la población mundial utiliza combustibles sólidos para cocinar y calentarse, a menudo en espacios poco ventilados. Las sustancias volátiles generadas de los aceites utilizados para cocinar han demostrado ser mutagénicas y contienen hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), así como aldehídos y otros mutágenos. Se ha establecido una correlación significativa entre la concentración de benzopireno en el interior de la vivienda y una alta mortalidad por CP, fundamentalmente en el adenocarcinoma (26).

1.2.6 Dieta

Numerosos estudios han evaluado la posible influencia de distintos componentes de la dieta (carnes, frutas y verduras o alcohol entre ellos) en el riesgo de desarrollar CP con resultados discordantes tanto en lo referente al posible efecto protector de alimentos como frutas o verduras como en el incremento del riesgo que en ocasiones se ha atribuido al consumo de carne roja. En un estudio de casos y controles publicado en 2007, se analizó la relación entre consumo de carne y pescado y el riesgo de CP. El resultado más destacable fue que, mientras que el consumo de carne se asociaba con un efecto protector odds ratio OR: 0,24; (IC 95%: 0,11-0,50), el consumo de pescado mostró una asociación con el desarrollo de CP, con una OR de 1,67 (IC 95%: 0,99-2,81) tanto para pescado blanco como para pescado azul (27).

Un aspecto menos estudiado es el efecto que el consumo de alcohol podría tener sobre el riesgo de desarrollo de CP y menos aún en los nunca fumadores. En un estudio publicado en 2004 se analizó el efecto del consumo de vino sobre el riesgo de desarrollar CP. El consumo de vino tinto mostró un efecto protector OR: 0,43; (IC 95%: 0,19-0,96) frente a un discreto incremento en el riesgo asociado al vino blanco OR: 1,20. Un metaanálisis publicado en 2011 evaluó la relación entre el consumo de alcohol y el riesgo de CP exclusivamente en nunca fumadores. Se incluyeron en el análisis 10 estudios, con un total de 1913 casos de CP en nunca fumadores. Se encontró un riesgo relativo en bebedores frente a no bebedores de 1,21 (IC: 95%: 0,95%-1,55). Los autores concluyeron que la ingesta de alcohol no es un factor etiológico independiente para el CP en nunca fumadores (28).

Son necesarios más estudios sobre los posibles efectos de la dieta en CP tanto en fumadores como en nunca fumadores, grupo para el que, por momento no se dispone de datos específicos.

1.2.7 Enfermedades respiratorias previas

A la inflamación se le ha atribuido un efecto carcinogénico e investigaciones recientes sugieren que los procesos inflamatorios podrían tener un papel importante en la carcinogénesis, mediante la activación de tres procesos: aumento de las mutaciones genéticas, efecto antiapoptosis e incremento de la angiogénesis.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se ha relacionado con un incremento del riesgo de desarrollar CP. El riesgo se asocia más frecuentemente con pacientes de edad más avanzada y en aquellos con antecedente de tabaquismo (29).

1.2.8 Infecciones

Se ha propuesto la infección como un factor causal en el CP, pero sigue siendo discutible. Diferentes virus oncogénicos se han propuesto como causa de CP.

La presencia de oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano (VPH) conduce a la inactivación de las proteínas supresoras de tumores p53 y gen del retinoblastoma (Rb). Mientras que el VPH es probable que se encuentre principalmente en el CP en las poblaciones asiáticas, la detección de variantes oncogénicas de VPH en algunos tumores y la riqueza del conocimiento de la función de las oncoproteínas de VPH sugieren que un subconjunto de cáncer de pulmón tendrá la infección por VPH, como principal origen (30).

El virus de Epstein-Bar (VEB), asociado con el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo, ha sido fuertemente asociado con el linfopitelioma, una rara forma de CP en los pacientes asiáticos, pero esta asociación no se ha observado en la población occidental. Otros virus sugeridos como etiológico para el CP

incluyen virus BK, virus JC, citomegalovirus humano, virus de simio 40, y el virus del sarampión, sin embargo los resultados de los diferentes estudios son incongruentes. Por otro lado, aunque la Chlamydia no es un patógeno oncogénico conocido, algunos investigadores han planteado la hipótesis de que la inflamación resultante de la infección puede conducir a especies reactivas de oxígeno que pueden causar daño en el ADN, y conferir ventajas selectivas que podrían conducir al cáncer.

Algunos estudios informan de la asociación de la tuberculosis pulmonar con CP. Otros investigadores especulan que la inflamación y cicatrización relacionada con la tuberculosis contribuyen a la patogénesis del CP.

1.2.9 Antecedentes familiares

Se sabe que el cáncer puede estar causado por mutaciones del ADN, que activan oncogenes o los hacen inactivos a los genes supresores de tumores. Algunas personas heredan mutaciones del ADN de sus padres, lo que aumenta en gran medida el riesgo de desarrollar cáncer.

Existen estudios epidemiológicos que relacionan el CP y la susceptibilidad genética. Un estudio prospectivo muestra un incremento del riesgo de CP de 1,95 en aquellos pacientes con antecedentes familiares de CP. El riesgo era mayor para las mujeres y para los nunca fumadores, que para los fumadores activos. Además la historia familiar, se ha relacionado más con la variante histológica epidermoide (31).

1.3. HISTOLOGÍA

En el año 2004, la Organización Mundial de la Salud y la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón adoptaron la misma clasificación histológica del cáncer de pulmón, la cual establece dos grandes grupos: **cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC)** o microcítico, que representa aproximadamente el 20% de todos los cánceres de pulmón y **cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)** o no microcítico, que representa el 80% restante (32). A continuación nos centraremos en la clasificación histológica del NSCLC: entre los que se encuentra el carcinoma epidermoide, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes.

1.3.1 Carcinoma epidermoide

Las características citológicas de las células escamosas tumorales son un tamaño grande con núcleos centrales hipercromáticos, uno o más nucléolos pequeños y un citoplasma abundante. Generalmente se presentan aisladas y pueden tener formas

abigarradas. Histopatológicamente el carcinoma de célula escamosa se caracteriza por mostrar queratinización, formación de perlas y/o puentes intercelulares. El grado de diferenciación condiciona la presencia de los mismos, siendo prominentes en los tumores bien diferenciados y focales en los poco diferenciados. Se reconocen cuatro variantes:

1. *Papilar*: el tumor crece con un patrón papilar, con frecuencia es endobronquial exofítico; su diferenciación del papiloma puede ser difícil si no se indentifica claramente invasión del estroma.
2. *De célula clara*: predominan o se componen en su totalidad de células claras.
3. *De célula pequeña*: se trata de un carcinoma de célula escamosa con células pequeñas y diferenciación escamosa focal.
4. *Basaloide*: se caracteriza porque los nidos están formados en su periferia por células más pequeñas con disposición en empalizada.

El carcinoma de célula escamosa se caracteriza inmunohistoquímicamente por expresar queratina de alto peso molecular (34βE12) y antígeno carcinoembrionario (CEA). Además, puede expresar, aunque en escaso porcentaje, factor de transcripción tiroideo (TTF-1) y cito-queratina 7 (CK7). No obstante, el marcador más reconocido de carcinoma escamoso es el p63, aunque su especificidad es limitada, dado que lo pueden expresar hasta el 30% de los adenocarcinomas (33).

Ninguna alteración molecular relevante se ha descrito en este tipo de tumor. En algunos estudios se menciona la presencia de mutación del gen del epidermal growth factor receptor (EGFR) pero en ninguno la frecuencia es mayor del 1% (34).

1.3.2 Adenocarcinoma

Histopatológicamente, el adenocarcinoma es un tumor heterogéneo que refleja los diferentes patrones de crecimiento que puede presentar:

1. *Lepídico*: crecimiento de las células tumorales a lo largo de los espacios alveolares manteniendo la arquitectura, sin evidencia de invasión estromal, pleural o vascular.
2. *Acinar*: formación de acinos compuestos por células cúbicas o columnares que pueden producir mucina recordando a la glándula bronquial normal. Puede incluir células de Clara.
3. *Papilar*: papilas con eje conectivovascular y estructuras papilares secundarias y terciarias que reemplaza la arquitectura pulmonar subyacente. Puede darse invasión y necrosis.
4. *Micropapilar*: papilas sin eje fibrovascular.

5. *Sólido*: nidos sólidos de células poligonales sin formación de acinos, papilas ni túbulos, con presencia de mucina.

La IASLC, ATS y ERS desarrollaron una nueva clasificación para el adenocarcinoma publicada en 2011 (35). La nueva clasificación mantiene la continuidad y progresividad desde la lesión preinvasiva a la invasiva, clasificando los tumores en función del grado de invasión, y subclasificándolos en función del patrón de crecimiento. De esta forma se consigue una mejor correlación clínico-patológica y predicción pronóstica. Una consecuencia reseñable es la desaparición del término bronquioloalveolar que ha dado lugar a múltiples confusiones al agrupar tumores con un patrón de crecimiento lepidico pero diferentes grados de invasividad.

En esta nueva clasificación encontramos:

Lesiones premalignas:

- Hiperplasia adenomatosa típica
- Adenocarcinoma in situ (< 3 cm anteriormente Bronquioloalveolar) puede ser:
 - No mucinoso
 - Mucinoso
 - Mixto

Adenocarcinoma mínimamente invasivo (< 3 cm crecimiento predominantemente lepidico con menos de 5 mm de invasión)

- No mucinoso
- Mucinoso
- Mixto

Adenocarcinoma invasivo:

- De predominio lepidico (Anteriormente patrón bronquioloalveolar no mucinoso con > 5 mm de invasión)
- De predominio acinar
- De predominio papilar
- De predominio micropapilar
- De predominio sólido con producción de mucina.

Variantes: la nueva clasificación incluye varias variantes nuevas y desaparecen algunas de las incluidas en 2004.

- Adenocarcinoma invasivo mucinoso (Anteriormente bronquioloalveolar invasivo)
- Coloide
- Fetal
- Entérico

Inmunohistoquímicamente, el adenocarcinoma se caracteriza por la expresión de TTF-1 que ha resultado ser el marcador con mejor valor diagnóstico independientemente del tipo de muestra (36, 37).

Actualmente se conocen varias alteraciones moleculares relevantes con implicaciones en la práctica clínica (36). La más importante es la mutación del gen del epidermal growth factor receptor (EGFR), que predice sensibilidad al tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa (erlotinib, gefitinib) (38). Es más frecuente en mujeres, pacientes sin antecedentes de tabaquismo y en la raza asiática. Además la positividad de esta mutación en estadios avanzados podría estar relacionado con una mayor probabilidad de presentar enfermedad diseminada (39).

1.3.3 Carcinoma de células grandes

Se trata de un carcinoma de célula no pequeña sin las características citológicas y morfológicas de la diferenciación escamosa y de la glandular. Se reconocen los siguientes subtipos:

- Carcinoma neuroendocrino de células grandes.
- Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado.
- Carcinoma basaloide.
- Carcinoma de célula clara.
- Carcinoma de célula grande con fenotipo rabdoide.

La mutación EFGR se ha descrito en este tipo histológico pero nunca en la variante con diferenciación neuroendocrina (40).

1.3.4 Carcinoma adenoescamoso

Presenta componentes de carcinoma de célula escamosa y de adenocarcinoma, representando cada uno al menos el 10% del tumor.

1.4 CLÍNICA

El CP suele ser clínicamente silente durante la mayor parte de su curso. Sin embargo, en el momento del diagnóstico, el 90% de los pacientes están sintomáticos; en el resto, el diagnóstico de CP se sospecha por hallazgos radiológicos. Los síntomas y signos derivan del crecimiento tumoral local, de la obstrucción o invasión de las estructuras adyacentes, de la afectación de las estaciones ganglionares regionales, de la diseminación hematógena extratorácica y de los efectos ocasionados por sustancias biológicas producidas por el tumor que constituyen los síndrome paraneoplásicos.

1.4.1 Manifestaciones clínicas iniciales

La tos está presente en el 50-75 % de los pacientes con CP en el momento del diagnóstico y se presenta con mayor frecuencia en pacientes con carcinoma epidermoide y de células pequeñas, debido a su tendencia a invadir las vías aéreas principales y producir neumonitis obstructiva.

La hemoptisis, ya sea franca o, más frecuentemente, en forma de expectoración hemoptoica recurrente, suele aparecer cuando se ulcera la mucosa bronquial.

La disnea es un síntoma frecuente en los pacientes con CP en el momento del diagnóstico, que ocurre en aproximadamente el 25-40% casos. Es también secundaria a la obstrucción y por el aumento de la producción de esputo (41).

1.4.2 Manifestaciones clínicas debidas al crecimiento y extensión regional del CP

Están causadas por el propio tumor o por la presencia de adenopatías aumentadas de tamaño. La posible sintomatología, lógicamente, varía en función de la localización y el tamaño del tumor.

La afectación de la pared torácica suele provocar un dolor intenso y fijo, que puede incrementarse con la palpación. El *tumor de Pancoast* se origina periféricamente en el vértice de uno de los dos lóbulos superiores, en el surco pulmonar superior, que es la muesca que la arteria subclavia produce en la cúpula pleural y en los vértices de ambos lóbulos superiores.

El *tumor de Pancoast* crece de manera relativamente lenta y metastatiza escasa y tardíamente, habitualmente se relaciona con la variante epidermoide. Debido a su localización, el tumor puede invadir en su crecimiento y por extensión directa las raíces inferiores del plexo braquial, el ganglio estrellado, la cadena simpática, los nervios

intercostales, los vasos linfáticos de la fascia endotorácica, las costillas y las vértebras vecinas. Por lo tanto, puede producir dolor en la cintura escapular, brazo y antebrazo, atrofia de los músculos de la mano, anhidrosis y *síndrome de Horner* que constituye la tríada de ptosis palpebral, miosis y enoftalmos (42).

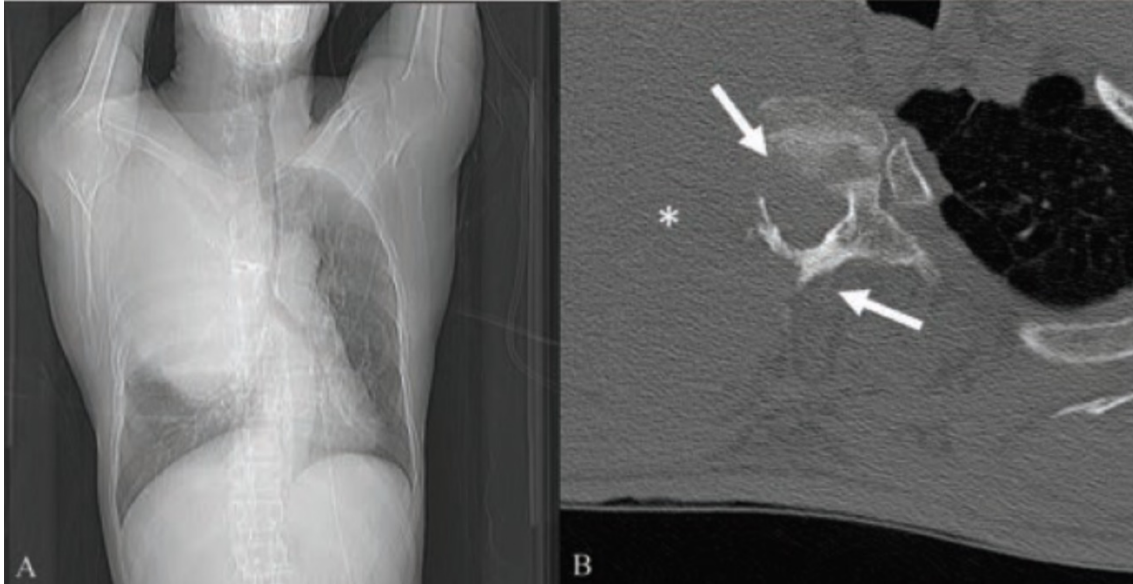


FIGURA 3: Tumor de Pancoast en LSD que invade la segunda vertebra torácica. *Imagen tomada de Walker et al. West Indian Med J. 2014*

La aparición de *linfangitis carcinomatosa* dará lugar a síntomas como tos o disnea.

El *síndrome de vena cava superior* se produce por compresión o invasión de dicho vaso en tumores del lóbulo superior derecho, produciendo dilataciones venosas en hombros y brazos, cefalea y edema cervical y facial, pudiendo constituir una urgencia médica. El tratamiento quirúrgico en estos casos es muy controvertido (43).

Si la *pleura está afectada*, bien por el tumor primario o por la infección asociada puede aparecer dolor pleurítico con o sin derrame pleural. La pérdida de pulmón funcional se va a asociar con disnea, cuya severidad depende de la cantidad de pulmón afectado y de la reserva funcional previa del paciente.

1.4.3 Manifestaciones clínicas debidas a metástasis a distancia

La presencia de metástasis en el momento del diagnóstico es, desgraciadamente, muy frecuente en el CP: alrededor del 40% de los pacientes con CPCNP presentan metástasis, siendo aún mayor la incidencia en el CPCP. Las localizaciones más frecuentes son óseas, hígado, cerebro, glándulas suprarrenales, pleura y piel (44).

Las **metástasis óseas** aparecen en el 20% de los casos al diagnóstico y hasta en un 30% de los casos en su evolución. Suelen ser osteolíticas. Afectan predominantemente a los

cuerpos vertebrales y a las costillas y suelen dar lugar a dolor intenso y a alteraciones bioquímicas como hipercalcemia y elevación de la fosfatasa alcalina.

Las **metástasis cerebrales** aparecen en un 10% de los casos en el diagnóstico, y hasta en un 50% en la evolución. De hecho, el CP es la primera causa de metástasis en el sistema nervioso central. El adenocarcinoma y el tumor microcítico son las estirpes que más frecuentemente lo producen. Pueden dar lugar a la aparición de síntomas inespecíficos (cefaleas, náuseas, vómitos) o focales (convulsiones, parexia de una extremidad, trastorno de conducta). No es excepcional que sea la primera manifestación clínica del CP (44)

El **hígado** está afectado entre un 10 y un 25% de los casos, generalmente en forma de metástasis múltiples, y suele ser silente hasta fases muy avanzadas de la enfermedad, pudiendo manifestarse entonces como dolor abdominal y hepatomegalia, astenia, anorexia, ictericia y elevación de enzimas hepáticas. Son más frecuentes en el anaplásico de células pequeñas en el que pueden aparecer hasta en un 60% de los casos a lo largo de la evolución.

Las **metástasis suprarrenales** suelen ser asintomáticas. Su afectación se describe hasta en un 25-45% de las series de autopsia y se detecta habitualmente en los estudios radiológicos. La insuficiencia adrenal debida a metástasis bilateral puede ocurrir en muy raras ocasiones.

Otras localizaciones de metástasis son anecdóticas y existen pocos casos descritos en la literatura; algunos de los órganos afectados son el riñón, el bazo, el páncreas etc (45).

1.4.4 Síndromes paraneoplásicos

En aquellos pacientes con una neoplasia, es relativamente común la aparición de un síndrome paraneoplásico (SP) que, en algunos de los casos, puede ser la manifestación clínica inicial.

Forman un grupo heterogéneo de cuadros clínicos no relacionados con el tumor primario ni con las metástasis. Son normalmente secundarios a la producción de sustancias biológicamente activas por el propio tumor o como respuesta orgánica al mismo. Los síndromes pueden ser **sistémicos** (cuadro constitucional, fiebre, etc.), **endocrinos** (hipercalcemia, síndrome por secreción inadecuada de hormona antidiurética (ADH), síndrome de Cushing, etc.), **neurológicos**; prácticamente exclusivos del CPCP (degeneración cerebelosa subaguda, mononeuritis múltiples, síndrome de Eaton-Lambert, encefalomiелitis, etc.) (46), **esqueléticos** (osteoartropatía hipertrófica, dedos “en palillos de tambor”), **hematológicos** (estados de hipercoagulabilidad, reacción leucemoide, etc.), **renales** (síndrome nefrótico,

glomerulonefritis), **cutáneos** (acantosis nigricans, dermatomiositis, etc.) y **metabólicos** (acidosis láctica, hipouricemia, etc.)

La *trombosis venosa profunda* y la *embolia pulmonar* son las manifestaciones trombóticas más frecuentes en los pacientes con cáncer ya que se produce liberación de sustancias procoagulantes o citocinas por el tumor y alteración en la agregación plaquetaria. El *síndrome de Trousseau* es la coexistencia de cáncer de órgano sólido con trombosis venosa profunda.

La *hipercalcemia no metastásica*, más frecuente en el epidermoide, puede dar lugar a anorexia, náuseas, vómitos, debilidad, confusión y coma.

La *osteootropatía hipertrófica* es una de las más frecuentes, caracterizada por la hiperostosis de los huesos tubulares y una expansión del tejido blando periungueal (acropaquias). A veces se presentan las acropaquias de forma aislada y, aunque también pueden asociarse a otras patologías, el carcinoma broncogénico es responsable de más del 80% de los casos. La causa es desconocida (47).



FIGURA 4: Dedos en palillo de tambor. Imagen tomada de keckmedicine.adam.com

Es importante no confundir estos SP con enfermedad metastásica, ya que puede llevar a adoptar un tratamiento paliativo inadecuado. Generalmente, los síndromes paraneoplásicos desaparecen con el tratamiento eficaz del CP (48).

1.5 DIAGNÓSTICO

Debido a la relevancia del CP y al curso natural que implica, es fundamental realizar un correcto estadiaje con el fin de realizar un adecuado manejo y tratamiento, sea quirúrgico, médico o radioterapéutico. El primer paso en la estadificación es el empleo de métodos no invasivos (clínicos e imagenológicos), que permitan identificar las zonas afectadas, tanto localmente como a distancia. En la mayoría de las ocasiones precisará su confirmación diagnóstica, por medio de toma de muestras, de acuerdo a un abordaje escalonado, según sea necesario. La elección de tipo de prueba se realizará según el criterio médico y de la forma de presentación clínica del paciente. A continuación se presentarán los diversos procedimientos, según las recomendaciones de la Asociación Internacional para el estudio del CP publicadas en su 7ª edición (IASLC 7º ed. 2009) (49) y otras recomendaciones más recientes, en espera de la publicación de la 8º ed. IASLC prevista para este año (50), que propone cambios en el descriptor T (tumor).

Aproximadamente un 10% de los pacientes con CP no presentan síntomas al momento del diagnóstico, detectándose a partir de una radiografía de tórax rutinaria (51). El resto de pacientes presentarán una clínica variable según la localización, el grado de extensión y el tipo de tumor. Se debe de realizar una correcta anamnesis y exploración física, con el fin de recopilar datos de forma precoz y así optimizar el tiempo y los recursos para el estudio.

Existen escalas clínicas que orientan sobre el estado general del paciente, entre ellas tenemos el índice de Karnofsky que va, de un nivel óptimo 100% (paciente asintomático), en descenso, según la gravedad de la clínica (Ejemplo: 10% paciente moribundo, 0% paciente fallecido). Otra escala útil es la ECOG (East Cooperative Oncology Group) que va desde un nivel 0 (paciente asintomático) a un nivel 4 (paciente postrado permanentemente o terminal), siendo estos últimos subsidiarios a medidas paliativas, en los cuales, se propone diagnóstico clínico basado en métodos no invasivos, y la citología de esputo para la confirmación histológica.

1.5.1 Radiografía de tórax

Es la técnica radiológica más empleada en el estudio torácico se debe indicar en 2 proyecciones: posteroanterior y lateral.

Los hallazgos sugerentes de enfermedad neoplásica son la aparición de una nueva lesión focal o crecimiento de una existente, derrame pleural, nódulos pleurales, aumento hiliar, adenopatías paratraqueales, signos indirectos de lesión endobronquial, como la neumonía postobstructiva o la atelectasia. Además ante ciertos hallazgos como la forma, localización, orientación, cavitación y existencia de otros nódulos puede orientar hacia el tipo de CP y sospechar el estadio. Las lesiones mayores de 3 centímetros se denominan masas pulmonares y habitualmente tienen más probabilidad de ser malignas.

Debido a la baja sensibilidad de la radiografía de tórax, en la identificación de adenopatías y caracterización morfológica de los nódulos pulmonares, se recomienda continuar el estudio con otra prueba de imagen, como la tomografía computerizada torácica (TAC).

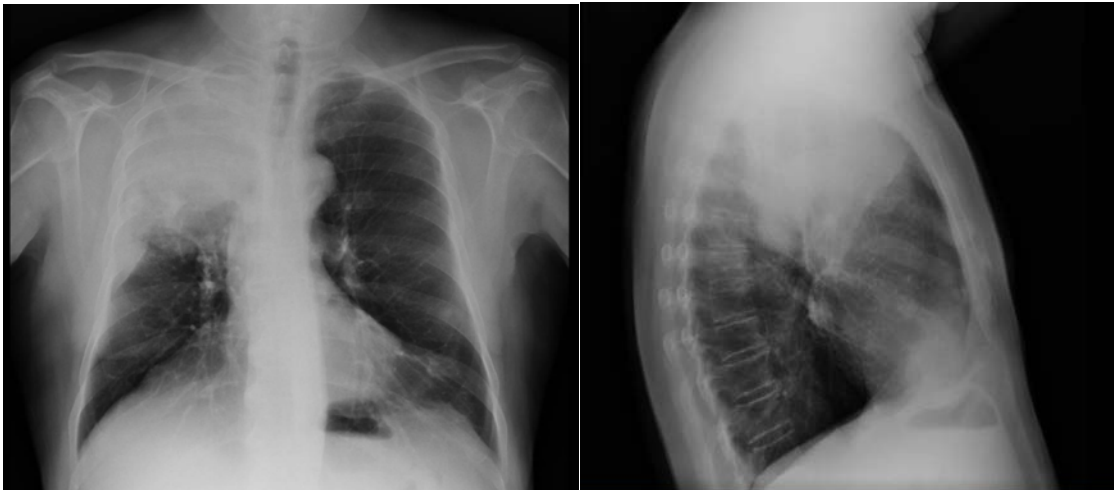


FIGURA 5: Masa en el lóbulo superior derecho delimitada por la cisura menor. *Imágenes de autor.*

1.5.2 Tomografía Axial Computerizada (TAC)

Informa con mucha mayor exactitud de la morfología y de las relaciones anatómicas y su posible extensión de la lesión detectada en la radiografía simple de tórax. Ha mejorado la detección de micronódulos tumorales de una forma más temprana. Así mismo, la TAC proporciona información más exacta de la localización de la lesión y por tanto, la mejor forma de acceder a ella para el diagnóstico de certeza. Es imprescindible para realizar el estudio de extensión sobre todo a nivel local y regional. Debe de incluir estudio de hemiabdomen superior y a ser posible siempre con contraste intravenoso, su importancia se debe a la posibilidad de detectar metástasis en glándulas suprarrenales y hepáticas en la mayoría de los casos asintomáticos.

La manifestación inicial de una lesión central suele ser una obstrucción central de la vía aérea con atelectasia distal. Por ello, una neumonía que no cura o recidiva, obliga a

descartar una lesión obstructiva. Se define ganglio linfático anormal (adenopatía) a aquel cuyo diámetro sea mayor o igual de 1 cm en su eje corto (50) Se estima que un 40% de las adenopatías mediastínicas sugestivas de malignidad según la TAC son benignos, y que el 20% de las supuestamente benignos finalmente no lo son (52), por esta razón el estadiaje adenopático, no debería basarse únicamente por los resultados de la TAC, debido a su baja sensibilidad y especificidad.

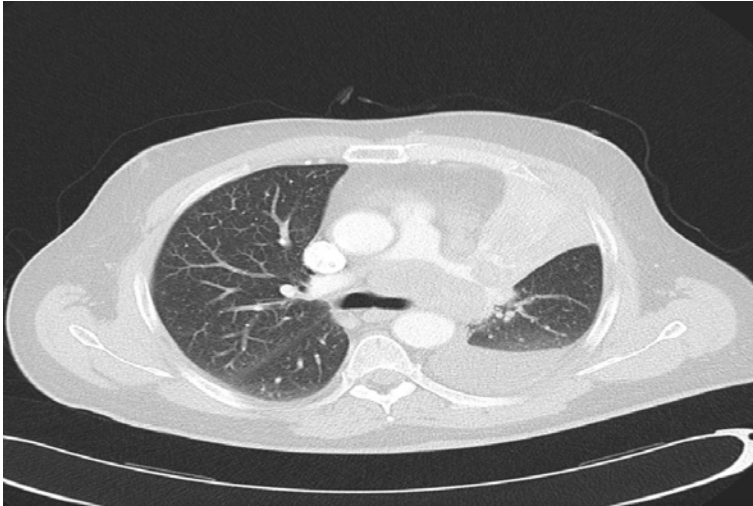


FIGURA 6: TAC torácico con contraste intravenoso: Gran masa en región hiliar izquierda que provoca estenosis del bronquio del LSI y estenosis de la arteria pulmonar izquierda. *Imagen de autor.*

1.5.3 Resonancia Magnética Nuclear (RM)

Su uso está limitado por su escasa disponibilidad y además posee un valor diagnóstico limitado sin datos adicionales a la TAC torácica, exceptuando en tumores del surco superior, debido a la superioridad de la RMN para evaluar la infiltración en vasos, plexo braquial y canal medular, con una exactitud diagnóstica que puede llegar al 94% frente al 63% de la TAC (52). Ante sospecha de metástasis cerebrales, se debe realizar una TAC o una RM craneal, así como en pacientes asintomáticos en estadio III en los que se considere la posibilidad de tratamiento radical (cirugía o radioterapia torácica). Se ha propuesto la RM dinámica para diferenciar la invasión pleural visceral de la parietal con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 70% (50).

1.5.4 Tomografía por emisión de positrones (PET)

Incorporada como técnica de imagen para el estudio del CP a mediados de los años noventa. Esta herramienta diagnóstica detecta el aumento del metabolismo de la fluorodesoxiglucosa (FDG) del tejido tumoral, lo relaciona con la actividad biológica y lo mide en unidades SUV (standarized uptake value), permitiendo diferenciar de manera cuantitativa la posible presencia de una neoplasia maligna (53). El criterio para una exploración de PET anormal es o bien un valor estandarizado de captación

máxima (SUV max) de más de 2,5 o la captación en la lesión que sea mayor que la actividad de fondo del mediastino (recordando que el corazón y el cerebro son dos órganos captantes de FDG) (54, 55). La PET no es conveniente para la valoración de lesiones malignas menores de 1,0 cm de diámetro. Por otro lado, la combinación de TAC con PET tiene una alta precisión diagnóstica que cada una de ellas por separado, lo cual apoya su uso para la estadificación del CP. La PET puede además demostrar enfermedad metastásica a distancia en los huesos, hígado y glándulas suprarrenales no demostradas por la TAC, sin embargo la PET no está exento de falsos positivos como podrían ser las lesiones inflamatorias o infecciosas. En el estudio de extensión ósea, la PET/TAC FDG-18 ha demostrado superioridad (S 92%, E 98%) frente a la gammagrafía ósea con tecnecio 99 MDP (S 86%, E 88%), además de que esta última no es capaz de reconocer infiltración de médula ósea en fases tempranas (56). Otros usos de la PET/TC son: la delimitación de la zona a irradiar (casos subsidiarios de radioterapia externa, por radiofrecuencia, estereotáctica, y/o braquioterapia), atelectasias de origen dudoso y alergia al contraste yodado (57).

1.5.5 Citología de esputo

Es una prueba sencilla e inócua. Sin embargo su sensibilidad es inferior al 70%. Tiene mayor rentabilidad diagnóstica en tumores centrales, de gran tamaño y que cursan con hemoptisis. Su positividad no excluye la necesidad de realizar broncoscopia flexible, estando limitada a los pacientes que no toleren exploraciones más invasivas. Su precisión depende de las condiciones de recogida del material y del número de muestras recogidas. Se recomienda tener al menos tres muestras por paciente.

1.5.6 Ecografía torácica

Su importancia radica en su bajo coste, no irradia, facilidad en el traslado y manejo. Nos servirá para valorar la presencia de derrame pleural, que en caso de confirmarse será preciso al menos un estudio citológico para descartar la existencia de derrame metastásico. Además se puede identificar engrosamiento pleural (si > 1 cm) o diafragmático (> 0.7 cm) y presencia de nódulos pleurales, los cuales son sugestivos de enfermedad maligna (58).

1.5.7 Broncoscopia flexible

Juega un papel crucial en la determinación de la afectación adenopática (N). Se puede tener acceso a estaciones ganglionares mediastínicas altas (2, 3p, 4), subcarínica (7), intrapulmonares hiliares (10) y lobares (11). Se ha demostrado la importancia de tener un citopatólogo in situ con experiencia en el momento de realizar la prueba, identificando las muestras satisfactorias (presencia de linfocitos, células atípicas) y evitando procedimientos más invasivos como la mediastinoscopia y la toracotomía abierta.



FIGURA 7: Broncoscopia flexible en el diagnóstico del CP. Imagen endoscópica con engrosamiento difuso de la pared bronquial y zona sugestiva de infiltración neoplásica. *Imagen de autor.*

El **broncoaspirado** es una muestra que debe recogerse en todas las broncoscopias, sobre todo en lesiones endobronquiales visibles. Su rentabilidad es del 50%.

En cuanto al **lavado broncoalveolar** tiene una rentabilidad en el CP muy limitada, con una sensibilidad baja e inferior al 25%. Es algo mayor en la linfangitis carcinomatosa y en el carcinoma bronquioalveolar. La técnica no está definitivamente estandarizada lo cual dificulta la comparación de resultados entre los distintos autores. En esencia, consiste en la instilación a través del broncoscopio flexible de un volumen determinado de suero fisiológico (en general entre 120 y 200 ml) a nivel de un segmento o subsegmento pulmonar (si es posible, debe utilizarse el lóbulo medio o llingula por ser segmentos declives en posición de decúbito). Parece razonable optar por segmentos con mayor afectación según el estudio radiológico simple o el de TAC torácico.

El **cepillado bronquial** sólo tiene utilidad en el caso de lesiones endoscópicamente visibles y cuando existe imposibilidad de realizar biopsia o en lesiones periféricas. Se aconseja un mínimo de dos tomas para aumentar la rentabilidad.

La **biopsia bronquial** una técnica fácil de practicar ya que permite la toma de muestras con visualización directa de la lesión si bien la lesiones de lóbulos o segmentos superiores son algo más difíciles de biopsiar por la angulación que requiere el broncoscopio para progresar la pinza. En el caso de las lesiones endoscópicamente visibles, la rentabilidad global de la biopsia bronquial (59) es variable según los estudios oscilando entre el 50 al 97%.

La principal complicación de la técnica es el sangrado, aunque este suele ser leve y controlarse con la simple aspiración, instilando suero frío o adrenalina diluida.

La **biopsia transbronquial (BTB)** es la técnica que permite la obtención de muestras de parénquima pulmonar a través del broncoscopio. Fue aplicada por primera vez por Levine en 1974 y, posteriormente, Zavala describió la técnica. Sus aplicaciones son,

fundamentalmente, la enfermedad pulmonar intersticial difusa o localizada y el diagnóstico de lesiones pulmonares focales periféricas generalmente malignas, especialmente en nódulos y masas pulmonares. El diagnóstico de CB manifestado como lesión pulmonar focal periférica en forma de nódulo o masa, plantea en ocasiones controversia ya que, en algunas recomendaciones se aconseja como primera vía la PAAF transtorácica, que ha demostrado una rentabilidad diagnóstica en torno al 80%, aunque con un riesgo elevado de neumotórax. Sin embargo, la mayoría de guías, aconsejan un primer acercamiento por vía endoscópica. Las principales complicaciones de la biopsia transbronquial son la fiebre (aparece hasta en el 10-15% de casos), hemorragia y el neumotórax.

1.5.8 Técnicas endoscópicas guiadas por ultrasonidos (USEB)

Tanto el EBUS (Endobronchial Ultrasound) como el EUS (Endoscopy Ultrasound) son útiles en el diagnóstico de lesiones periféricas. El EBUS permite una mejor evaluación del grado de invasión de la pared bronquial y determina el grado de afectación de estructuras adyacentes como son la aorta, la vena cava y el esófago.

Es recomendable: 1) Explorar y puncionar todos los ganglios sospechosos en la PET/TC, descartando de forma secuencial N3, N2, N1 y por sus implicaciones terapéuticas 2) explorar las estaciones ganglionares N3 en todos los casos con intención curativa radical y puncionar los ganglios ≥ 5 mm de diámetro. La imagen ecográfica nos permite diferenciar los ganglios sugestivos de malignidad de aquellos que son sugestivos de benignidad (60).

El EUS permite alcanzar las estaciones paratraqueal inferior izquierda (4L) y otras regiones no accesibles con el EBUS como son la subaórtica (5), paraesofágica y ligamento pulmonar (8,9). El EUS permite además detectar derrames pleurales izquierdos, metástasis subdiafragmáticas (glándula suprarrenal izquierda, ganglios del tronco celíaco e hígado (lóbulo izquierdo y una parte del lóbulo derecho) y permite valorar la presencia de invasión mediastínica por parte del tumor (T4) con mucha mayor precisión que las técnicas radiológicas (52, 61).

Todas estas características permiten ahorrar hasta un 50% de las técnicas invasivas en el mediastino.

Las principales desventajas son la necesidad de superar una curva de aprendizaje amplia y que en la mayoría de las ocasiones puede requerir que el paciente se someta a anestesia general para la exploración de ciertas estaciones ganglionares que requieran la oclusión total de la luz traqueal o endobronquial, en pacientes neumectomizados.



FIGURA 8: Punción de una adenopatía G7 con Ultrasonografía endobronquial. (EBUS). *Imagen de autor.*

1.5.9 Toracocentesis

La citología del líquido pleural nos informará sobre la presencia de células atípicas y en su caso de derrame metastásico (M1a, 7^º ed ASLC) siendo su S del 72% tras al menos 2 citologías seriadas. No se debe asumir el derrame pleural como metastásico hasta no haber tenido confirmación cito/histológica, debido a que podría deberse a derrames paraneoplásicos (trasudados o exudados) o paraneumónicos (exudado). Los marcadores tumorales tienen escasa especificidad (62).

1.5.10 Biopsia pleural

La biopsia pleural cerrada tiene una rentabilidad inferior a la toracocentesis diagnóstica, con una S alrededor del 50%, siendo mayor en casos de pH bajo y glucosa baja (orientativos de enfermedad avanzada) (62). El éxito depende de la extensión pleural, el número de muestras obtenidas y la experiencia del que la realiza. Está recomendada cuando la primera citología no es diagnóstica y el derrame pleural está sin filiar (63). No obstante, tan sólo el 7-12 % de los pacientes con citología negativa que realmente tienen un derrame maligno llegan a ser diagnosticados exclusivamente mediante esta técnica.

1.5.11 Punción transtorácica

La principal indicación de la punción transtorácica, hoy en día, es el diagnóstico de las neoplasias torácicas e infecciones de origen indeterminado. Su utilidad es menos fiable en otras enfermedades caracterizadas por mayor pleomorfismo, donde una pequeña muestra puede llevar a conclusiones erróneas, tal como en los casos de linfoma, timoma o mesotelioma. Es la técnica preferida en lesiones localizadas en

la periferia o en los lóbulos superiores, sobre todo, si están adyacentes a la pleura, debido a que el riesgo de neumotórax en estos casos es extremadamente bajo. La toma de muestra por aspiración con aguja fina, no facilita por regla general, muestras con la arquitectura pulmonar conservada, sólo se obtiene un aspirado celular, por lo que el diagnóstico depende del examen citológico y del cultivo. Por tanto no es adecuado para el diagnóstico de enfermedades en las que se precise examinar la morfología pulmonar (como en el caso de las enfermedades intersticiales difusas: sarcoidosis, neumopatía intersticial difusa, etc.). El procedimiento es de valor para diagnosticar lesiones nodulares (neoplásicas o infecciosas), infiltrados localizados y lesiones difusas sospechosas de etiología infecciosa (64).

1.5.12 Procedimientos quirúrgicos

Si el resultado del estudio citohistológico de la muestra obtenida mediante las técnicas anteriormente comentadas es negativo para malignidad o no concluyente, es necesaria la confirmación o descarte mediante técnicas quirúrgicas, ya sea con muestreo ganglionar o linfadenectomía. Dentro de estas técnicas tenemos: la mediastinoscopia, videomediastinoscopia, mediastinotomía, mediastinoscopia cervical extendida, videotoracoscopia, linfadenectomíavideomediastinoscópica (VAMLA) y linfadenectomía mediastínica extendida por vía transcervical (TEMLA).

1.6 ESTADIFICACIÓN. CLASIFICACIÓN TNM DEL CP

La clasificación anatómica TNM permite una descripción estandarizada de los tumores pulmonares, la comparación de resultados entre distintos estudios clínicos y encuadrar a los pacientes en estadios dentro de los cuales el pronóstico y la estrategia terapéutica sean similares. El sistema de estadificación internacional de 1997 (5ª edición) (65) no experimentó cambios en 2002 (6ª edición) y ha permanecido vigente hasta 2009. A partir de entonces, se introdujeron modificaciones en la clasificación Internacional de la TNM en base a un estudio realizado por el Lung Cancer Staging Project y el comité de trabajo de la IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) con la finalidad de actualizar la edición TNM publicada en 2002 y obtener la 7ª edición de la clasificación TNM (66). No obstante, la 7ª clasificación TNM del CP presenta varias limitaciones: las cuales, derivan del carácter retrospectivo de unas bases de datos que fueron diseñadas para estudiar dicha clasificación TNM y que carecen de detalles anatómicos precisos sobre la extensión tumoral, el número de estaciones ganglionares afectas (67) o la diferencia entre las diversas formas de enfermedad M1.

El sistema TNM para la clasificación anatómica del CP se fundamenta en tres descriptores:

- Descriptor T: Extensión del tumor primario
- Descriptor N: Ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos o regionales.
- Descriptor M: Ausencia o presencia de metástasis a distancia.

1.6.1 Tumor primario-T

Tx: No puede ser evaluado por imagen ni por broncoscopia, sí por citología de esputo positiva o en el lavado bronquial.

T0: Ninguna evidencia de tumor primario.

Tis: Carcinoma `` in situ``.

T1: Tumor \leq de 3 cms en su dimensión mayor, rodeado de parénquima pulmonar o pleura visceral y sin evidencia en broncoscopia de invasión más proximal a un bronquio lobar (ausencia de afectación de bronquio principal).

T1a: Tumor \leq 2 cms en su dimensión mayor.

T1b: Tumor $>$ 2 cms, pero \leq de 3 cms en su dimensión mayor.

T2: Tumor $>$ de 3 cms pero \leq a 7 cms en su dimensión mayor o que presente algunas de las siguientes características: infiltrate bronquio principal, infiltrate pleura visceral o que asocie atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar pero no afecta al pulmón completo.

T2a: Tumor $>$ de 3 cms pero \leq de 5 cms en su dimensión mayor.

T2b: Tumor $>$ 5 cms pero \leq de 7 cms en su dimensión mayor.

T3: Tumor $>$ de 7 cms o que invade directamente algunas de las siguientes estructuras: pared torácica (incluidos tumores del surco superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio; o tumor en bronquio principal a menos de 2 cms de la carina traqueal pero sin afectarla; o asociado a atelectasia o neumonitis distal que afecta a un pulmón completo; o la existencia de un nódulo o nódulos tumorales en el mismo lóbulo donde se origina el tumor primario.

T4: Tumor de cualquier tamaño que invade alguna de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina traqueal, nódulo o nódulos tumorales en diferente lóbulo del mismo lado donde asienta el tumor primario.

1.6.2 Ganglios linfáticos regionales

Nx: No pueden ser evaluados los ganglios linfáticos regionales.

N0: No existen ganglios linfáticos afectados.

N1: Metástasis en ganglios intrapulmonares, peribronquiales e hiliares del mismo lado incluyendo extensión directa por el tumor primario.

N2: Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos del mismo lado o subcarínicos.

N3: Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales o en espacios escalénicos o supraclaviculares de ambos lados

1.6.3 Metástasis a distancia- M

M0: No metástasis a distancia

M1: Existen metástasis a distancia

M1a: Nódulo o nódulos pulmonares contralaterales, nódulos pleurales tumorales o derrame pleural o pericárdico maligno.

M1b: Metástasis a distancia

T1: ≤ 2 cm	T1a
T1: > 2 - ≤ 3 cm	T1b
T2: > 3 - ≤ 5 cm	T2a
T2: > 5 - ≤ 7 cm	T2b
T2: > 7 cm	T3
Nódulos mismo lóbulo (T4)	T3
Nódulos otro lóbulo ipsilateral (M1)	T4
Diseminación Pleural (T4)	M1a
Metástasis Intratorácicas (M1)	M1a
Metástasis Extratorácicas (M1)	M1b

FIGURA 9: Principales cambios en la 7ª clasificación TNM de CP. *Imagen tomada de Goldstraw P y cols. J Thorac Oncol 2:706-14,2007.*

Otros parámetros de tipo biológicos o genético- moleculares para la clasificación, factor pronóstico y guías terapéuticas, son motivo de intenso estudio en la actualidad, pero hasta este momento, no existe suficiente evidencia como para incorporarlos en una clasificación conjunta con el sistema TNM.

T y M		N0	N1	N2	N3
6ª Edición TNM	7ª Edición TNM	Estadio	Estadio	Estadio	Estadio
T1 (<=2 cm)	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1 (>2-3 cm)	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 (<=5 cm)	T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2 (>5-7 cm)	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2 (> 7cm)	T3	IIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3 (invasión)					
T4 (nódulos en el mismo lóbulo)					
T4 (extensión)	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1 (pulmón ipsilateral)					
T4 (derrame pleural)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (pulmón contralateral)	M1b	IV	IV	IV	IV
M1 (metástasis a distancia)					

FIGURA 10: Clasificación por estadios TNM. Se comparan los cambios de la 6ª y la 7ª edición. Imagen tomada de Gonzalez C et al Actualización de la estadificación de CP .

La IASLC ha puesto en marcha un proyecto prospectivo encaminado a actualizar de nuevo la clasificación TNM prevista de publicación en los próximos meses (50). Se ha realizado un nuevo análisis de la base de datos internacional con el objetivo de evaluar el impacto pronóstico del tamaño tumoral definido por los descriptores T presentes, realizando una reevaluación de los puntos de corte del tamaño tumoral propuestos en la clasificación TNM actual y así tratar de corregir las limitaciones ya conocidas de la 7ª edición. Los descriptores N y M no han sido modificados.

1.7 TRATAMIENTO

El tratamiento del CP ha permanecido estancado desde la década de los 70 hasta el inicio del nuevo siglo. Sin embargo, en los últimos 15 años se han producido cambios importantes. En los estadios tempranos (I, II, IIIA), la quimioterapia administrada tras la cirugía se ha comprobado que disminuye el riesgo de recaída. En las neoplasias en estadio III (localmente avanzado), se han combinado los resultados al combinar más eficazmente la quimioterapia, radioterapia y la cirugía. Finalmente en los estadios avanzados se han incorporado nuevos fármacos sobre todo en el NSCLC, dirigidos contra dianas moleculares específicas que parecen mejorar las expectativas de estos pacientes.

1.7.1 Tratamiento en estadios IB, IIA, IIIA

La cirugía continúa siendo el único tratamiento potencialmente curativo en estadios iniciales del NSCLC. Pero, a pesar de la resección completa, estos pacientes siguen

teniendo un riesgo importante de recaída y muerte, que varían en función del estadio de la enfermedad. El objetivo del tratamiento adyuvante sería la utilización de quimioterapia para eliminar los focos micrometastásicos (indetectables por métodos actuales de diagnóstico) responsables de la recidiva de la enfermedad. Las guías actuales recomiendan quimioterapia adyuvante con regímenes basados en cisplatino para pacientes en estadio II o IIIA completamente resecado. Para paciente con estadio IB, las guías no respaldan la quimioterapia adyuvante para el uso rutinario debido a la falta de evidencia definitiva de establecer una mejor supervivencia y será necesario analizar los factores de riesgo de recurrencia (68).

1.7.2 Tratamiento de la enfermedad localmente avanzada

La quimioterapia y la radioterapia se han combinado en un esfuerzo para tratar la enfermedad locorregional y micrometastásica en pacientes con estadio III irresecable. Inicialmente, se utilizó la terapia secuencial (quimioterapia seguida de radioterapia) para evitar toxicidades superpuestas y los ensayos clínicos establecieron los beneficios de este enfoque en comparación con la radioterapia sólo. Los dos regímenes de quimioterapia que más se han utilizado son la combinación de cisplatino (P) y etopósido (E) y la de carboplatino y paclitaxel semanal. El aumento del número de fármacos no ha demostrado beneficio, aunque algún estudio ha mostrado beneficio en la supervivencia al añadir una tercera droga, incluso dos drogas adicionales (vincristina y adriamicina) al esquema clásico de PE. Asimismo, tampoco se recomienda aumentar la intensidad de dosis por ciclo ni el número de ciclos, aunque el incremento de densidad de dosis podría aplicarse en algunos pacientes de forma individualizada (69). Respecto a terapias de mantenimiento con etopósido o topotecán, han mostrado mejoría del tiempo libre de progresión aunque no modificaban la supervivencia global (70).

En el caso de enfermedad avanzada los objetivos del manejo de estos pacientes son prolongar la supervivencia y mantener la calidad de vida tanto tiempo como sea posible, al tiempo que debe intentarse, en la medida de lo posible, disminuir los efectos secundarios debidos al tratamiento. El enfoque debe reconocer la intención paliativa del mismo.

1.7.3 Tratamiento quirúrgico

El fin del tratamiento quirúrgico es la resección completa de la tumoración y de todo el drenaje linfático intrapulmonar. Una resección incompleta además de no mejorar la supervivencia, expone a complicaciones, empeora la calidad de vida, y retrasa el inicio del tratamiento. En pacientes con tumores en estadio I o II y que pueden tolerar una resección pulmonar, el procedimiento mínimo recomendado es la lobectomía.

En pacientes con estadio I y que puedan tolerar una intervención quirúrgica pero no una lobectomía, la resección sublobar (segmentectomía reglada o atípica) es preferible al tratamiento no quirúrgico. El abordaje en estadio I mediante cirugía mínimamente invasiva es tan recomendable como la toracotomía estándar (71). En pacientes con tumores centrales o localmente avanzados, así como aquellos con N1, la resección completa mediante técnicas broncoplásticas ofrece mejores resultados que la neumonectomía. Una vez comprobada la operabilidad del paciente (el paciente va a poder tolerar la anestesia y los cambios metabólicos o vasculares que pueden aparecer durante y después de la cirugía), la extensión local es la que va a dictar el procedimiento a seguir.

La **lobectomía** está indicada cuando la neoplasia se limita a un lóbulo y no existe afectación ganglionar. Se trata, generalmente, de carcinomas periféricos, alejados de los bronquios principales, es decir, de los estadios T1 y T2. Si existiese infiltración ganglionar hiliar es poco probable que una lobectomía fuese curativa.

La **neumectomía** está indicada en las lesiones del bronquio principal o en aquellas que asientan en el eje bronquial principal, o que le afecta por contigüidad. En general, se lleva a cabo una neumectomía simple extrapericárdica en neoplasias proximales con el pedículo broncovascular y ganglios linfáticos libres y una neumonectomía simple intrapericárdica cuando el pedículo vascular resulta laborioso de disecar. La cirugía broncoplástica o angioplástica (72) se utiliza para evitar la resección completa del pulmón, preservando parénquima en situaciones en las que el paciente presenta limitación funcional respiratoria o en pacientes de edad avanzada ya que la mortalidad postoperatoria puede ser del 17% (73).

La **resección sublobar** se plantea en pacientes con una función pulmonar límite que no soportarían una resección mayor, tras apurar todos los procedimientos previos como la fisioterapia respiratoria preoperatoria, el tratamiento médico correcto broncodilatador y una precisa valoración de la función pulmonar prevista tras las posibles resecciones mediante una gammagrafía pulmonar cuantificada. Las resecciones menores a la lobectomía se acompañan de un mayor porcentaje de recidivas locorregionales, pero pueden ser una opción terapéutica aceptable para este tipo de pacientes limitados funcionalmente.

1.8 ALTERACIONES MOLECULARES CARCINOGENÉTICAS

En las primeras etapas de cáncer se dan un acúmulo de alteraciones en determinados genes, que provocan una pérdida de control en el mecanismo de crecimiento celular que conduce a una proliferación clonal de poblaciones celulares anormales. Estas alteraciones afectan a diferentes tipos de genes: protooncogenes, genes supresores y genes reparadores del ADN.

1.8.1 Protooncogenes

Dirigen la producción de proteínas como ciclinas, factores de crecimiento, transductoras de señal, receptores, etc., que estimulan la proliferación celular. Cuando éstos mutan se transforman en oncogenes, los cuales son capaces de dirigir la multiplicación anárquica de las células. La activación de los oncogenes suele ser por mutación, amplificación o reordenamiento (74).

Familia RAS: Situados en el cromosoma 12 p es un oncogen que aparece en 30-40% de adenocarcinomas de fumadores y raramente en el SCLC. Cada gen Ras tiene una predilección para tumores específicos, K- ras se encuentra predominantemente en el cáncer colorrectal, pulmón, páncreas, ovario, endometrial, gástrico y sistema nervioso central. H-ras se encuentra en el cáncer de vejiga y N- ras en el melanoma y en la leucemia. Las mutaciones K-ras son excluyentes con las mutaciones de EGFR y ERBB2 e implican resistencia al tratamiento con pequeñas moléculas inhibidoras de la tirosín-quinasa y a la quimioterapia (75).

C-Erb-B2: gen localizado en el cromosoma 17 que codifica una proteína con gran homología con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (familia EGF). El c-erb-B2 puede ser un marcador tumoral de interés en neoplasias mamarias, ováricas, prostáticas y pulmonares. En el CP se sobreexpresa en el 25% de los no microcíticos; en el adenocarcinoma se correlaciona con una menor supervivencia.

Bcl-2 es un protooncogen que codifica a una proteína bcl-2 situado en la traslocación 14/18 aparece en el 25% de los carcinomas de células escamosas y en el 10% de los adenocarcinomas.

1.8.2 Genes supresores

Son los genes supresores o recesivos de la proliferación celular y, por tanto, su mutación permite la proliferación celular. La inactivación de éstos, suele ocurrir por pérdida de la región cromosómica que incluye un alelo y mutación en el segundo alelo, este proceso se denomina “pérdida de heterocigosidad” (necesitan la mutación de dos alelos). La hipermetilación del promotor como mecanismo de inactivación de los genes supresores, parece ser la más importante alteración como mecanismo precoz en la carcinogénesis. Inhiben la división celular en respuesta a un daño en el ADN hasta su reparación.

p53 es el más estudiado, se trata del gen que codifica una proteína que preserva la integridad del genoma (inhibe la función de gen MYC y RAS, activa la transcripción, controla la iniciación de la síntesis del ADN, activa los genes reparadores del ADN), conociéndose deleciones, reordenamientos y mutaciones que hacen que pierda dicha función supresora. Es considerado el guardián del genoma. Se localiza en el

cromosoma 17p y su alteración es la más frecuente de los cánceres humanos (76). El tipo de CP donde más frecuentemente se encuentra alterado es el epidermoide.

Proteína del retinoblastoma (RB): gen supresor que bloquea la progresión G1/S del ciclo celular; los individuos con mutación germinal en RB que no desarrollan retinoblastoma tienen un riesgo 15 veces mayor de desarrollar CP (77), la inactivación de ambos alelos se detecta en casi el 90% de los SCLC.

1.8.3 Mutaciones de receptores de las tirosin - quinasa

El **EGFR** es una glucoproteína transmembrana con actividad tirosina quinasa (TK) que está codificada por un gen localizado en el cromosoma 7p12. Es uno de los 4 miembros de la familia de receptores TK HER (human epidermal receptor)(78). El EGFR juega un considerable papel en la carcinogénesis y su sobreexpresión ha sido relacionada con enfermedad avanzada y peor pronóstico (79). Las mutaciones que afectan al dominio TK solo se han descrito en el NSCLC, y las más frecuentes se encuentran en el exón 19 y en el exón 21. Estas mutaciones se determinan en tejido tumoral introducido en parafina y están especialmente asociadas con el subtipo adenocarcinoma, sobre todo los bronquioloalveolares, y con las mujeres de origen oriental y no fumadoras (80). Los pacientes con estas mutaciones tienen alta probabilidad de responder a las terapias anti-EGFR. Actualmente, los fármacos de este grupo con los que se tiene más experiencia son el erlotinib y el gefitinib; ambos inhiben de forma reversible la actividad catalítica del receptor, interrumpen la transducción de la señal de crecimiento y producen un efecto antitumoral. Son los que más estrechamente se han asociado con la respuesta parcial o mejoría clínica de los pacientes con mutaciones en el gen EGFR (81).

1.9 RESPUESTA INMUNOLOGICA Y CÁNCER

La carcinogénesis es un proceso complejo y dinámico que incluye varios cambios celulares a nivel genético y que desemboca en el crecimiento celular descontrolado. El método de estadiaje de neoplasias más comúnmente utilizado es el TNM, desarrollado por la AJCC (American Joint Committee on Cancer) (66) en colaboración con la UICC (Unión internacional contra el cáncer). Este sistema de clasificación nos da una aproximación del grado de progresión tumoral en el momento de la intervención quirúrgica, pero sin embargo, no proporciona información detallada en la estimación del pronóstico tras la resección del tumor, ni tiene en consideración efectos de la respuesta inmunológica del huésped, modificándose incluso el pronóstico en pacientes con el mismo estadio (82). El proceso neoplásico puede ser potencialmente curable, pero mientras que la clasificación TNM es importante en la

toma de decisiones clínicas, los resultados varían significativamente en cada estadio TNM (83,84).

1.9.1 El sistema inmune

Entendemos por respuesta inmune todos aquellos eventos desarrollados por el sistema inmune al objeto de defender la integridad biológica del individuo frente a cualquier agresión (estímulo antigénico); puede ser de tipo inespecífica o innata y específica. Generalmente, el sistema inmune responde de forma unitaria, por lo que la división es más teórica que real; lo que sí ocurre es que, dependiendo de las circunstancias, en unos casos predomina una u otra de estas modalidades.

La respuesta inespecífica o innata (85) forma parte de los mecanismos inespecíficos de defensa y representa el primer sistema defensivo del organismo, de especial significación frente a infecciones y células cancerígenas. Las células que mediatizan esta respuesta son los polimorfonucleares (PNM), neutrófilos, macrófagos y células natural killer (células NK), que son células que se caracterizan por activarse de forma inmediata siempre que cualquier sustancia extraña penetra en el organismo, destruyéndola mediante el proceso de fagocitosis y citotoxicidad natural.

La respuesta específica o adquirida (86) se desarrolla sólo frente a la sustancia extraña que indujo su iniciación y en ella participan prioritariamente los linfocitos y las sustancias liberadas por los mismos, anticuerpos y citocinas. Puede ser de dos tipos: humoral y celular. Aunque la separación de ambos tipos es más didáctico que real, en general se considera que cuando los elementos implicados son los linfocitos B se trata de una respuesta tipo humoral mientras que cuando participan prioritariamente los linfocitos T, tanto colaboradores (Th) como citotóxicos (Tc), se trata de una respuesta tipo celular.

El tipo, densidad, localización y organización del infiltrado inmunológico en el tumor, define el concepto de Inmunoscore que determina el pronóstico de la enfermedad (83). El sistema inmune presenta un papel doble en la progresión del cáncer ya que además de impedir el crecimiento tumoral mediante la eliminación de células tumorales, también puede promover la progresión tumoral seleccionando a las células tumorales que evaden el control inmunológico. En determinados tipos de cáncer, existe una actividad inflamatoria presente antes de que se inicie un proceso tumoral, mientras que otros tipos, el proceso tumoral induce una serie de cambios inflamatorios que promueven el desarrollo tumoral (87).

La capacidad de memoria de las células T va a ser fundamental para el pronóstico de la enfermedad. La memoria inmunológica es definida como la capacidad de reconocer a antígenos previamente ya presentados. Las células memoria tienen la capacidad de circular durante largos períodos de tiempo y controlar a las células tumorales

circulantes, como se ha demostrado en modelos animales (88). Por tanto, la respuesta inmune adaptativa en el centro del tumor, parece ser el parámetro de respuesta predictivo más importante, tras la resección quirúrgica con intención curativa (89).

Los linfocitos T CD4⁺, como consecuencia de una estimulación antigénica, pueden diferenciarse hacia linfocitos T cooperadores de tipo Th1 o Th2, estando esta diferenciación en parte condicionada por las citocinas que se encuentran en el medio. Así, la presencia de IL-12 promueve la diferenciación hacia Th1, mientras que la IL-4 condiciona el desarrollo Th2. Los linfocitos Th1, en colaboración con los macrófagos, están implicados en la respuesta inmune celular, mientras que los Th2 promueven la respuesta inmune humoral (90). Los linfocitos T CD8⁺ se diferencian hacia linfocitos T citotóxicos como respuesta a la estimulación antigénica y a la presencia de citocinas secretadas por otras células. La diferenciación hacia Th 17 va tener un papel proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

Los macrófagos también van a tener un papel importante en la respuesta tumoral, entre las que se encuentran; influencia sobre la respuesta adaptativa, crecimiento tumoral, en el proceso de angiogénesis y en la respuesta terapéutica. Estos podrían adquirir el fenotipo M2 (macrófagos tolerantes), en el cual, tienen poca capacidad de presentación antigénica y pueden llegar a suprimir la activación y proliferación de células T y NK anulando la actividad inmunológica antitumoral y ejercer así una doble influencia en el crecimiento tumoral y en su progresión (91).

Las células T reguladoras (T regs) son una subpoblación de células T que suprimen la actividad del sistema inmune y mantienen un estado de inmunotolerancia. Las T regs pueden tener una función antitumoral, permitiendo al tumor la evasión de las barreras inmunológicas en el proceso tumoral. Entre los mecanismos que facilitan esta función inmunosupresiva de las T regs se encuentran; la producción de citoquinas inhibitorias, como el factor de crecimiento transformante -beta (TGF- β) y la IL-10 y la supresión de la función de las células T mediante la unión competitiva de la interleucina 2 (IL-2) a través de receptor de superficie celular CD25 (receptor de IL-2)(92).

Los linfocitos B parece que podrían tener un papel deletéreo, que podría atribuirse a la producción de IL-10 (93) o a través de la producción de inmunoglobulinas (IgG), formando complejos antígeno-anticuerpo.

Los neutrófilos maduros también participan en el proceso tumoral, desarrollando una respuesta pro-tumoral en presencia del TGF- β , pudiendo expresar arginasa y factores pro-angiogénicos favoreciendo así el crecimiento y la progresión tumoral.

En cuanto a las células NK, existe una necesidad de ampliar el conocimiento en la función que estas desempeñan en el proceso tumoral. Las células NK son linfocitos

innatos con una capacidad para reconocer células aberrantes, incluidas las células tumorales, sin necesidad de un aprendizaje previo (94). Además de la acción citotóxica, las células NK al activarse, tienen la capacidad de secretar diversos tipos de citoquinas como por ejemplo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón gamma (IFN- γ) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) que son de gran importancia en la proliferación, diferenciación y activación de otras células y la regulación de la respuesta inmunitaria. Existe una evidencia creciente, de que las células NK que llegan a infiltrar el tumor tienen severos defectos en su receptor de superficie, lo que conlleva a una disfunción de las células NK inducido por el tumor. Las células NK que llegan al centro del tumor expresan niveles inferiores del receptor de tipo inmunoglobulina (KIR) en comparación con las células NK de sangre periférica del mismo paciente (95). Estas células que no expresan receptor, sufrirán un cambio de fenotipo perdiendo su capacidad de citotoxicidad (96). De acuerdo con esta hipótesis, numerosos estudios establecen que el desarrollo de las células NK no está totalmente fijado y que el proceso de maduración de las células NK puede modificarse por el microambiente que las rodea (97). Por lo tanto, el microambiente tumoral podría tener un impacto negativo en la maduración de las células NK.

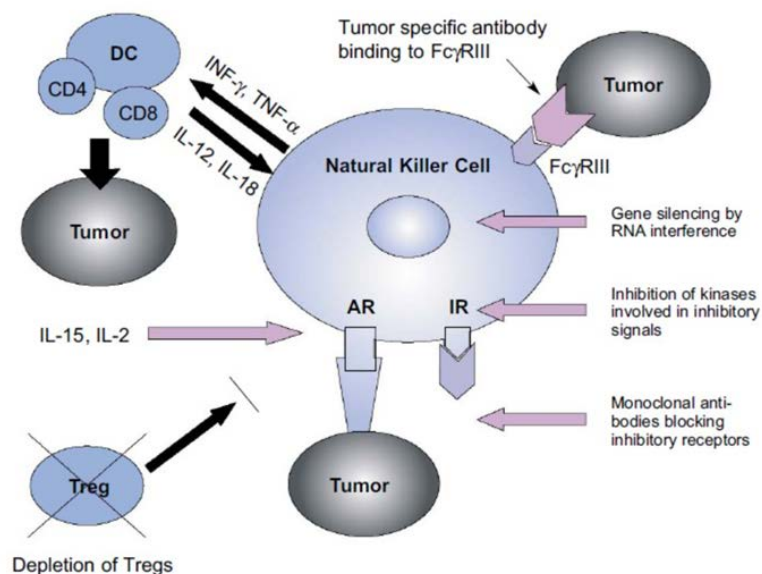


FIGURA 11: Papel de las células NK en la respuesta tumoral. *Imagen tomada de Michael Boyadzis et al. NK cells in Cancer Immunotherapy: Three decades of Discovery.*

Las diferentes poblaciones de células inmunológicas descritas pueden estar situadas en diferentes zonas de un tumor y variar entre los distintos tipos de cáncer, sugiriendo

que las células inmunológicas pueden tener diferentes funciones en el control tumoral (98).

1.9.2 Mecanismo de escape de la respuesta inmunológica

La aparición de un tumor implica que las células neoplásicas son capaces de crecer a pesar de los mecanismos de control inmunológico; por ello, se ha postulado que las células tumorales podrían utilizar diferentes mecanismos para evitar el reconocimiento y destrucción del sistema inmune (99). Entre ellos destacan:

1.- **Ignorancia de los antígenos tumorales.** En ciertas ocasiones, los antígenos tumorales no son presentados al sistema inmune y, en consecuencia, éste no responde. Esto puede ocurrir en tumores cuyos antígenos no llegan a los ganglios linfáticos, son endocitados, o el tumor se encuentra en lugar donde no llega el sistema inmune, como es el caso del cerebro y ojos.

2.- **Baja inmunogenicidad.** Un descenso de las moléculas HLA de la membrana celular puede hacer que el reconocimiento inmunológico por linfocitos CD8⁺ de las células tumorales no sea posible, y por tanto, no se genere una respuesta inmune eficaz. Por este motivo, el estudio de las moléculas HLA en los tumores es importante en el pronóstico de los mismos. También es importante considerar la falta de moléculas de adhesión intercelular en las células tumorales (100).

3.- **Supresión de la respuesta inmune inducida por el tumor.** Las células tumorales pueden producir diferentes factores solubles capaces de inhibir la respuesta inmune, entre los que se pueden considerar complejos Ag-Ac preformados y TGF-alfa o IL-10, que como es sabido ejercen una potente acción inmuno-inhibidora, y por último también se ha observado en ciertos casos una acción protectora (101).

4.- **Inducción de tolerancia por parte del tumor.** Esto puede ocurrir en tumores que carecen de ciertas moléculas de coestimulación (por ejemplo CD28) o por la inducción de células de tipo supresor.

5.- **Sobreexpresión de Fas Ligando (FasL)** por las células tumorales. Se trata de una proteína transmembrana tipo II de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) que, al unirse a su receptor, induce la apoptosis. Se produce la muerte de las células del sistema inmune que acuden al tumor (102).

Varios estudios se centraron en la red de citocinas que participaban en el microambiente tumoral (103). Con respecto a esto, al menos dos patrones de citocinas se sabe que son generados por los linfocitos T: citocinas tipo 1, que incluye la IL-2 y el IFN- γ , que se han demostrado promueven la inmunidad mediada por células, y citocinas tipo 2, que incluyen la IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que suprimen la respuesta de la inmunidad celular. La IL-6 es producida fundamentalmente por

monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea. Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno. Además de su efecto en la inflamación, se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas.

La elevación de los niveles séricos y peritumorales de IL-10 registrados en muchos tumores, incluido el CP, se ha interpretado como un apoyo al papel de la IL-10 para escapar de la respuesta inmune. Además, el aumento de la concentración sérica de esta citoquina en el CPNM se ha demostrado recientemente correlacionada con la reducción de la supervivencia (104). En cuanto a la IL-6 y su papel en el CP, altos niveles de IL-6 se ha correlacionado con un pobre pronóstico clínico (105). Gao et al (106) mostraron, en su estudio, que las mutaciones en EGFR impulsan un aumento de la producción de IL-6 en los adenocarcinomas de pulmón mediante una cascada de señalización (EGFR/IL-6/STAT3), que es importante para la tumorigénesis; describieron una correlación entre STAT3 activada (una diana de la IL-6) y mutaciones en EGFR en los pacientes con cáncer de pulmón.

1.9.3 Respuesta inmunológica en el CP

En cáncer colorectal, es donde más ampliamente se ha evaluado la infiltración inmunológica celular, creando una clasificación en función del porcentaje celular conocido como Inmunoscore. Existen una gran cantidad de estudios prospectivos que están evaluando cómo incorporar esta clasificación de Inmunoscore en las decisiones terapéuticas (107, 108, 109). Es interesante observar que las implicaciones de este fenotipo inmunológico se aplican no sólo a varios órganos donde asienta el cáncer: mama (110) pulmón, cabeza y cuello, riñón, vejiga, ovario, piel, próstata, sino también a varios tipos de células a las que afecta el proceso tumoral: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, cáncer de células grandes, etc.

El grupo de cáncer colorectal se centra en los marcadores inmunológicos CD3⁺, CD8⁺, CD45 RO⁺ y células T citotóxicas y cómo se distribuyen estos infiltrados en centro tumoral y márgenes invasivos (107, 108, 111). Un alto porcentaje de células T memoria en el centro del tumor y en los márgenes invasivos se relacionaba con un mejor pronóstico. Tumores con un bajo porcentaje de células T memoria y células T citotóxicas presentaban un peor pronóstico. De tal forma, que no sólo es importante el porcentaje de células infiltrantes sino cómo se distribuye este infiltrado, y esto va a tener un papel crucial en el control de la enfermedad a distancia (112). Además tanto la respuesta innata como adaptativa tienen una función importante en evitar la progresión tumoral mediante la inmunovigilancia. Una respuesta inmune adaptativa leve en el centro tumoral se relaciona con un peor pronóstico en pacientes con tumores poco agresivos. Por el contrario, una respuesta inmune adaptativa moderada

se ha relacionado con un buen pronóstico, independientemente de la agresividad del tumor y de la diseminación a los ganglios linfáticos regionales.

Centrándonos en el CP, existen en la literatura numerosos trabajos que estudian este infiltrado inmunológico (113-117). Algunos de estos trabajos demuestran, al igual que en cáncer colorectal, el mejor pronóstico cuando existe infiltración de células T en el centro tumoral (116). Sin embargo otros como el de Mori y cols demuestran que la infiltración de células T CD8⁺ en CP no se relaciona con el pronóstico, sino que esta infiltración, está condicionada al grado de diferenciación de las células tumorales (118).

En 2011 Gooden y cols presentaron una revisión sistemática sobre la influencia del infiltrado inmunológico en CP. Ellos relacionaron que la presencia de las células CD3⁺ y CD8⁺ se correlacionaban con un mejor pronóstico, mientras que la infiltración de células T reguladoras (Tregs) FOXP3⁺ estaba asociado a un peor pronóstico (119). Más recientemente Donnem y cols describen el pronóstico independiente de la infiltración de células T CD8⁺ en CP (120). El marcador CD8⁺ lo pueden expresar las células NK y las células dendríticas, pero se expresa fundamentalmente en la superficie de las células T citotóxicas. Esto va a tener importantes consecuencias clínicas, puesto que como veremos más adelante, existen en la actualidad diferentes terapias que estimulan la respuesta inmunológica bloqueando la inhibición de las células T citotóxicas (PD-1, PDL-1 etc..).

Suzuki y cols evaluaron en su estudio de pacientes con NSCLC, todos ellos adenocarcinoma estadio I, el papel de las células T memoria (CD45⁺ RO). La función de estas en el CP, no está tan bien caracterizada como en el cáncer colorectal y estudios futuros deben de profundizar en el conocimiento que estas células desempeñan (121).

Sin embargo todavía existen varios escollos en la determinación del Inmunoscore como son la estandarización en las técnicas de inmunohistoquímica basadas en el procedimiento de la tinción, sistema de cuantificación, localización de la cuantificación y las variaciones interobservador.

Por todo lo anteriormente referido el Inmunoscore debe ser incorporado a las futuras ediciones de la clasificación TNM, pues se ha demostrado su capacidad predictiva y pronóstica en el proceso tumoral. Un estudio con desarrollo en Noruega pretende la validación de este sistema de inmunoscore en CP (122).

1.9.4 Efectos del humo del tabaco en la respuesta inmunológica

El epitelio bronquial no sólo sirve como barrera estructural del tracto respiratorio sino que también desempeña un papel funcional en la defensa contra agentes patógenos. Esto se consigue a través de la presentación de antígenos, la expresión de moléculas de adhesión y la capacidad de diferenciación. El humo del tabaco va a producir una

serie de cambios en el epitelio bronquial, que conlleva a un aumento de células inflamatorias en la pared bronquial, como resultado de la expresión de moléculas de adhesión y de la secreción de citoquinas, como son las IL- 6, 8 y 10, que pueden inhibir la apoptosis, interferir en los mecanismos de reparación celular y promover la angiogénesis (123).

La mayoría de los fumadores 'sanos' presentan expectoración diaria. Un incremento en la producción de moco está causado por cambios estructurales como son; la hiperplasia de células caliciformes, la metaplasia glandular y la composición química del moco en pacientes fumadores. Se ha visto que el humo del tabaco produce una activación del receptor EFGR que regula la producción de mucina en fumadores (124).

El humo del tabaco produce un incremento de dos a tres veces en el número de macrófagos alveolares. Aparte de los cambios en el número, también se ha observado un deterioro en la funcionalidad de estas células, mostrándose menos maduros y viéndose también afecta su capacidad en la presentación de antígenos (125).

La leucocitosis es una alteración común observada en sangre periférica de pacientes fumadores. Se ha observado un incremento de polimorfonucleares en el esputo inducido, en las biopsias bronquiales y en el lavado broncoalveolar de pacientes fumadores (126). Un aumento de los neutrófilos en la vías respiratorias de estos pacientes produce un incremento de los niveles de enzimas proteolíticas tales como: elastasa leucocitaria, captosina G y proteasa-3. Las proteasas de los neutrófilos estimulan la producción de mucina por las células caliciformes. Además estas enzimas también tienen un efecto destructivo en las células ciliadas y son capaces de destruir la matriz extracelular.

Los eosinófilos también se han visto aumentados en muestras de biopsia bronquial en pacientes fumadores. Su número se normaliza una vez que se abandona el hábito tabáquico.

Una característica común de la inflamación crónica persistente en la vía aérea de pacientes fumadores, es la infiltración linfocítica. La subpoblación de células T CD8⁺ se encuentra elevada en el lavado broncoalveolar de pacientes fumadores y su número se relaciona con el consumo tabáquico acumulado. Se ha postulado que cuando esta proporción de células T CD8⁺ se encuentra aumentada, existe un mayor riesgo de desarrollar enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (127). Además las células T tienen un efecto destructivo importante para el desarrollo de enfisema. Asimismo, la ratio CD4⁺/CD8⁺ se encuentra elevada en este tipo de pacientes.

El abandono tabáquico se traduce en un retraso de la caída de la función pulmonar, medido fundamentalmente por el FEV1, en disminución de la incidencia de cáncer y en la reducción de la mortalidad cardiovascular (128). Estas observaciones se han

realizado en pacientes y poco se sabe acerca de los posibles beneficios del abandono tabáquico en la restitución de la homeostasis inmunológica en personas sanas. El número de macrófagos alveolares y de eosinófilos se normaliza tras el abandono, pero algunas de las características funcionales de las células inmunológicas no.

1.9.5 Inmunoterapia en CP

La inmunoterapia, también llamada terapia biológica o bioterapia, está diseñada para estimular las defensas naturales del cuerpo con el fin de combatir el cáncer. Esta utiliza productos sintetizados de forma natural por el cuerpo humano o fabricados en un laboratorio, para mejorar o restaurar la función del sistema inmunitario. No se conoce bien como la inmunoterapia actúa en el proceso tumoral, podría detener o retardar el crecimiento de las células cancerosas y así evitar la diseminación a otras partes del cuerpo, o bien, ayudar al sistema inmunológico a aumentar su eficacia en la eliminación de las células cancerosas. El campo de la inmunoterapia ha tenido un crecimiento importante en los últimos años debido a su eficacia probada para frenar la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer, incluido el CP (129-131). Recientemente Kim y cols (132) demostraron la expresión del ligando de muerte programada PD-L1 en el carcinoma epidermoide, el cual a su vez se asociaba con una mayor infiltración de células CD8+.

PD-1 (o PD-L1 ligando primario expresado en el centro tumoral) es una proteína transmembrana, que juega un papel importante en limitar la destrucción de tejido inflamado y/o infectado. Este receptor inmunoregulador está expresado en la superficie de varios tipos de células inmunes activadas, incluyendo células T, células B, células NK, células dendríticas y macrófagos. El PD-1 es una molécula de coestimulación que manda una señal inhibitoria, es decir, es un regulador negativo de la activación de células T. Cuando el PD-1 se une a sus ligandos en la célula presentadora de antígeno, envía señales que producen una disminución de citoquinas como son el IFN- γ , el TNF α y la IL- 2. Esta interacción disminuye y evita que el sistema inmunitario rechace el tumor (133).

La mayoría de pacientes con CP presentan enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico. Los tratamientos con quimioterapia no han demostrado una mejora de la supervivencia a los 5 años, por lo que ha sido necesario el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas tales como la inmunoterapia, ya sea como complemento de la cirugía o de forma individual.

Las células neoplásicas desarrollan un mecanismo de evasión a la respuesta inmune, permitiendo la progresión y el crecimiento tumoral. Estas células expresan antígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune, sin embargo, la liberación de factores solubles y la expresión de moléculas de superficie genera un microambiente que inhiben la función de las células T (134). Se ha demostrado una elevada expresión

de PD-L1 en células tumorales y que esto se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con cáncer. El tratamiento con anti-PD1 retrasa de manera significativa el crecimiento de células tumorales, motivo por el que se están desarrollando anticuerpos monoclonales frente a PD-1 y PD-L1 para bloquear la interacción ligando-receptor y para mejorar la respuesta inmune de las células T frente a las células tumorales. PD-L1 se expresa en varios tipos de tumor como son melanoma, glioblastoma, cáncer de riñón, pulmón, cabeza y cuello, estómago, colón, páncreas, mama, cuello uterino y ovario. Aunque la muestra de tejido tumoral obtenida por biopsia es el método recomendado para el análisis de la mutación, se está realizando estudios con la finalidad de obtener biomarcadores en plasma.

La inmunoterapia está demostrando resultados prometedores en el NSCLC, varios fármacos que se dirigen frente al receptor PD-1 o PD-L1 se encuentran actualmente en desarrollo clínico aunque debido a la limitación de tiempo y datos, aún no es posible una evaluación completa de la anti- PD1 y agentes anti- PD-L1 (135).

Pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que aumenta la capacidad del sistema inmunitario para combatir el cáncer, bloqueando la interacción que aumenta entre el PD-1 y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2. Es la primera terapia anti-PD-1 aprobada en EEUU. Pembrolizumab recibió la aprobación de la FDA en 2014 para el tratamiento de pacientes con el NSCLC metastásico, cuyos tumores expresen PD-L1 y muestren una progresión de la enfermedad tras una línea de tratamiento con quimioterapia de platino. En los pacientes con alteración genómica del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se utilizará cuando la enfermedad haya progresado (136).

Nivolumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea la proteína PD-1, encontrada en la superficie de células T, que forman parte del sistema inmune. Las células cancerosas pueden producir PD-1, bloqueando la capacidad de la célula T, haciéndola inactiva. Nivolumab se une a PD-1, bloqueando la capacidad de la célula tumoral para unirse a la célula T, permitiendo que la célula T se mantenga activa y ataque a las células cancerosas. Nivolumab recibió la aprobación por la FDA para su uso en Marzo de 2015 y puede ser utilizado en el tratamiento del paciente con NSCLC que ha progresado a pesar del tratamiento con quimioterapia platino. La mediana de supervivencia demostró superioridad para los pacientes tratados con nivolumab (9 meses) en comparación con los pacientes tratados con docetaxel (6 meses). Otros estudios en fase III en desarrollo comparan nivolumab como tratamiento de primera línea en paciente con PD-L1 positivo frente a otras líneas de tratamiento quimioterápico (Gemcitabina, Cisplatino, Carboplatino, Paclitaxel, Premetrexed), como tratamiento de primera línea para el estadio IV o en caso de recurrencia tumoral (137).

Desafortunadamente, la falta de un biomarcador que muestra la respuesta al tratamiento oscurece el escenario. Los datos sobre la correlación entre PD-L1 positivo y la respuesta de los pacientes a los diferentes agentes que bloquean el PD-L1 son contradictorios.

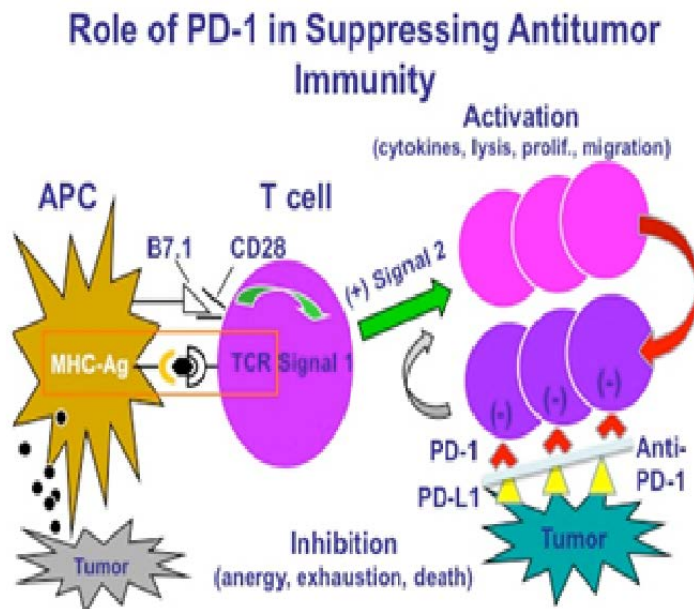


FIGURA 12: Vía PD-1/PD-L. Durante el proceso de activación celular, la primera señal está dada por el reconocimiento del antígeno presentado por el complejo mayor de histocompatibilidad al Receptor de células T; la segunda señal, indispensable para una respuesta efectora, depende de la unión de las moléculas de coestimulación expresadas por las células T a sus ligando expresados por las células presentadoras de antígenos. *Imagen tomada de Annu Rev. Immunol 2008; Pardoll et al.*

Justificación y objetivos

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El cáncer de pulmón (CP) es la principal causa neoplásica de muerte en el mundo y una de las enfermedades de origen respiratorio que causa más mortalidad. Aunque en las últimas décadas se observan algunas variaciones en la epidemiología del cáncer, como la distribución por sexo, edad y estirpe histológica, otros aspectos, como la presentación clínica, actitud terapéutica, riesgos quirúrgicos, tiempos de espera y supervivencia global han mejorado mínimamente, a pesar de los continuos avances con técnicas diagnósticas más precisas, nuevos protocolos de tratamiento y conocimientos en la biología del tumor.

Sólo el 20-25% del NSCLC son resecables en el momento del diagnóstico (estadio I-IIIa) y por tanto potencialmente curables. Existe una notable diferencia en el pronóstico de la enfermedad entre el estadio I y el IIIa como se muestra en la vigente clasificación TNM (7ª edición). Este sistema de clasificación nos da una aproximación del grado de progresión tumoral en el momento de la intervención quirúrgica, pero sin embargo, no proporciona información detallada en la estimación del pronóstico tras la resección del tumor, ni tiene en consideración efectos de la respuesta inmunológica del huésped.

La inmunovigilancia tumoral se lleva a cabo gracias a que los antígenos específicos asociados a las células pre-tumorales y tumorales pueden ser reconocidos y procesados por las células presentadoras de antígenos y presentados a los linfocitos T para su destrucción. De esta forma, el sistema inmunitario innato y adaptativo detecta y destruye células transformadas mucho antes de la manifestación clínica del tumor. Si la eliminación de las células transformadas es completa, el organismo permanecerá libre de tumor, pero a veces la eliminación de las células transformadas es incompleta iniciándose una fase de equilibrio en la cual el sistema inmunitario adaptativo previene el crecimiento tumoral manteniendo las células tumorales residuales en un estado de latencia que puede durar décadas sin causar enfermedad. Sin embargo algunas células tumorales pueden escapar a la respuesta inmunitaria y desarrollar tumores hacia una fase clínicamente evidente mediante diversos mecanismos entre los que se incluyen la inducción de un estado local y sistémico de inmunosupresión antitumoral.

La composición celular del microambiente tumoral influye en la génesis y en la progresión tumoral. Análisis histopatológicos en diferentes tumores han demostrado la infiltración de células inflamatorias y linfocíticas. La localización, densidad y funcionalidad de este infiltrado inmunológico puede tener un resultado beneficioso o deletéreo para el paciente.

El conocimiento de este infiltrado inmunológico no sólo permite tener un mejor conocimiento a nivel molecular de la enfermedad, sino que además, va a aportar información relevante para conocer el pronóstico de la misma, así como identificar a aquellos pacientes que se beneficiarían de nuevas dianas terapéuticas.

Desde las primeras publicaciones en cancercolorectal, existen en la literatura algunos trabajos que ha intentado definir la distribución del infiltrado inmunológico en diferentes órganos, incluido el pulmón. La mayoría de ellos utilizan las técnicas de inmunohistoquímica o citometría de flujo para caracterizar este infiltrado. Hasta el momento ninguno de los estudios han realizado un análisis minucioso de la composición y distribución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias ni de su funcionalidad, combinando ambas técnicas la citometría de flujo y la inmunohistoquímica.

De acuerdo con lo expuesto, se pretende llevar a cabo en este trabajo de investigación, un estudio exhaustivo sobre la distribución y las características fenotípicas del infiltrado inmunológico en muestras de tejido tumoral, estudiando en este tejido los nidos tumorales, el estroma y los márgenes invasivos y comparando dicha infiltración con el tejido adyacente al tumor, tejido sano y sangre periférica en pacientes con NSCLC.

Los objetivos para llevar a cabo esta investigación han sido:

Generales:

Identificación de cambios en el microambiente tumoral de pacientes con cáncer de pulmón potencialmente resecable. Estos cambios se estudiarán comparativamente con los observados en: zona adyacente al tumor, tejido sano y sangre periférica y que puedan estar relacionados con el escape al control inmunológico.

Específicos:

1. Determinar las diferencias de infiltración inmunológica celular en sangre periférica entre pacientes con NSCLC y controles sanos.
2. Identificar y estudiar el comportamiento de la infiltración inmunológica celular en diferentes muestras de tejido, mediante citometria de flujo (CF).
 - 2.1. Identificación de cambios cuantitativos y funcionales en las distintas subpoblaciones linfoides
3. Identificar y estudiar el comportamiento de la infiltración inmunológica celular en diferentes muestras de tejido, mediante inmunohistoquímica (IHQ).

4. Analizar el infiltrado inmunológico en relación a las características clínico-patológicas: diferencias entre tipo de tumor, estadio y grado de diferenciación.

Material y métodos

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Selección de sujetos

Se diseñó un estudio prospectivo que incluyeron 61 pacientes con diagnóstico de NSCLC intervenidos en la Sección de Cirugía torácica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves del Servicio Andaluz de Salud (SAS). Se trata de una unidad de referencia para el Área Sanitaria de Andalucía Oriental que incluye las provincias de Almería, Granada, y la zona Sanitaria de Alcalá la Real correspondiente al sur de Jaén.

El período de inclusión del estudio abarcó desde el 1 de Octubre de 2014 hasta el 31 de diciembre de 2015. Estos pacientes sólo suponen un porcentaje de todos los pacientes que puedan ser diagnosticados de CP, pero sólo se incluyeron aquellos paciente que no había recibido tratamiento neoadyuvante previo, por la posible interferencia con los resultados de infiltración celular.

Los casos son individuos diagnosticados de NSCLC en estadio temprano con confirmación anatomo-patológica. Previa a la cirugía era requisito indispensable demostrar la operabilidad del paciente, definida como su capacidad para tolerar una cirugía de resección pulmonar sin que representen un elevado riesgo de muerte o de secuela invalidante, y la reseabilidad, posibilidad de que el tumor sea extirpado en su totalidad con márgenes de seguridad, de acuerdo a los protocolos de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica (98).

Generalmente todos los pacientes requerían una valoración específica pulmonar de forma previa a la cirugía de resección. Esto incluye una gasometría arterial, una exploración funcional respiratoria; siendo el volumen espirado en el primer segundo (FEV1) y la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO), los parámetros funcionales más importantes como predictores de una evolución complicada. El test de ejercicio cardiopulmonar, queda reservado a aquellos resultados espirométricos dudosos de tolerar una resección pulmonar (139).

Todos los casos fueron valorados en los comités de tumores (Hospital Universitario ``Virgen de las Nieves`` y Hospital Clínico Universitario ``San Cecilio``, ambos en Granada), donde semanalmente se consensuan el tratamiento quirúrgico de pacientes con CP, siendo programados para la intervención.

Los pacientes eran citados en la Consulta de Cirugía torácica, de forma previa a la cirugía. Todos ellos fueron informados verbalmente y por escrito del diagnóstico, procedimiento quirúrgico al que se iban a someter, con sus posibles riesgos, secuelas,

complicaciones, así como alternativas terapéuticas y firmaron un consentimiento informado, consintiendo y permitiendo el estudio mediante la toma de muestras del tejido tumoral, tejido adyacente al tumor y tejido sano distante al tumor con fines estrictamente científicos. Dicho consentimiento fue valorado y aceptado previamente por el Comité Ético del Hospital Universitario `` Virgen de las Nieves `` (Anexo 1).

Tras el alta hospitalaria se citaba al paciente para revisiones médicas en la consulta de Cirugía torácica y Oncología, donde se realizaba un seguimiento estrecho, para detectar posibles complicaciones y/o recidiva tumoral. El estudio sistemático incluía una revisión al mes tras el alta hospitalaria y posteriormente cada 3 meses hasta completar un año. Este estudio incluía una radiografía simple de tórax (proyección postero-anterior y lateral) y analítica de sangre. Al cumplir un año de la intervención, se solicitaba tomografía axial computerizada de tórax y hemiabdomen superior para descartar la posible diseminación de la enfermedad a distancia, además de una analítica. A partir del primer año, las revisiones se realizan cada seis meses los primeros cinco años con estudio radiológico de tórax y posteriormente una vez al año hasta completar diez años desde la intervención. En caso de hallazgos clínicos, radiológicos sugestivos de recidiva tumoral, los estudios se completaban en cualquier etapa de la evolución postoperatoria.

3.2 Fuentes de información

La principal fuente de datos utilizada en el estudio para la caracterización de los pacientes, así como para obtener la información necesaria para las variables objeto de estudio, ha sido la historia clínica, que recoge datos de la anamnesis, exploración física y pruebas complementarias realizadas a cada uno de los pacientes para llegar al diagnóstico. Desde el año 2007 estos registros se realizaron en formato digital, de acuerdo a los protocolos informáticos de nuestro Hospital, en el sistema ``Diraya Estación Médica``.

Para la recogida de datos primarios se elaboró un Protocolo estructurado, cumplimentado por la doctoranda, a partir de la revisión de las historias clínicas, donde se recogieron las siguientes variables:

- Edad del paciente en el momento de acudir a la consulta
- Sexo
- Antecedentes familiares de cáncer
- Historia de tabaquismo, incluyendo el número de cigarrillos /día fumados por el paciente así como los años de duración del hábito, con el fin de calcular, posteriormente, el índice paquetes-año (ICAT)
- Antecedentes personales de cáncer

- Otras comorbilidades como hipertensión arterial, diabetes mellitus y enfermedades neumológicas relacionadas con el cáncer de pulmón (EPOC, ...)
- Diagnóstico histológico y estadificación en el grupo “Casos”
- ECOG: se trata de una escala que mide de forma práctica la calidad de vida de un paciente con cáncer. Este dato es muy importante cuando se plantea un tratamiento, ya que de esta escala dependerá el protocolo terapéutico y el pronóstico de la enfermedad. La escala ECOG se puntúa de 0 a 5. En la escala 0 el paciente se encuentra asintomática y la 4 el paciente es totalmente dependiente y necesita ayuda para las actividades básicas de la vida diaria
- Captación metabólica en la PET (SUVs).
- Tipo de resección quirúrgica y abordaje.

3.3 Obtención de muestras y procesamiento

Una vez que se obtenía la pieza anatómica, se preparaban las muestras objeto de estudio: muestras de tejido tumoral (TT), tejido adyacente al tumor (TAT) y tejido distante no tumoral (TDNT). Para la preparación, se procedía a la sección longitudinal del tumor, por su parte más consistente y voluminosa a la palpación. Este procedimiento era llevado a cabo dentro de los primeros quince minutos una vez resecado el tumor, evitando en la medida de lo posible, las zonas de necrosis.



FIGURA 13 Pieza quirúrgica de lóbulo superior izquierdo resecao por infiltración tumoral de adenocarcinoma (T1aN0M0). *Imagen de autor.*

Posteriormente con bisturí frío y por corte directo, se seccionaban dos rectángulos de, un peso aproximado de 100 mg. Mitad de la pieza extraída era conservada en solución PBS (buffer fosfato salino) e inmediatamente analizada por citometría de flujo (CF). La otra mitad de la pieza era conservada con formalina tamponada y fijada en parafina (ver preparación de las muestras para estudio histológico más adelante). Todas las muestras tenían su muestra apareada de TAT y TDNT. Debido a que los cambios moleculares pre-tumorales pueden ocurrir en la zona de TAT, se tomaron muestras de la periferia del tumor. Las muestras de TDNT fueron evaluadas meticulosamente para garantizar la ausencia de células tumorales.

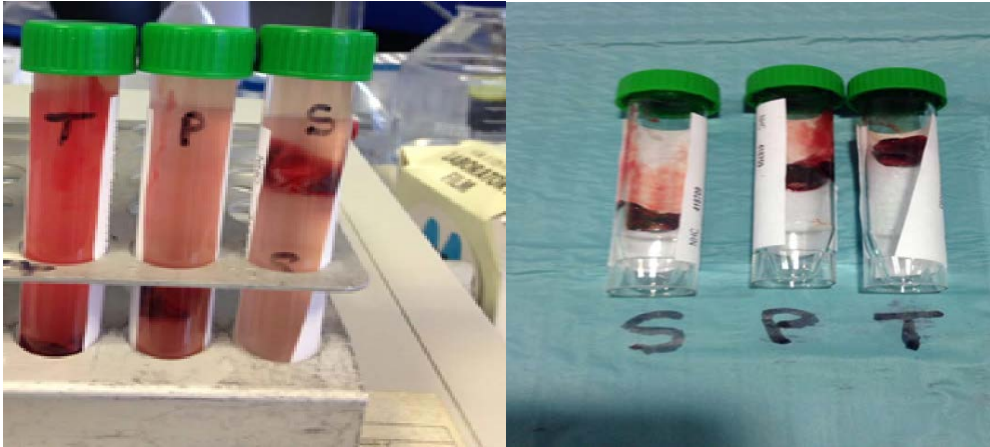


FIGURA 14: Muestras de tejido Tumoral (T), tejido adyacente al tumor (P) y tejido distante no tumoral (TDNT). *Imagen de autor.*

Las muestras fueron analizadas por un patólogo de referencia y siempre el mismo. Además de confirmar el diagnóstico de CP mediante tinción de hematoxilina-eosina y de realizar el estudio sistemático de un proceso tumoral, se cuantificó la infiltración celular, seleccionando sólo las muestras con un contenido celular superior o igual al 50%. Aquellas que no cumplieran este requisito, eran excluidas. Las muestras de TDNT fueron analizadas para descartar la presencia de células tumorales.

Se seleccionaron 32 controles sanos con una edad de entre 50 y 80 años. De ellos se obtuvo sangre periférica (SP), que se comparó con la de los casos. Esta era obtenida por la mañana con un período de ayuno, de al menos 10 horas. Se procedió a su centrifugación, conservando la muestras de plasma obtenidas, a una temperatura de -20°C. El resto de la muestra se marcó con los anticuerpos para el posterior análisis con citometría de flujo. En este tipo de muestras se comparó la infiltración celular de células B, T y Células NK en sangre periférica de los controles con las muestras de sangre periférica de pacientes con CP.

El estadio tumoral (TNM) se determinó tras la evaluación de las muestras resecadas según la 7ª edición TNM para el CP de la Asociación Internacional para el estudio en estadificación de CP 2009 (28).

Las características clínicas, demográficas e histológicas con respecto al tumor se muestran en la sección correspondiente a resultados.

3.4 Análisis de citometría de flujo

Los análisis de citometría de flujo (CF) fueron realizados en las muestras de TT, TAT y TDNT mediante el siguiente procedimiento:

- 1) Lavado de la muestra con PBS.

- 2) Paso de la muestra a tubos de procesamiento MACSTM (miltenybiotec) y disgregación de la muestra con disociador Gentle MACS. Cada muestra era lavada y procesada en dos ocasiones.
- 3) Filtrado de la muestra con tubos Falcon (Falcon BD Bioscience, San José, USA)
- 4) Centrifugación de la muestra durante 5 minutos a 2000 rpm.
- 5) Eliminación del sobrenadante y resuspensión del pellet en unos 100 μ l de PBS.
- 6) Adición de 20 μ l de las diferentes muestras TT, TAT y TDNT a los anticuerpos específicos ya preparados.
- 7) Incubación a temperatura ambiente durante unos 20 minutos.
- 8) Adición de 1ml de tampón de lisis (Pharmlyse, BD) para la eliminación de los hematíes.
- 9) Análisis por citometría de flujo (Becton Dickinson FACS Canto™ II) usando el software FACSDiva.

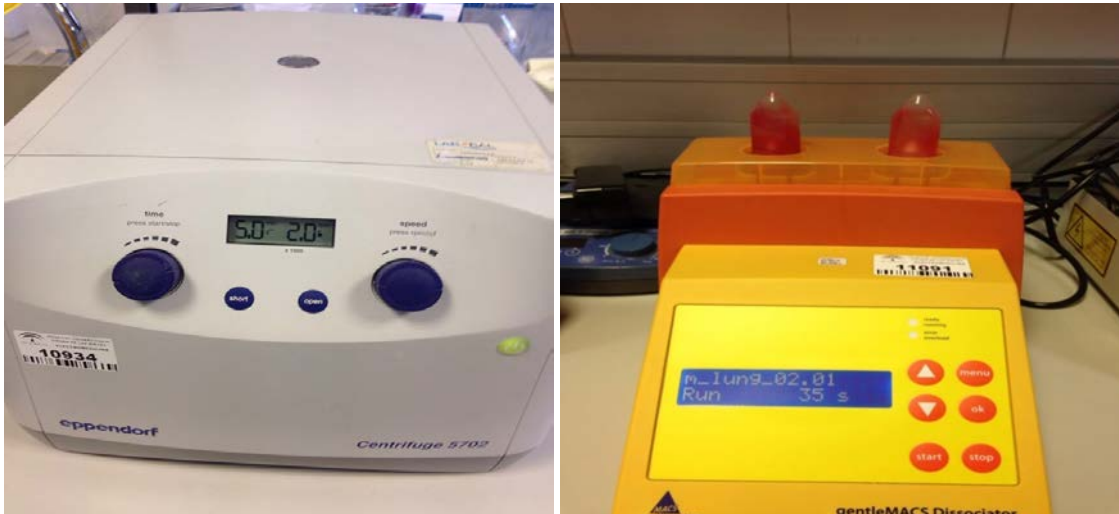


FIGURA 15: Centrifuga y disociador donde se realizaba el procesamiento de las muestras. *Imagen de autor.*

Los anticuerpos monoclonales específicos utilizados para identificar las diferentes subpoblaciones con sus respectivos fluorocromos fueron los siguientes: anti- CD57-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-Percp, anti CD8-APC H7, anti-CD45RO-Pecy7, anti HLA-DR-APC, anti-CD3-Pacific Blue (V450), Human regulatory T cell cocktail (anti-CD4-FITC/anti-CD25-Pecy7/anti-CD127-APC), anti-CD20-PE, anti-CD20-FITC, anti-CD20-Pacific Blue (V450), Simultest™ (anti-CD3-FITC/CD56+CD16-PE), anti-CD183/PercpCy5 (CXCR3), anti-CD196/PE (CCR6), anti-CD56-PE, antiCD16-Percp, anti-CD45-Amcyam (V500), anti-EPCAM-Percp, anti-CD64-FITC, anti-CD11b-PE, anti-CD161-APC and anti-CD33-Percp (BD Bioscience, San José, California, USA). Para cada una de las muestras (TT, TAT, TDNT y SP) se usaron 5 μ l de cada uno de los monoclonales, a excepción de anti-CD3-

Pacific Blue (V450), anti-HLA-ABC-APC, cóctel CD4-FITC/CD25-Pecy7/CD127-APC, de los cuales se usó aproximadamente 2.5 µl. Para los análisis multiparamétricos, un mínimo de 4000 eventos para las muestras de tejido pulmonar y un mínimo de 30.000 para las muestras de SP de la subpoblación linfocítica fueron recogidas construyendo una ventana de análisis (CD45+ versus SSClow) usando el Software BD FACSDiva v.8.01 (BD) y un analizador FACS Canto™ II.

Los datos generados por el citómetro de flujo fueron fundamentalmente diagramas de puntos (dot-plot) bidimensionales. Las distintas poblaciones celulares fueron identificadas a través de la introducción de ventanas de análisis (gate) secuenciales tomando datos tanto del porcentaje de células positivas como de la intensidad media de fluorescencia de la población. Para el análisis de las poblaciones celulares linfocitarias se estableció una primera ventana de CD45+/ SSC. Sobre esta ventana de análisis se realizó el cálculo de las proporciones de linfocitos T CD4⁺, TCD8⁺ y B y NK. Una ventana de análisis adicional se realizó sobre CD4⁺ y CD8⁺ con el objeto de caracterizar las distintas subpoblaciones analizadas en este estudio. De esta manera el resto de subpoblaciones se refieren como un porcentaje sobre la totalidad de células CD4⁺ o CD8⁺ respectivamente. La subpoblación memoria fueron definidas por la expresión brillante de CD45^{RO}⁺ tanto en células T CD4⁺ como T CD8⁺. La subpoblación de células T regs caracterizada por CD127^{low} CD25^{bright} CD4⁺ se calculó también como el porcentaje total de células CD4⁺. Otras subpoblaciones de células T CD4⁺ y CD8⁺ también fueron analizadas: CD4⁺ CD39⁺, CD8⁺ CD39⁺, CD8⁺ CD57⁺. Finalmente, se analizó la presencia de células maduras NK de fenotipo CD56⁺ CD16⁺, y subpoblaciones. Las células NK se analizaron a partir de la ventana de análisis CD45/SSC low, eliminando las poblaciones de células CD20+ (Linfocitos B) y CD3+ (linfocitos T). De esta manera se identificaron varias subpoblaciones de células NK: CD56^{bright} CD16⁻ (células de alta capacidad de producción de citoquinas); CD56⁺/CD16⁺ (células de alta capacidad citotóxica y baja producción de citoquinas) y otras poblaciones de NK de fenotipo inmaduro CD56⁻ CD16⁺.

De forma similar a las células T reguladoras, fueron definidas las subpoblaciones linfocitarias Th1 y Th17, expresándose los datos también como una proporción sobre el total de células T CD4⁺. La subpoblación de Th1 fue caracterizada como (CXCR3⁺CCR6⁻CD4⁺) y Th17 como (CXCR3⁺CCR6⁺CD4⁺). Los datos de Th1 y Th17 sólo fueron obtenidos de 14 pacientes. La presencia de células B (CD20⁺) y granulocitos (CD11b⁺ CD16⁺) también fue investigada.

El porcentaje de infiltración de linfocitos en cada muestra se obtuvo comparando el número de células en la ventana de análisis CD45+/SSC low respecto a la cantidad total de células adquiridas en el citómetro. Estos datos se utilizaron para analizar la relación entre el infiltrado inflamatorio y las características clínico-patológicas.

3.5 Estudio histológico

De cada muestra extraída (TT, TAT y TDNT), la mitad de cada una (ver más arriba obtención de muestras) se seleccionó para estudio histológico, y se realizó el siguiente procedimiento:

1. Fijación de la muestra en formol tamponado al 4%
2. Tallado de la misma
3. Inclusión de la totalidad del fragmento en parafina utilizando un procesador automático de tejidos (Thermo Scientific modelo Excelsior AS)
4. Confección de los bloques de parafina (Dispensador de parafina, Thermo Scientific modelo Histostar).
5. Obtención de secciones (Mitrotomo Thermo Scientific modelo Microm HM 355S) a partir del bloque de parafina de 2 ó 3 micras de grosor y montaje de las mismas sobre portas previamente tratados.
6. Tinción de hematoxilina-eosina de control (Teñidora Thermo Scientific modelo Geminis AS)
7. Deshidratación y aclarado de las muestras
8. Montaje (Montadora de portas, Thermo Scientific modelo Clearuve)
9. Examen histológico por un patólogo para establecer la presencia de neoplasia en la muestra, así como determinación en tanto por ciento, de la superficie de la sección afectada por el tumor.

3.6 Estudio inmunohistoquímico

1. Se fijaron las preparaciones en una estufa con el objetivo de conseguir más adherencia del corte histológico al porta y evitar el desprendimiento en las sucesivas manipulaciones.
2. Desenmascaramiento antigénico, en PT module (Thermo Scientific Modelo Lab vision PT Module) a 97°C.
3. Procedimiento inmunohistoquímico en inmunoteñidor (Thermo scientific). Modelo Lab vision Autostainer 480S, utilizando el sistema de visualización (Master Polymer plus Detection System Ref: MAD-000237-QK, Lote: 210116), compuesto por:
 - Bloqueante de la peroxidasa endógena

- Amplificador
- Anticuerpo primario (ver más adelante)
- Cromógeno o DAB
- Potenciador

4. Contra-tinción con hematoxilina de Mayer (Ref: MAD-108.1000 Lote: HDH 3013)

6. Deshidratación, aclarado

7. Montaje (Montadora de portas, Thermo Scientific modelo Clearuve)

Anticuerpos primarios.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales prediluidos para identificar las diferentes subpoblaciones linfoides CD45: Ref MAD-002066QD, batch:0108-01; CD20: Ref MAD-002037QD, batch 0267-10, clone L26; CD3: Ref MAD00621QD, batch: 0117-02, clone EP41; CD4: Ref: MAD-00600QD, batch:0107-02-10, clone EP 204; CD8: Ref MAD-000618QD, batch 0183-11, clone SP16; CD68: Ref MAD-002097QD, batch 0175-07.

La infiltración linfocítica fue evaluada por un patólogo de forma semicuantitativa en tres localizaciones distintas: (a) infiltrado dentro de los nidos tumorales, (b) infiltrado distribuido en el estroma del tumor e (c) infiltrado presente a lo largo del margen invasivo (interfaz tumor-huésped).

El número de células teñidas para cada anticuerpo se valoró de forma semicuantitativa como: 1+ (mínimo - células teñidas prácticamente ausentes), 2+ (infiltrado leve), 3+ (moderado), 4+ (intenso) descartando áreas de necrosis.

CD45	Ref MAD-002066QD, batch:0108-01
CD3	Ref MAD00621QD, batch: 0117-02
CD4	Ref: MAD-00600QD, batch:0107-02-10
CD8	Ref MAD-000618QD, batch 0183-11
CD20	Ref MAD-002037QD, batch 0267-10
CD68	Ref MAD-002097QD, batch 0175-07

FIGURA 16: Anticuerpos monoclonales utilizados.

3.7 Análisis estadístico

Una vez realizado el trabajo de laboratorio, se procedió a introducir la información recogida en soporte informático. El programa utilizado para realizar el tratamiento estadístico de los datos fue el programa estadístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) en su versión 20.0. (IBM, Chicago IL).

En el tratamiento de la información obtenida se han utilizado diversos métodos estadísticos:

En primer lugar se ha llevado a cabo un análisis descriptivo obteniéndose la distribución de frecuencias y porcentajes de todas y cada una de las variables cualitativas analizadas, así como la correspondiente estadística descriptiva (medidas de tendencia central y de dispersión) de las variables cuantitativas incluidas en el estudio (Análisis univariante o univariado) .

Posteriormente se ha realizado el Análisis Inferencial, donde los métodos utilizados dependen de que se trate de un análisis de asociación entre las variables cualitativas entre sí, en cuyo caso se aplica el método de Tablas de contingencia donde se realiza el **Test Chi-Cuadrado(χ^2)** (140), o bien, el **Test exacto de Fisher** cuando no se cumplen las condiciones de validez para aplicar el Test Chi Cuadrado para Tablas rxs y Tablas 2x2. En este caso, se calcularon las medidas de asociación riesgo relativo y odd's ratio (o razón del producto cruzado), con el fin de analizar si existía asociación o relación estadísticamente significativa, entre las variables cualitativas o las que se han convertido a categóricas, y en caso de existir esa asociación estudiar la fuerza de la misma.

Para las variables cuantitativas se han realizado en primer lugar los test de normalidad de **Shapiro Wilk** y/o **Kolmogorov-Smirnov** para comprobar si las mismas se comportan o no según el modelo de distribución normal. En función de estos resultados, para comparar los distintos grupos de estudio, se han utilizado las pruebas paramétricas o no paramétricas adecuadas en función de la naturaleza de las variables (Normales o no normales) controladas y se han aplicado los procedimientos y técnicas de análisis oportunas.

En el caso de que se compararan se ha utilizado el **Test de Student o Welch** para dos muestras independientes, si se trataban de variables normales o el **Test de Wilcoxon y Mann-Whitney** en caso de no normalidad. Análogamente si tenemos dos muestras relacionadas o apareadas se ha utilizado el **Test de Student** para muestras apareadas o bien el **Test no paramétrico de Wilcoxon** cuando no. Para la comparación de más de dos grupos se ha utilizado la técnica de **Análisis de la Varianza (ANOVA)** o bien si no se cumple la normalidad el **Test no paramétrico de Kruskal-Wallis**. En caso de significación se realizaron las correspondientes comparaciones múltiples aplicando los **Métodos de Bonferroni**, si los tamaños muestrales son distintos, o **Tukey** si son iguales. En el caso de varias muestras apareadas, como ha sido en la mayoría de nuestra investigación, en la que se han comparado las diversas subpoblaciones linfocitarias en muestras de tejido tumoral, tejido adyacente al tumor, tejido sano y sangre periférica, se ha aplicado previa comprobación de las condiciones de validez, el

Modelo Lineal General para medidas repetidas y en caso de no normalidad el **Test de Friedman no paramétrico** con sus correspondientes comparaciones múltiples.

Para estudiar la fuerza de asociación posible entre dos variables cuantitativas fueron calculados los **Coefficientes de correlación de Pearson** o bien los **no paramétricos de Spearman**, con sus correspondientes significaciones.

Inmersos en la actual “era” de la Medicina Basada en la Evidencia (MBE), resulta útil aplicar modelos multivariantes (Análisis multivariante) para intentar explicar un fenómeno o para hacer predicciones. En general, la aplicación de una técnica de análisis multivariante significa que se tienen en cuenta simultáneamente muchas variables en el análisis de los datos.

En función de los resultados obtenidos en el análisis bivariante previo, la construcción de un modelo logístico se efectuó, por un lado, siguiendo el método “Introducir”, que permite al investigador tomar el mando y decidir qué variables se introducen o extraen del modelo; y, por otro lado, con procedimientos automáticos “Adelante” y “Atrás”, basados en la prueba de la razón de verosimilitud (RV), que deja que el programa, o bien, vaya introduciendo variables en el modelo paso a paso empezando por aquellas que tienen más importancia a la hora de predecir la variable dependiente, es decir coeficientes de regresión con mayor significación y por tanto menor valor p , de modo que en cada paso reevalúa los coeficientes y su significación, eliminando finalmente del modelo aquellas variables que no considera estadísticamente significativas - “Método Ascendente o Adelante”-; o bien, partiendo de un modelo con todas las covariables que se han seleccionado, el programa vaya eliminando del modelo aquellas sin significación -“Método Descendente o Atrás”-.

Resulta importante indicar que el nivel de significación estadística (error) asumido por el investigador ha sido el 5% (se considera un resultado significativo cuando el nivel de significación estadística $p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de la muestra

Se incluyeron un total de 61 pacientes con NSCLC. La edad media en el momento del diagnóstico del cáncer fue de 66 años. El rango de intervalo se sitúa entre los 45 y los 82 años

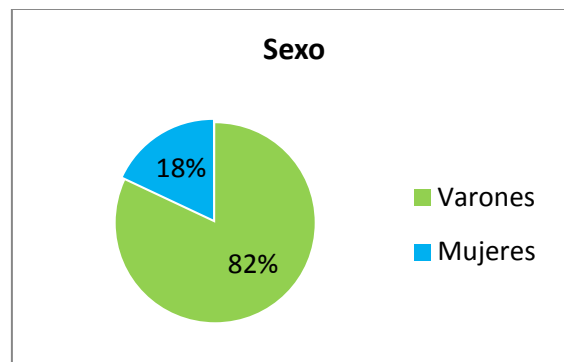


FIGURA 17: Distribución de los pacientes con NSCLC por sexo

La mayor parte de los pacientes eran varones, fumadores activos o exfumadores con una media de consumo tabáquico paquetes/año (ICAT) de 55.

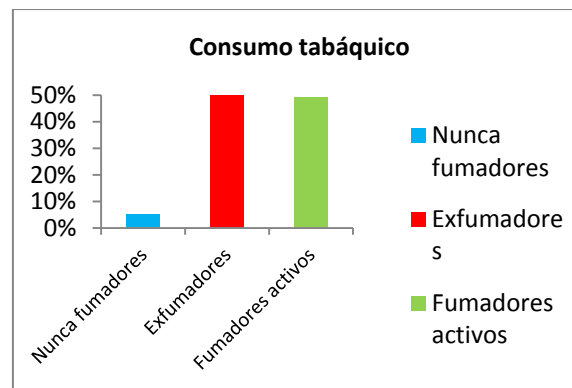


FIGURA 18: Distribución de los pacientes con NSCLC según hábito tabáquico

La estirpe histológica predominante fue la de carcinoma epidermoide 32 casos (54%), seguido del adenocarcinoma 23 casos (36,1%) y metástasis de otro tipo de tumor 6 casos (10%). En cuanto al grado de diferenciación, estos presentaban diferenciación moderada 27 casos (43%), buena 11 casos (17,4%)y pobre 15 casos (24,6%).

Gran parte de los tumores resecaados se encontraban en un estadio tumoral inicial según la 7ª edición TNM para el CP: estadio IA 21 casos (36%), IB 18 casos (28%), IIA 13 casos (21,3%), IIB 7 casos (11,5%), IIIA 2 casos (3,3%).

En su gran mayoría los pacientes se encontraban asintomáticos, en el momento del diagnóstico del proceso tumoral, o poco sintomáticos (ECOG 0: 23 pacientes, ECOG I: 33 pacientes, ECOG II: 8 pacientes y ECOG III: 1 pacientes, ECOG IV: 2 pacientes).

De los 61 pacientes, 19 tenían antecedentes de otro tipo de tumor, predominando el carcinoma de laringe, y en sólo 3 de ellos tenía antecedente de un tumor de origen pulmonar. Los antecedentes personales de tumor se observaron con mayor frecuencia en el grupo de hombres (80%).

La media de captación metabólica en la PET fue de 9.52 SUV (rango 0-26.2). En cuanto al tamaño tumoral la media se encontraba en 3,80 cm (rango 0,5-9,5).

Entre las comorbilidades asociadas, la más frecuente fue la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) presente en la mitad de la muestra (31 pacientes), siendo la hipertensión arterial la siguiente en frecuencia.

En cuanto a los controles se seleccionaron 32 sujetos sin neoplasia conocida ni antecedentes de otro tipo de cáncer, de los cuales se obtuvo sangre periférica en un control rutinario en el Hospital Virgen de las Nieves, comparándose con la sangre de pacientes con CP. La edad media de los controles fue de 62 años, con un rango de intervalo entre los 49 y los 84 años siendo la mayor parte de ellos nunca fumadores.

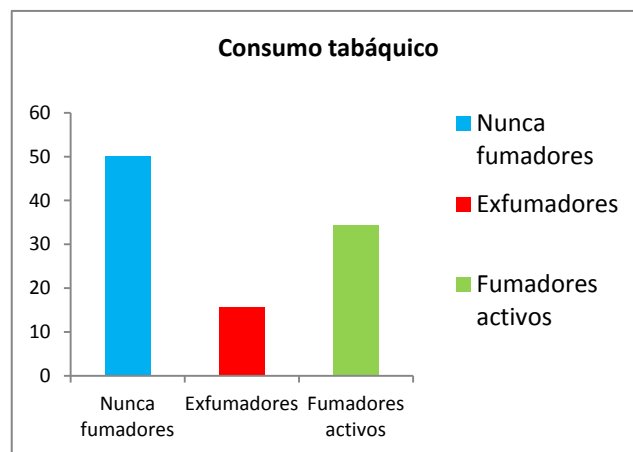


Figura 19: Distribución de los controles según hábito tabáquico

En la siguiente tabla se resumen las variables descriptoras de la muestra en ambos grupos de sujetos.

TABLA 1: Características de los pacientes

Variable	NSCLC n= 61	Sujetos sanos n= 32
Sexo n (%):		
Mujer	11 (18)	13 (40.6)
Varones	50 (82)	19 (59.4)
Edad, años, media (rango)	66 (45-82)	62 (49-84)
Historia tabáquica:		
Nunca fumadores	3 (5)	16 (50)
Exfumadores	28 (46)	5 (15.6)
Fumadores	30 (49)	15 (34.4)
Media paquetes- año (ICAT)	55 (0-120)	7,78(0-40)
Tamaño tumor, media(rango)	3.80 (0.5-9.5)	
Tipo histológico NSCLC:		
Adenocarcinoma pulmón	23 (36.1)	
Carcinoma epidermoide	32 (53,9)	
Metastasis de otro tipo de cáncer	6 (10)	
Estadio tumoral:		
Estadio IA	21 (36)	
Estadio IB	18 (28)	
Estadio IIA	13 (21.3)	
Estadio IIB	7 (11.5)	
Estadio IIIA	2 (3.3)	
Descriptor T:		
T1a	13 (20)	
T1b	10 (16)	
T2a	18 (29.5)	
T2b	11 (19)	
T3	8 (13.9)	
T4	1 (1.6)	
Descriptor N:		
Nx	4 (6.6)	
N0	45 (73.8)	
N1	6 (9.8)	
N2	6 (9.8)	
Grado de diferenciación:		
Moderado	27 (43)	
Bueno	11 (17.4)	
Pobre	15 (24.6)	
SUVs PET, media (rango)	9.52 (0-26.2)	

4.2 Análisis de las subpoblaciones linfocitarias en muestras de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica de los 61 pacientes con diagnóstico de NSCLC se comparó con la sangre de los 32 controles sin antecedente de tumor.

Se encontraron diferencias significativas entre pacientes con diagnóstico de NSCLC y controles para las subpoblación de células NK, células B y células T. En las muestras de sangre de pacientes con NSCLC se encontró una mayor proporción de **células NK** en porcentaje (30,9 vs 18,2 respectivamente $p < 0,001$) respectivamente y en número absoluto (887,2 y 465,7 células/ μl $p < 0,009$).

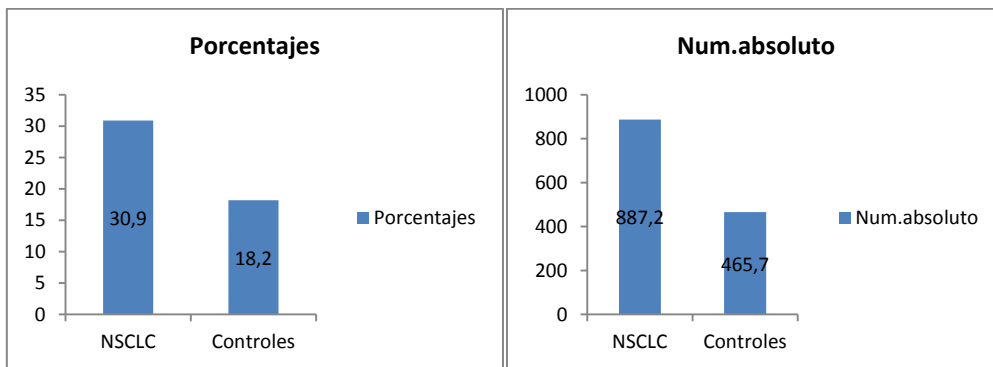


FIGURA 20: Número absoluto y porcentaje de células NK en ambos grupos.

Por el contrario se encontró un mayor porcentaje de **células B** en la sangre de pacientes sanos con respecto a los pacientes con NSCLC (8,3 vs 4,2 respectivamente $p < 0,001$) y en número absoluto (196,8 vs 128,3 $p < 0,02$).

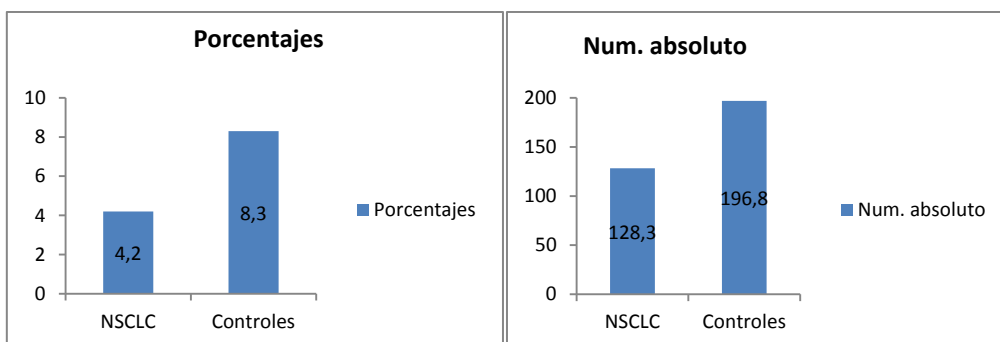


FIGURA 21: Número absoluto y porcentaje de células B en ambos grupos.

En cuanto a las células T se encontraron diferencias significativas en el porcentaje absoluto de células T CD4⁺ pero no en el de células T CD8⁺ ($p = 0,634$). La sangre de

pacientes con NSCLC mostró un mayor porcentaje de las siguientes subpoblaciones con respecto a los controles: CD4⁺ CD45RO⁺ 72,7 vs. 63,1 ($p < 0,006$), CD8⁺ CD45RO⁺ 41,64 vs. 33,90 ($p < 0,02$), CD4⁺ DR⁺ 7,7 vs. 3,9 ($p < 0,001$), CD8⁺ DR⁺ 9,9 vs. 6,3 ($p < 0,001$) y CD4⁺ células T reguladoras (Tregs)(CD127^{low} CD25^{bright}) 6,9 vs. 5,9 ($p < 0,02$). Se encontró una correlación positiva entre los porcentajes de las subpoblaciones CD4+ DR+, CD8+ DR+, CD8+ CD45RO+, CD4+ CD39+, CD8+ CD39+ y CD4+ Tregs en las muestras de TT y los porcentajes encontrados en las muestras de SP. Por lo tanto, un incremento en el porcentaje de CD4+ DR+ en las muestras de TT se acompañaba de un incremento del porcentaje de CD4+ DR+ en SP (Ver más adelante).

4.3. Análisis de la subpoblaciones en pacientes con NSCLC

De los 61 pacientes con NSCLC resecaado, se encontraron diferencias significativas en el infiltrado inmunológico entre las diferentes muestras de tejido (TT, TAT, TDNT) entre pacientes.

El porcentaje de células T CD3⁺ y células T CD20⁺ fue mayor en las muestras de TT que en las de TAT y TDNT. Las diferencias en porcentaje en las muestras de TT y a de TAT fueron significativas entre ambas subpoblaciones ($p < 0.001$)

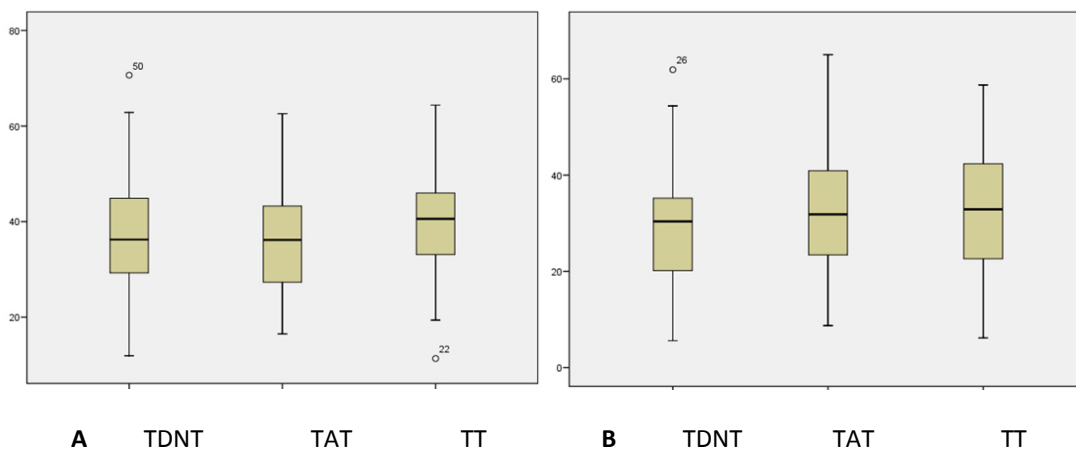


FIGURA 22: A) Porcentaje de CD4⁺ y B) Porcentaje de CD8⁺ en cada una de las muestras TDNT, TAT y TT.

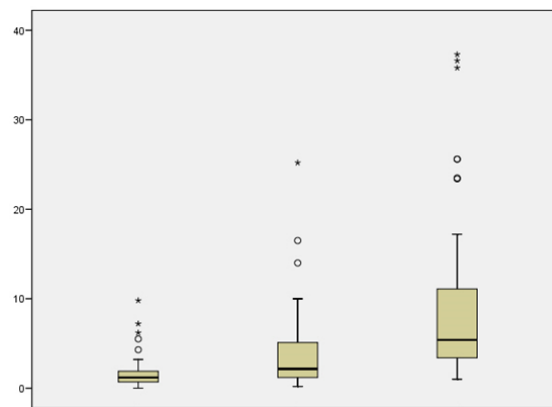
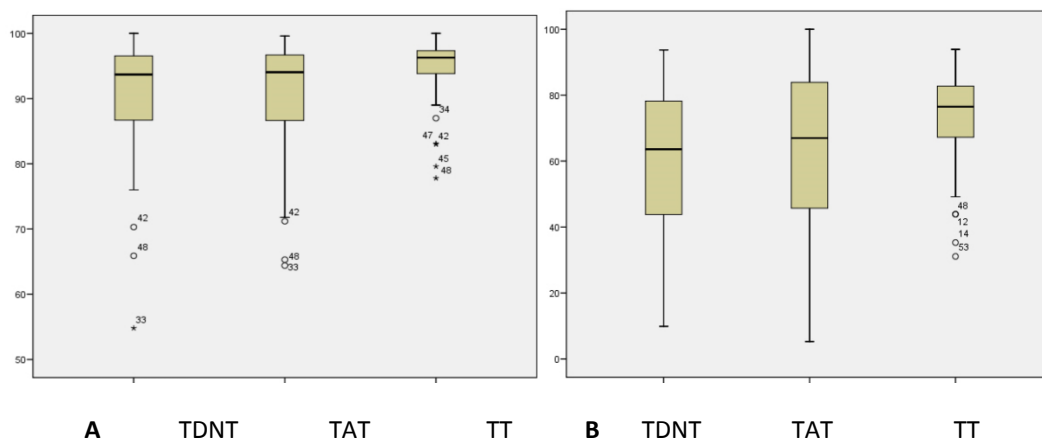


FIGURA 23: Porcentaje de **CD20⁺** en cada una de las muestras TDNT, TAT y TT.

La mayoría de las células T: **CD4⁺** y **CD8⁺** tenía un fenotipo efector –memoria. Sin embargo se observaron diferencias significativas en el porcentaje de estas células entre las diferentes muestras. Las células T memoria (**CD4⁺ 45RO⁺ CD8⁺ CD45RO⁺**) y las células T regs (**CD4⁺ CD25^{bright} CD127^{dim}**) predominaban en las muestras de TT con respecto a las muestras de TAT y TDNT. El recuento de **CD4⁺ 45RO⁺** (94,05) difiere significativamente ($p < 0,008$) del encontrado en el TAT (89,4) y en TDNT (89,1). El recuento de **CD8⁺ CD45RO⁺** también fué significativamente mayor en la muestra de TT (73,5) ($p < 0,002$) con respecto a TAT (64,9) y TDNT (61,8). La caracterización funcional de estas células demuestra, que las células T expresaban predominantemente el fenotipo TH1 y TH17 en las muestras de tejido tumoral. Además se demostró una correlación positiva entre el porcentaje de granulocitos y las células Th17 en la muestra de TT ($p < 0,05$)

**FIGURA 24: A)** Porcentaje de **CD4⁺ 45RO⁺** y **B)** Porcentaje de **CD8⁺ 45RO⁺** en cada una de las muestras TDNT, TAT, TT.

El porcentaje de células **CD4⁺ DR⁺** se encontraba incrementado en las muestras de TT pero no se encontraron diferencias significativas con el porcentaje observado en las muestras de TAT. El porcentaje de células **CD8⁺ DR⁺** fue significativamente mayor en la muestra de TT (30,9) que las de TAT (22,10) y TDNT (18,58) ($p < 0.001$). En las muestras de TT los porcentajes de células **CD4⁺ DR⁺** y **CD8⁺ DR⁺** se correlacionaron de forma inversa con el porcentaje de células B **CD20⁺** ($p < 0,01$). Estos resultados indican que a mayor porcentaje de **CD4⁺ DR⁺** y **CD8⁺ DR⁺**, menor era la infiltración de **CD 20⁺** en la muestra tumoral.

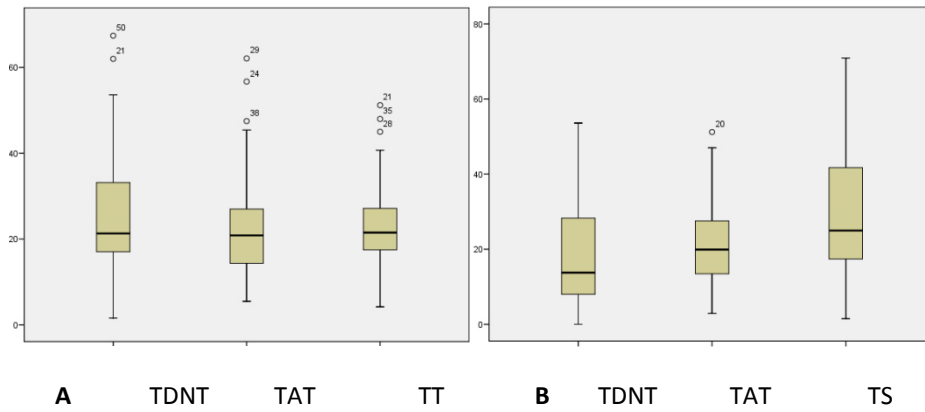


FIGURA 25: A) Porcentaje de $CD4^+ DR^+$ y **B)** $CD8^+ DR^+$ en cada una de las muestras TDNT, TAT y TT.

El porcentaje de células T regs fue significativamente mayor ($p < 0.001$) en la muestras de TT (17,5) que en la muestra de TAT (12,5) o TDNT (7,1).

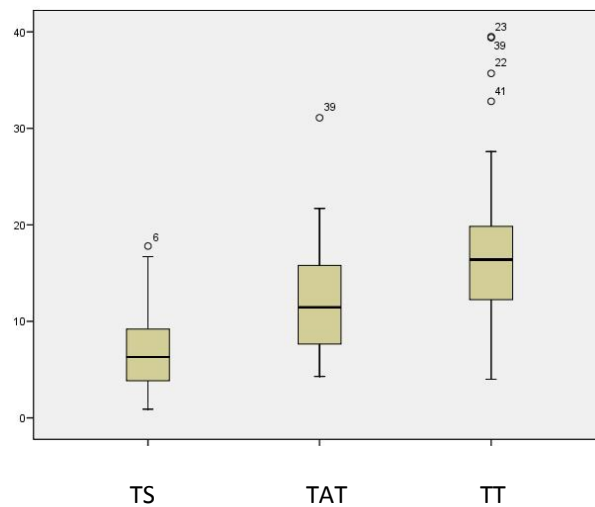


FIGURA 26: Porcentaje de $CD4^+ T$ regs en cada una de las muestras de TDNT, TAT y TT.

CD39 es una proteína de membrana integral con dos dominios transmembranarios, y existe como homotetrámero. Se trata del ectoenzima más destacado del sistema inmunitario, siendo capaz de eliminar eficazmente el ATP extracelular tóxico convirtiéndolo a ADP o AMP. La expresión del CD39 se identificó originalmente en linfocitos activados. Pero también en linfocitos T, linfocitos B y células dendríticas; así como en la tinción débil en monocitos y granulocitos.

En nuestras muestras el porcentaje de $CD4^+ CD39^+$ fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en la muestra de TT (25,4) que en en las de TAT y TDNT e igualmente para $CD8^+ CD39^+$ donde el porcentaje también fue significativamente mayor ($p < 0,02$) en las muestras de TT (25,7) que en las de TAT y TDNT.

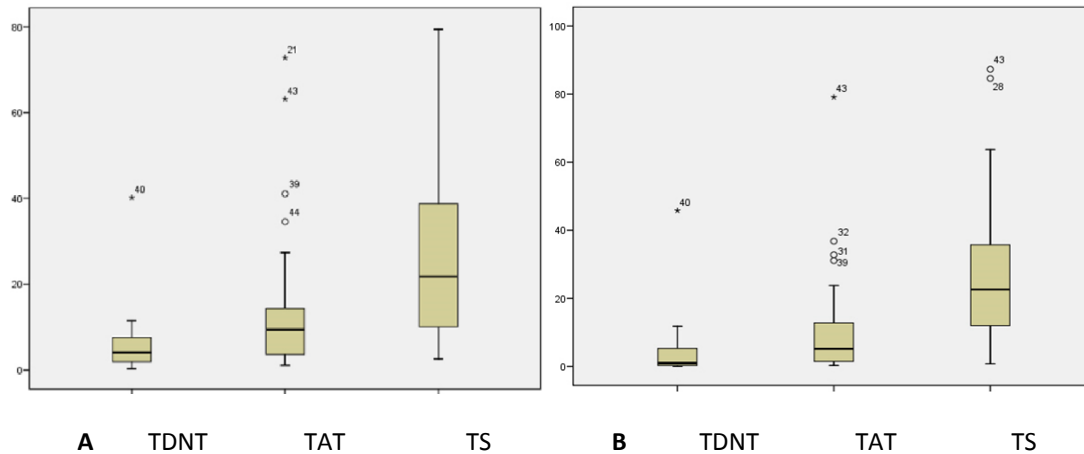


FIGURA 27: A) Porcentaje de $CD4^+ CD39^+$ y **B)** Porcentaje de $CD8^+ CD39^+$ en cada una de las muestras de TDNT, TAT y TT.

Un elevado porcentaje de células $CD8^+ CD57^+$ completamente diferenciadas se observó sobre la totalidad de las células T $CD8^+$ ($CD57$ es una marcador de senescencia de las células T). A diferencia de lo encontrado para $CD39^+$, el porcentaje de células T $CD8^+ CD57^+$ fue significativamente mayor ($p < 0,01$) en la muestra de TDNT (17,24) que en el TT (11,2).

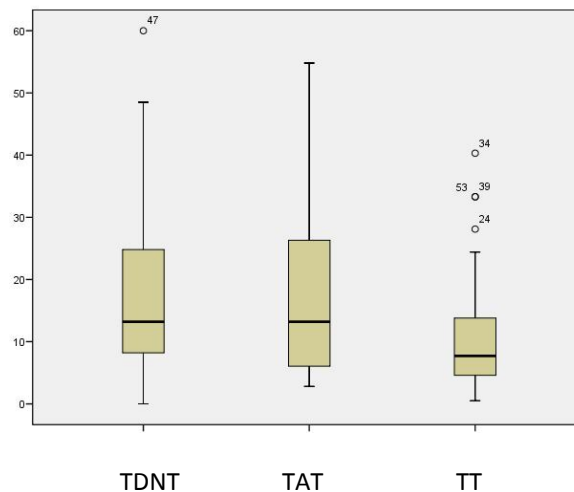


FIGURA 28: Porcentaje de $CD8^+ CD57^+$ en muestras de TDNT, TAT, TT.

El equilibrio entre las $CD8^+/T$ regs y $Th1/T$ regs ha demostrado ser importante en los que se refiere a la progresión tumoral y pronóstico en determinados estudios sobre

cáncer. La relación CD8/T regs fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en muestras de TDNT (17,8) que en la muestra de TT (7,9), esto puede ser atribuido a la diferencias entre la proporción de células Tregs y células T memoria entre los tejidos de las distintas muestras. La relación Th1/T regs fue mayor en la muestra de TDNT (8,12) que en la de TAT (4,74) o TT (3,36), existiendo unicamente diferencias significativas entre las muestras de TT y el TAT ($p < 0,006$).

Las células NK se caracterizan por la expresión de CD56⁺ CD16⁺ y la ausencia del marcador CD3. El número de NK se encontró aumentado en la SP y en tejido de los pacientes con CP. El mayor porcentaje observado para estas células se determinó en las muestras de TDNT (19,74). El porcentaje observado para estas células fue significativamente menor ($p < 0,001$) en la muestra de TT (7,39) que en TAT (14,48).

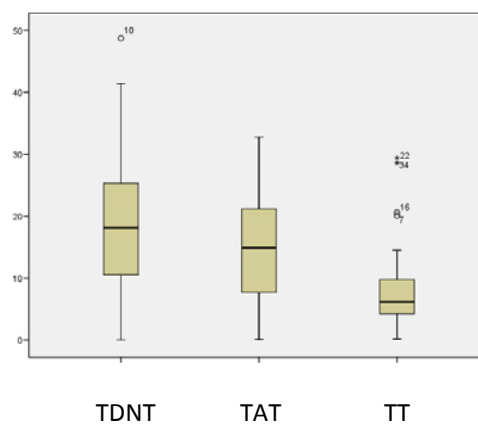


FIGURA 29: Porcentaje de células NK (CD56⁺ CD16⁺) en muestras de TDNT, TAT y TT.

En función de la expresión de CD56 y CD16 encontramos diferentes fenotipos de células NK. El porcentaje de células NK con fenotipo citotóxico (CD56⁺ CD16⁺) fue significativamente menor ($p < 0,001$) en las muestras de TT (22,8) que en el TAT (40,29) o en el TDNT (44,45). Por el contrario, el porcentaje de CD56^{bright} CD16⁻ (células no citotóxicas productoras de citoquinas), fue significativamente mayor ($p < 0,03$) en TT (9,3), que en TAT (4,95; $p < 0,03$) o TDNT (2,00 $p < 0,001$). Finalmente el porcentaje de dobles negativas CD56⁻ CD16⁻ o simple positivas CD56⁻ CD16⁺ con fenotipo inmaduro fue mayor en el TT, sin embargo estas últimas no alcanzaron la significación estadística, lo cual podría ser atribuido al bajo número de muestras.

4.4. Análisis de las subpoblaciones en relación a las características clínico-patológicas

La captación metabólica en la PET (SUVs standardized uptake value) será mayor en aquellos tumores metabólicamente más activos. Encontramos diferencias

significativas en los porcentaje de células $CD4^+ CD39^+$ ($p < 0,03$) y $CD8^+ CD39^+$ ($p < 0,02$) en aquellos tumores con baja captación metabólica $SUV < 4,5$ en relación a aquellos tumores con una captación mayor $SUV > 4,5$.

El porcentaje de $CD4^+ CD39^+$ fue significativamente mayor ($p < 0,01$) en tumores de tamaño inferior a 2 cm que en aquellos tumores con tamaños mayores.

El tipo histológico de tumor más prevalente fue la variante de carcinoma epidermoide (31 casos) seguido del adenocarcinoma (23 casos). Encontramos diferencias significativas en las subpoblaciones, en función de la variante histológica, así el porcentaje de células T $CD3^+$ ($p < 0,04$), $CD8^+$ ($p < 0,03$), $CD8^+ CD45RO^+$ ($p < 0,01$), $CD4^+ DR^+$ ($p < 0,02$), $CD8^+ DR^+$ ($p < 0,05$) y $CD8^+ CD 39^+$ ($p < 0,02$) fue mayor en las muestras de TT en el tipo histológico adenocarcinoma que en la variante epidermoide.

4.5 Localización de las subpoblaciones y valor pronóstico. Análisis de inmunohistoquímica

La localización de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y los macrófagos fue estudiada por técnicas de inmunohistoquímica estableciéndose tres regiones dentro de la muestra tumoral: margenes invasivos (MI), estroma (E), y centro tumoral (CT) en muestras de 42 pacientes. Encontramos una mayor infiltración de las diferentes subpoblaciones linfocitarias y de los macrófagos en los MI y en el estroma que rodea al nido tumoral.

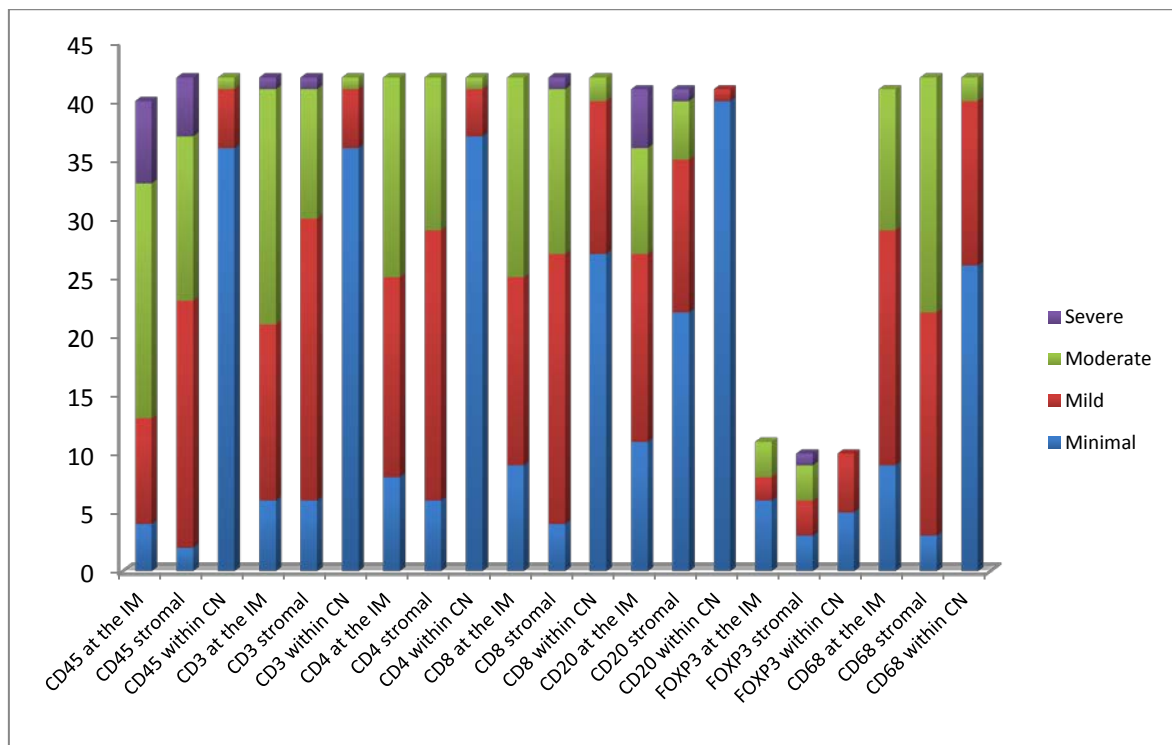


FIGURA 30: Resultados de Inmunohistoquímica para cada una de las subpoblaciones.

El número de células teñidas se cuantificó en una escala del 1 al 4, según lo anteriormente comentado (Ver estudio de inmunohistoquímica- Material y métodos)

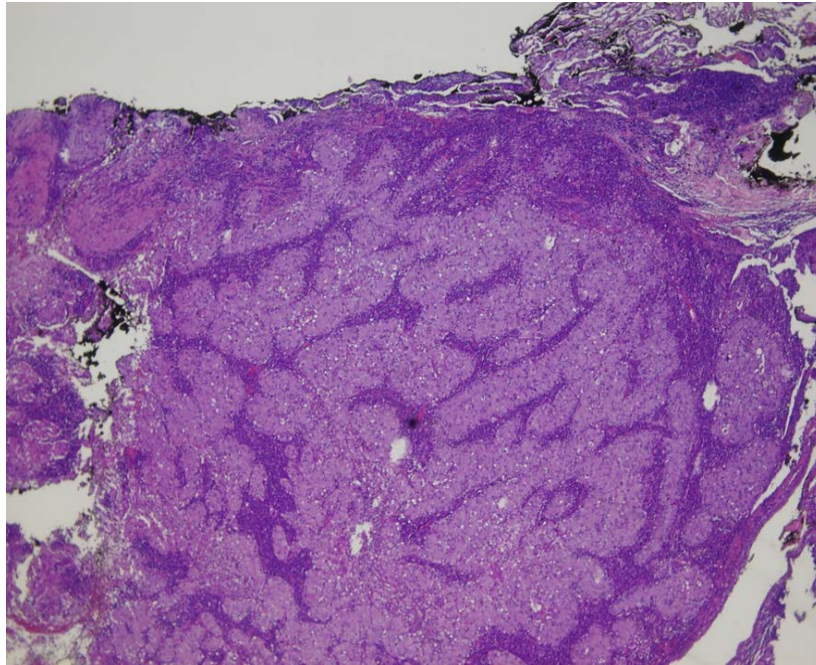
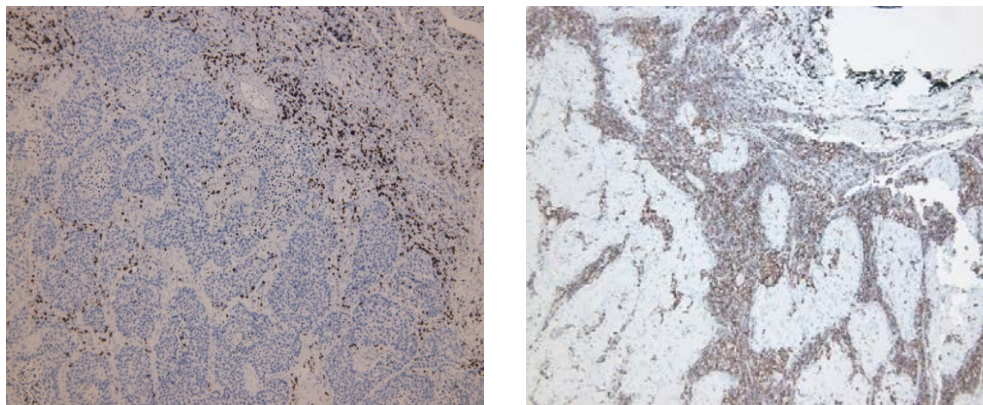


FIGURA 31: Tinción hematoxilina-eosina del estroma y de los márgenes invasivos (Inmunohistoquímica).

Se encontró una infiltración leve (Score 2) en el CT en 15 de los 42 casos. Las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ se observaron preferentemente en el estroma y en los márgenes invasivos (en un porcentaje similar en cada uno de ellos), mostrando una intensidad leve moderada (score 2-3). Se encontró una frecuencia significativa mayor en el CT ($p < 0,05$) de linfocitos T $CD8^+$ (15 casos) que de $CD4^+$ (5 casos).



A

B

FIGURA 32: Infiltración celular de linfocitos T en estroma y MI. **A)** $CD8^+$ y **B)** $CD45^+$.

La presencia de las células T regs en las muestras de tejido fueron analizadas según la distribución y el número absoluto de T regs FOXP3⁺. Encontramos un mayor número de células T regs en el E y en CT que en los correspondientes MI. En el 50% casos estudiados, estas células también se encontraron en el CT, pero con una intensidad leve (score 2). Las células B prácticamente eran inexistentes en el CT y estas se encontraban incrementadas en los MI y en menor medida en el E.

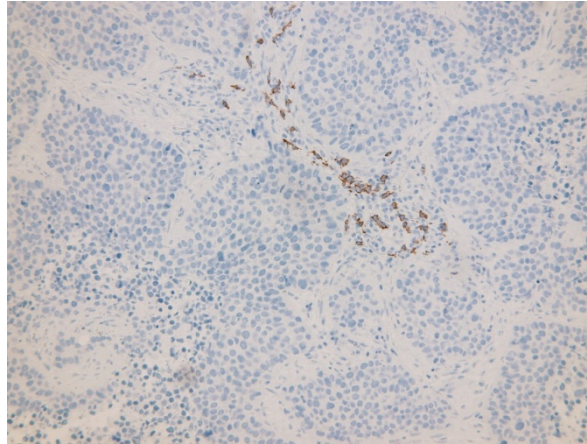


FIGURA 33: Infiltración de linfocitos (CD20⁺) en el estroma.

Finalmente en un pequeño porcentaje de casos se observó infiltración de macrófagos (CD68⁺) en el CT con un intensidad leve (score 2), estos se encontraban fundamentalmente en el E y en mayor medida en los MI, en comparación con otras localizaciones.

Al establecer la asociación entre el tipo y la intensidad de infiltración con las características clínico- patológicas, sólo se encontraron diferencias significativas en relación con el tipo histológico y el grado de diferenciación. Encontramos un mayor porcentaje de linfocitos T en el E de los adenocarcinomas que en el carcinoma epidermoide ($p < 0,03$), esto podría atribuirse a diferencias en la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ ($p < 0,02$).

En cuanto al grado de diferenciación, sólo se encontraron diferencias significativas para la subpoblación de linfocitos T en los MI, la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ fue mayor en los tumores bien diferenciados (69%) que en aquellos pobremente diferenciados (12,5%; $p < 0,05$). La subpoblación de células T CD8⁺ fue mayor en los tumores bien diferenciados (64,3%) que en los pobremente diferenciados (21,4%; $p < 0,04$). También se encontró un mayor porcentaje de células T CD8⁺ en el CT de tumores bien diferenciados ($p < 0,04$).

Un porcentaje elevado de células FoxP3 se observó en los MI de tumores pobremente diferenciados en comparación con los tumores bien diferenciados ($p < 0,01$). Sin

embargo, este porcentaje era mayor en el CT de los tumores bien diferenciados que en aquellos pobremente diferenciados ($p < 0,05$).

Finalmente el porcentaje de macrófagos CD68⁺ fue mayor en los MI de tumores bien diferenciados que en aquellos tumores pobremente diferenciados (70 vs. 23,5% respectivamente).

Discusión

5. DISCUSIÓN

Los casos fueron estudiados en las consultas de Neumología para el diagnóstico de CP en el Área sanitaria de Andalucía oriental. Como casos se incluyeron todos los casos de NSCLC intervenidos en el Hospital Virgen de las Nieves de Granada (61 pacientes) y como controles individuos sin proceso tumoral conocido sometido a un control analítico en dicho Hospital.

Aunque puede que haya existido la pérdida de algún registro, consideramos nuestra muestra como la totalidad de los pacientes intervenidos durante el tiempo en el que se realizó la recogida de datos, y que será útil según el cálculo del tamaño muestral necesario.

Para que la muestra sea representativa debe cumplir cuatro condiciones (141):

1. Que comprenda parte del universo.
2. Que su amplitud sea estadísticamente proporcional a la magnitud del universo.
3. La ausencia de distorsión en la elección de los elementos de la muestra para evitar sesgos.
4. Que sea representativa y reflejo fiel del universo, de tal modo que reproduzca sus características.

En la literatura médica es frecuente encontrarse con un tamaño de muestra insuficiente que obliga a una interpretación cuidadosa y prudente de los resultados. Para este estudio se calculó un tamaño muestral, utilizando los datos del trabajo de Wang et al (142), de 46 pacientes diagnosticados de NSCLC, para garantizar unos resultados representativos y su buena interpretación. Esta cifra se incrementó en un 20% en previsión de posibles abandonos o retiradas del estudio, por tanto, nuestra muestra supera lo recomendado.

Los estudios de casos y controles, de los más utilizados en la investigación clínica, comienzan con la identificación de personas con la enfermedad (u otro tipo de característica) y un grupo adecuado de personas de control con el que poder comparar. Los pacientes de este tipo de estudio pueden acumularse prospectivamente, es decir, que se incorporan al estudio según se van diagnosticando. El investigador selecciona, por separado, los grupos de poblaciones de casos y controles disponibles, lo que lo diferencia de los estudios transversales en los cuales la selección se realiza de una única población.

El grupo control debe estar integrado por individuos que no tienen la enfermedad y, por tanto, deben emplearse procedimientos diagnósticos similares a los utilizados para

los casos. La idea fundamental es la de lograr la mayor similitud entre ambos grupos con relación a los distintos factores de exposición a estudio.

Las ventajas de los estudios de casos y controles:

- Son útiles para estudiar eventos raros
- Permiten el estudio con tamaños muestrales relativamente más pequeños y exigen poco tiempo en su ejecución
- Son relativamente baratos comparados con los estudios de cohortes
- Proporcionan estimadores de Odds ratio.

Los inconvenientes son los siguientes:

- Ineficientes para el estudio de efectos de exposición raros
- No establecen la secuencia de eventos de interés

Una buena recogida de datos es fundamental para alcanzar los objetivos deseados. En nuestro estudio se ha utilizado como principal fuente de datos la Historia Clínica, que ha servido para cumplimentar un cuestionario desarrollado por la propia doctoranda, aspectos de los cuales pasaremos a analizar.

La Historia Clínica tiene como ventaja ser una fuente de datos rápida, sencilla y económica, pero también tiene sus limitaciones, relacionadas con la validez y la calidad de la información. Así, los datos que contienen han sido recogidos por diferentes personas, que han utilizado definiciones y métodos distintos. Por otro lado, las Historias Clínicas y otros registros procedentes de la documentación clínica de los hospitales se mantienen habitualmente con finalidades clínicas o administrativas, no así de investigación, por lo que no suelen estar realizadas con la debida meticulosidad. Son frecuentes los datos incorrectos o ausentes, si un dato no está recogido puede ser debido a que no se exploró o preguntó, a que fuera negativo o ausente o fue positivo pero no se registró o consideró irrelevante en esa ocasión.

Los instrumentos utilizados para la recogida de información fueron elaborados para el propósito del estudio teniendo en cuenta los objetivos y el entorno epidemiológico y sociológico en el que se iba a aplicar.

El cuestionario empleado en el estudio es un proceso estructurado (en todos los protocolos cumplimentados a partir de las historias clínicas, la recogida de información se hace de la misma forma y con la misma secuencia). La finalidad es conseguir información homogénea que pueda ser comparable. Se ha tenido en cuenta la inclusión de datos epidemiológicos de los pacientes, así como variables relacionadas con los factores de riesgo del cáncer de pulmón.

Dicha hoja de recogida de datos está basada en el Protocolo de la Consulta de los Servicios de Neumología de Andalucía oriental para CP, donde se establecen criterios de inclusión concretos y tiempos marcados para la realización de las pruebas complementarias, pues un aspecto relevante de esta grave enfermedad está relacionado con los retrasos en el diagnóstico y tratamiento.

El CP es más frecuente entre los hombres en la provincia de Granada, siendo la edad de presentación mayor en los hombres con respecto a las mujeres. Con respecto al consumo de tabaco, el análisis de nuestros resultados confirma que el tabaco es un factor etiológico de EPOC y que el consumo de más de 30 paquetes-año aumenta más del doble el riesgo de desarrollar esta enfermedad.

Siguiendo la tendencia de otros estudios epidemiológicos nacionales, el carcinoma epidermoide es la estirpe histológica que con mayor frecuencia se diagnostica en nuestros pacientes. Además es el tipo histológico más abundante entre los hombres, mientras que en las mujeres es el adenocarcinoma. El diagnóstico sigue realizándose en estadios avanzados

Un mejor conocimiento de las complejas interacciones del tumor con el microambiente que lo rodea es fundamental para comprender el mecanismo de defensa en el proceso tumoral (49). En el presente estudio se profundiza en el estudio del infiltrado inmunológico en el NSCLC combinando las técnicas de inmunohistoquímica y citometría de flujo. Un análisis exhaustivo de las subpoblaciones que constituyen el infiltrado inmunológico demuestra el mecanismo de defensa desarrollado por el huésped y la importancia de cada una de las subpoblaciones linfocitarias en esta defensa. En nuestro estudio analizamos la composición y distribución del infiltrado inmunológico de las diferentes subpoblaciones en las muestras de: TT, TAT, TDNT, centro tumoral (CT), estroma (E) y márgenes invasivos (MI) con el objetivo de investigar el estado funcional de las subpoblaciones linfocitarias y su asociación con las características clínico- patológicas de pacientes con NSCLC.

Nuestros resultados demuestran que existe un mayor porcentaje de células NK, células T memoria (CD4+CD45RO+, CD8+CD45RO+), células T activadas (CD4+DR+, CD8+DR+) y células T regs (CD4+CD25brightCD127dim) en la SP de pacientes con NSCLC cuando se compara con la SP de controles sanos, lo cual indica que existe una respuesta inmunológica en pacientes con NSCLC. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que estas diferencias sean atribuidas a la presencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), comorbilidad más frecuentes en los pacientes con CP. Sin embargo, los cambios observados en las diferentes subpoblaciones podrían ser inducidos directamente, al menos en cierto modo, por las células tumorales o el microambiente tumoral, como se ha demostrado en el análisis de las subpoblaciones en estos pacientes. En consecuencia, los porcentajes de células T

activadas y células CD4+ T regs en SP se correlacionaron con los porcentajes en las muestras de TT de pacientes con NSCLC. La subpoblación de células CD4+ T regs también fue mayor en pacientes con respecto a los controles, de acuerdo al estado de inmunosupresión de los pacientes, lo cual se confirmó en el análisis de las muestras de tejido pulmonar.

El tipo, densidad y localización del infiltrado inmunológico constituye un sistema de clasificación novedoso conocido como inmunoscore (83). Este sistema de clasificación complementa la información pronóstica del sistema TNM y además puede llegar a predecir la respuesta terapéutica, pudiendo diferir entre pacientes, incluso según el tipo histológico del tumor. La infiltración de células T citotóxicas CD8+ y células memoria (CD4+ CD45RO+) parece tener un valor pronóstico diferencial, dando lugar a este sistema de clasificación (87). La infiltración de la subpoblación T CD8+ juega un papel importante en la respuesta antitumoral y tiene un valor pronóstico en diferentes tipos de cáncer. Así en cáncer colorectal se demostró que la infiltración inmunológica en el CT y en MI estaba asociado con un mejor pronóstico, mientras que una baja infiltración de células T se relacionaba con un peor pronóstico (90, 108, 87). En la mayoría de los estudios, el sistema de inmunoscore se basa en técnicas de inmunohistoquímica, lo cual no permite una caracterización en profundidad de las células T y sus fenotipos funcionales (activadas o no, en estado de anergia o no, deficiencia en el estado de maduración o no). En nuestro estudio se llevó a cabo un análisis amplio y exhaustivo combinado ambas técnicas: citometría de flujo e inmunohistoquímica, lo que permite demostrar una profunda caracterización del infiltrado celular en las muestras de TT comparándolo con las muestras de TAT y TDNT del mismo paciente. Los resultados muestran que las células T y NK son ambas heterogéneas en CP y que determinadas subpoblaciones podrían suprimir la función de otras células inmunológicas, permitiendo a las células tumorales evadirse del control inmunológico.

Las muestras de TT presentan una mayor infiltración por células T con fenotipo memoria CD4+CD45RO+, una mayor prevalencia de células T CD4+ con respecto a CD8+ (CD4+> CD8+) y una mayor prevalencia células T con fenotipo Th1 con respecto a Th17, y una menor infiltración de células NK.

No se encontraron diferencias significativas en la localización de las células T CD4+ ni CD8+, sin embargo, ambos tipos de subpoblaciones y especialmente CD4+ estaban excluidos del contacto directo con el tumor y estas quedaban fundamentalmente localizadas en el E y en los MI. En cuanto a las células T CD8+ estas penetraban en el interior del tumor en muy pocas muestras, y aquellos casos en una baja proporción. Las células del E en el microambiente tumoral (macrófagos y fibroblastos asociados al proceso tumoral) previenen la llegada de las diferentes subpoblaciones linfocitarias al CT, acumulándose en las proximidades de este (143).

Sin embargo, nuestros datos sugieren que existen ciertos factores con función inmunosupresora que actúan desde el CT hacia el exterior y que estos podrían afectar significativamente la funcionalidad de determinadas subpoblaciones linfocitarias.

La proporción de células T y células B fue mayor en el TT que en las muestras de TDNT, a expensas de una reducción significativa de las células NK, y existía igualmente un mayor porcentaje de células T memoria (CD4+CD45RO+, CD8+CD45RO+) y células T activadas (CD8+DR+) en las muestras de TT. De forma paralela a esta activación inmunológica las muestras de TT también mostraban: a) un mayor porcentaje de células T regs (CD4+ CD25brightCD127dim); b) una menor relación de CD8/ T regs, c) un menor relación de Th1/T regs d) un mayor porcentaje de células T con actividad inmunosupresora (CD4+CD39+ y CD8+ CD39+) cuando lo comparamos con la infiltración en muestras de TDNT ($p < 0.001$ y 0.02 , respectivamente).

Las células T regs podrían suprimir la función de determinadas subpoblaciones favoreciendo la evasión tumoral, bien por la vía interacción-dependiente celular o mediante la supresión mediada por citoquinas. Es conocido que el balance entre células T efectoras y T regs en tumores determina el resultado de la respuesta funcional inmune (144) y las proporciones Th1/Tregs y CD8/T regs eran menores en las muestras de TT con respecto a las muestras de TDNT. Aunque el mecanismo preciso mediado por las células T regs está todavía por determinar. La expresión de FOXP3 por las células tumorales podría promover la evasión tumoral de las T regs (145). El receptor tipo toll like 4 (TLR4) induce la activación de las T regs y podrían jugar un papel importante en la progresión tumoral de pacientes con NSCLC, de hecho tanto FOXP3 como el receptor TLR4 se han visto elevados en pacientes con NSCLC, con respecto a controles sanos (145-147). Este mecanismo inmunosupresivo podría estar también ejercido por la ectoenzima CD39, la cual sirve como componente integral del mecanismo supresivo de las células T regs, inactivando y convirtiendo el ATP extracelular en adenosina y permitiendo a las células tumorales la evasión del control inmunológico (148-150). CD39 media algunas funciones inmunosupresivas y está también presente en diferentes subpoblaciones inmunes. En células T no reguladoras, la expresión de CD39 en células CD4+ y CD8+ se ha relacionado con células T en estado de anergia funcional (151) o células exhaustas (152). Además se ha demostrado que la ectoenzima CD39 otorga a las células T CD8+ una capacidad inhibitoria local, induciendo la hidrólisis de ATP y produciendo adenosina por la vía paracrina (153). Esta producción de adenosina extracelular podría limitar la respuesta de las células T CD4+ efectoras. En nuestro estudio, observamos una marcada acumulación de células T CD39+ (ambas CD4+ y CD8+) en las muestras de TT.

La acumulación de las células T CD8+ CD39+ en las muestras de TT, podría ser resultado de una estimulación crónica y persistente, producida en el interior del tumor. De hecho, la ectoenzima CD 39, parece ser un marcador patológico específico

de células T CD8⁺ exhaustas en infecciones crónicas virales en personas y en modelos animales (153, 154). CD57 es otro marcador de células T exhaustas en estado de senescencia (155), pero la presencia de células T exhaustas CD8⁺ CD39⁺ en las muestras de TT contrasta con la ausencia de células CD8⁺ CD57⁺ en muestras de TT.

Estudios previos encontraron que el incremento de células T CD8⁺ CD57⁺ (células senescentes) se relacionaba con procesos tumorales. Las células CD8⁺ CD57⁺ totalmente diferenciadas fueron abundantes en SP tanto en casos como en controles con porcentajes muy similares, lo que puede ser atribuido a la edad de ambos grupos de pacientes, pero no se observaron células T CD8⁺ CD57⁺ en muestras de TT. Investigaciones sobre el papel de estas células en la patología del proceso tumoral han demostrado su gran heterogeneidad. Meloni et al encontraron niveles significativos de expresión de FOXP3 en células CD8⁺ CD57⁺ en pacientes con CP, lo cual podría ser atribuido al componente inmunosupresivo de la respuesta inmunológica antitumoral (155). Aunque el incremento de esta subpoblación linfocitaria en SP podría contribuir a la deficiencia en la activación celular y jugar un papel en la disminución de la respuesta inmunológica en pacientes con NSCLC, estas células no son capaces de penetrar en el interior del tumor. Nuestros resultados sugieren que las células senescentes CD8⁺ CD57⁺ se producen fuera del tumor y no penetran en él. Sin embargo la acumulación de células T CD8⁺ CD39⁺ en las muestras de TT representan a una subpoblación disfuncional de células T CD8⁺ exhaustas, probablemente como resultado de una estimulación crónica.

El verdadero papel de las células B CD20⁺ en el proceso inmunológico antitumoral es todavía discutido. Existe una evidencia considerable de la función protectora antitumoral de las células B, a través de la producción de anticuerpos y la inducción de una respuesta inmune citotóxica, pero otros estudios, han sugerido que las células B podrían también facilitar la progresión tumoral (156). Recientemente, se ha observado que las células B son mediadores paracrinos del desarrollo, por parte de ciertos tumores, de citoquinas como son la IL-4, IL-10, factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) y el factor de crecimiento transformante β (TGF β), este último se encuentra entre los factores inmunosupresores más potentes secretados por las células B (157-159). En nuestro estudio, las células B eran prácticamente inexistentes en el CT y se localizaban preferentemente en los MI. En las muestras de TT se encontró una correlación inversa entre las células B CD20⁺ (alto porcentaje en TT) y las células CD4⁺ DR⁺ (linfocitos T activados, baja proporción en TT). Es decir, un incremento de células B CD20⁺ en muestras de TT se acompaña de un descenso en el porcentaje de células CD4⁺ DR⁺ y viceversa. Además las células B en el tumor, podrían promover la supresión de las células T CD8⁺ con actividad citotóxica, y convertir y/o reclutar a las células T regs CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺. En resumen, nuestros datos sugieren que la presencia de las células B también puede cambiar el equilibrio de la respuesta inmune específica frente al tumor, a través de mecanismo de inmunosupresión (156).

Al igual que las células T efectoras, las células NK están involucradas en la respuesta inmune antitumoral. Las células NK constituyen una población heterogénea que se puede dividir en diferentes subpoblaciones, según la expresión de marcadores de superficie celular (160,161).

En este estudio los pacientes con NSCLC presentaron en SP un porcentaje elevado de células NK con fenotipo citotóxico (CD56⁺ CD16⁺), este porcentaje celular también se encontraba elevado en las muestras de TDNT. Alrededor de la mitad de las muestras de TT no expresaban moléculas de histocompatibilidad de clase I (datos no publicados), estos cambios facilitan la invasión de las células tumorales por las células NK. Sin embargo, las consecuencias más importantes de nuestro estudio fueron los dos mecanismos de escape inmunológico encontrados: a) por un lado la exclusión de las células NK por las células tumorales, lo que justifica el bajo porcentaje de células NK en TAT e incluso el menor porcentaje en las muestras de TT y b) la alteración progresiva en el fenotipo de las células NK desde las muestras de TDNT al TT, dando lugar a un fenotipo no citotóxico o alteraciones en la maduración. En consecuencia, mientras que en SP y TDNT el fenotipo de células NK fue citotóxico (CD56⁺ CD16⁺), la presencia de este fenotipo estaba significativamente disminuido en TAT e incluso más en TT. La baja proporción de células NK (CD56⁺ CD16⁺) en muestras de TT fue atribuido a la incapacidad de estas células para penetrar en el interior del tumor (162). También encontramos en muestras de TT los siguientes tipos de subpoblaciones de NK: CD56^{bright} CD16⁻ (células no citotóxicas productoras de citoquinas) y células NK inmaduras CD56⁻ CD16⁻ (células no citotóxicas con fenotipo inmaduro). Estos resultados podrían tener dos explicaciones hipotéticas: a) el cambio fenotípico de las células NK podría estar inducido en el CT o b) o puede darse una colonización preferente del tumor por células NK en estados tempranos de diferenciación siguiendo un patrón específico de migración mediado por citoquinas y quimioquinas (162).

Otros trabajos también demuestran la baja infiltración de células NK activadas en el CT de pacientes con NSCLC, concediéndole al tejido pulmonar una baja capacidad permisiva para la infiltración de las células NK con respecto a otro tipo de tejidos (163). Utilizando la tecnología de transferencia de genes, podría ser posible la creación de niveles altos de quimioquinas y citoquinas en el microambiente tumoral para mantener a las células NK activadas y dirigir las al CT, sin inducir efectos secundarios generalizados (163). La posibilidad de que existan determinadas señales de stop en la migración de las células NK al CT está todavía por dilucidar.

En resumen, nuestro estudio incorpora nuevos conocimientos sobre la distribución y las características fenotípicas de las diferentes subpoblaciones linfocitarias. Se trata del primer análisis amplio y exhaustivo sobre el infiltrado inmunológico que muestra las diferencias cuantitativas y cualitativas de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en las diferentes muestras de TT, TAT y TDNT procedentes del mismo paciente. Nuestros

datos demuestran, cómo las células efectoras son prácticamente excluidas del contacto directo con las células tumorales y que estas además se localizan preferentemente en el E, donde se crea un 'espacio de inmunoprivilegio', perdiendo las células T y NK la capacidad de respuesta citotóxica, lo cual favorecería la evasión tumoral en pacientes con NSCLC y facilitaría la progresión tumoral.

En nuestro estudio la respuesta inmunológica fue diferente en función del tipo histológico tumoral; adenocarcinoma y carcinoma epidermoide. Encontramos un mayor porcentaje de linfocitos T en muestras de TT mediante técnicas de citometría de flujo e inmunohistoquímica, localizándose estos fundamentalmente en el E. Nuestros estudios de inmunohistoquímica muestran que tumores con un grado de diferenciación bueno-moderado, tienen una mayor infiltración linfocitaria, localizándose preferentemente en los MI y en el CT, y un mayor porcentaje de macrófagos en los MI. Estos resultados podrían indicar que existe una mejor respuesta inmunológica en los tumores bueno-moderadamente diferenciados. Estos tumores presentan un mejor pronóstico en comparación con los tumores con un pobre grado de diferenciación, los cuales presentan una mayor infiltración de células T regs Fox P3, mostrando un estado inmunosupresivo.

Nuestros resultados sugieren que la evasión del tumor a la vigilancia inmunológica está favorecida por la pérdida de penetración en el interior del tumor de determinadas subpoblaciones linfocitarias. Estos resultados, concuerdan con los ya publicados en la literatura, y reflejan la dificultad de las células inmunes, para atravesar las barreras físicas y endoteliales y penetrar en el interior del tumor.

Los datos presentados en esta tesis, acerca de la mayor parte de las poblaciones inmunes que infiltran los tumores y que constituyen la respuesta inmune innata y adaptativa, proporcionan una imagen más completa de la respuesta inmunológica en pacientes con NSCLC, evidenciándose las complejas interacciones del tumor con su microambiente.

Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. El cáncer de pulmón (CP) es más frecuente entre los hombres en la provincia de Granada, siendo la edad de presentación mayor en los hombres con respecto a las mujeres. El carcinoma epidermoide es la estirpe histológica que con mayor frecuencia se diagnóstica en hombres, mientras que el adenocarcinoma es más prevalente entre las mujeres.

2. El sistema inmune tiene un papel fundamental en la respuesta inmunológica frente al tumor. La localización, densidad y funcionalidad de este infiltrado va a determinar el pronóstico de la enfermedad.

3. Nuestros resultados muestran que aquellos pacientes con CP presentan una mayor activación del sistema inmunológico, existiendo diferencias significativas (en porcentaje y en valor absoluto) en las células NK, células T activadas, células T memoria y células T regs en sangre periférica. Estos cambios podrían ser inducidos por las células tumorales o por el microambiente tumoral.

4. En el tejido tumoral se encontró un mayor porcentaje de células T y B a expensas de una reducción significativa en la población NK. La mayoría de las células T: CD4+ y CD8+ tenían un fenotipo efector memoria. El fenotipo CD4+ fue más prevalente que el CD8+ en las muestras de tejido tumoral, siendo el fenotipo Th1 más prevalente con respecto al Th17.

5. Cuando se comparó el tejido tumoral con el tejido adyacente y el tejido distante no tumoral, en el tejido tumoral se encontraron: un mayor porcentaje de células T regs, una relación CD8/Treg menor, una relación Th1/Treg menor y se encontró además un mayor porcentaje de células T con función inmunosupresora (CD4+ CD39+ y CD8+ CD39+) y células T con fenotipo senescente (CD8+ CD57+)

6. El verdadero papel de las células B en el proceso tumoral es discutido. En nuestro estudio, dentro del tejido tumoral, la proporción de estas células fue

prácticamente inexistente, localizándose preferentemente en los márgenes invasivos. La presencia de estas células podría cambiar el equilibrio de la respuesta inmune específica frente al tumor, a través de mecanismos de inmunosupresión.

7. Las células NK constituyen una población muy heterogénea, y se dividen en función de marcadores de superficie celular, en diferentes subpoblaciones con distintos fenotipos. Su penetración al interior del tumor también se encuentra muy limitada, predominando aquellas con actividad no citotóxica, esto tendrá un papel importante en la respuesta inmune antitumoral.

8. Se ha conseguido demostrar diferencias significativas en la respuesta inmunológica en función del tipo histológico tumoral y el grado de diferenciación tumoral. En el tipo histológico adenocarcinoma se observó una mayor infiltración linfocítica con respecto al epidermoide, esta infiltración se localizó principalmente en el estroma tumoral. Aquellos tumores con mayor grado de diferenciación, presentan una mayor infiltración de linfocitos T y macrófagos. Por el contrario tumores con bajo grado de diferenciación presentan una mayor infiltración de células T regs.

Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Brambilla E, Travis WD. Lung cancer. In: World Cancer Report, Stewart BW, Wild CP (Eds), World Health Organization, Lyon 2014.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66:7.
3. Siegel R, Ward E, Brawley O et al. Cancer statistics 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin*. August 2011; 61 (4): 212-36.
4. INE (Internet). Disponible en <http://www.ine.es>
5. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, López-Campos JL et al. Joinpoint regression analysis of lung cancer mortality, Andalusia 1975-2000. *Ann Oncol*, 15 (2004), pp. 793-6.
6. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S et al. Trends in Lung Cancer Mortality Rates in the Provinces of Andalusia, Spain, 1975-2002. *Arch Bronconeumol*. 2006; 42:633-7.
7. Martínez C, Sánchez MJ, Rodríguez M et al. Exactitud del diagnóstico de cáncer en los certificados de defunción de la provincia de Granada. *Revista de Oncología*, 2 (2000), pp. 245-52
8. Lee JY, NA II, Jang S-H et al. Differences in clinical presentation of non-small cell lung cancer in never- smokers versus smokers. *J Thorac Dis*. December 2013; 5(6): 758-63.
9. Freedman ND, Abnet CC, Caporaso NE et al. Impact of changing US cigarette smoking patterns on incident cancer: risks of 20 smoking-related cancers among the women and men of the NIH-AARP cohort. *Int J Epidemiol*. 2015 Sep 27.
10. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL et al. Lung Cancer Incidence in never smokers. *J Clin Oncol* 2007; 25:472-78.
11. Curado MP, Edwards B, Shin HR et al. (Eds). Cancer incidence in Five Continents, Vol 9 Lyon, France: International Agency for research in cancer (IARC) 2007. IARC Scientific Publications No.160.

12. Tang D, Philips DH, Stampfer M et al. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 2001; 61:6708-12.
13. Perera FP, Mooney LA, Stampfer M y cols.: Association between Carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians healthstudy. *Cancer Res* 2011; 61:6708-12.
14. Song MA, Marian C, Brasky TM et al. Chemical and toxicological characteristics of conventional and low-TSNA moist snuff tobacco products. *Toxicol Lett.* 2016 Mar 14; 245:68-77.
15. Mannino DM. Cigarette smoking and other risk factors for lung cancer. In: UpToDate, Rose BD (Ed), Uptodate, Waltham, Jan 2015.
16. Hofmann D, Brunnemann K.D., Gori G et al. On the carcinogenicity of marijuana smoke, pp 63-81. *Recent Advances in Phytochemistry* New York: Plenum Publishing Corp., 1975
17. Gallart-Mateu D, Elbal L, Armenta S et al. Passive exposure to nicotine from e-cigarettes. *Talanta.* 2016 May 15; 152:329-34.
18. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 83. 1-1438 (2004).
19. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum World Health. 2004; 83:1-1438.
20. Brown K. Respiratoy Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and other Disorders. Beyard S. Jinot J. & Koppicar A.M. Environmental Protection Agency. Washington DC. USA; 1992. p. Chapt 6. 1-29.
21. Turner MC, Krewski D, Pope CA 3rd et al. Long-term ambient fine particulate matter air pollution and lung cancer in a large cohort of never-smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 184 (12): 1374- 81.
22. Torres-Durán M, Barros-Dios JM, Fernández-Villar A et al. Residential radon and lung cancer in never smokers. A systematic review. *Cancer Lett.* April 1 2014; 345(1):21-6.
23. Markowitz S. Asbestos-related lung cancer and malignant mesothelioma of the pleura: selected current issues. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015 Jun; 36(3):334-46.

24. Delva F, Andujar P, Lacourt A. Occupational risk factors for lung cancer. *Rev Mal Respir.* 2015 Nov 10. S0761-8425(15)00366-6.
25. Mumford JL, He XZ, Chapman RS et al. Lung cancer and indoor air pollution in Xuan Wei, China. *Science.* January 9, 1987;235(4785):217-20.
26. Dosil- Díaz O, Ruano- Ravina A, Gestal- Otero JJ et al. Meat and fish consumption and risk of lung cancer: A case-control study in Galicia, Spain. *Cancer Lett.* July 8, 2007; 252 (1): 115-22
27. Bagnardi V., Rota M., Botteri E. et al. Alcohol consumption and lung cancer risk in never smokers: a meta-analysis. *Annals of Oncology* 2011; 22: 2631-2631.
28. José Abal Arca, Isaura Parente Lamelasa, Raquel Almazán Ortega et al. Lung Cancer and COPD: a Common Combination. *Arch Bronconeumol.*2009; 45:502-7 - Vol. 45 Núm.10.
29. Badoual C, Tartour E, Roussel H. HPV (Human Papilloma Virus) implication in other cancers than gynaecological. *Rev Med Interne.* 2015 Aug;36(8):540-7.
30. Nitadori J, Inoue M, Iwasaki M. Association between lung cancer incidence and family history of lung cancer: data from a large-scale population-based cohort study, the JPHC study. *Chest.* 2006 Oct; 130(4):968-75.
31. Gosney J, Travis WD. Pathology and genetics: tumours of the lung, pleura, thymus and heart. En: Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris CC, eds. *World Health Organization classification of tumours.* Lyon, France: IARC Press; 2004. p. 76-7.
32. Roden AC, García JJ, Wehrs RN et al. Histopathologic, immunophenotypic and cytogenetic features of pulmonary mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol.* 2014 Nov; 27(11):1479-88.
33. Bota S, Auliac JB, Paris C et al. Follow-up of bronchial pre-cancerous lesions and carcinoma in situ using fluorescence endoscopy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 1688-93.
34. Travis WD, Brambilla E, Masayuki N, et al. IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thoracic Oncol.* 2011; 6: 244-85.
35. Kerr M. Personalized medicine for lung cancer: new challenges for pathology. *Histopathology.* 2012 Mar; 60(4):531-46.

36. Travis WD. Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol*. 2012 Jan; 25 Suppl 1:S18-30
37. Taus A, Vollmer I, Arriola E. Mutaciones de sensibilidad y resistencia del gen epidermal growth factor receptor (EGFR) en el cáncer de pulmón de célula no pequeña. *Arch Bronconeumol*. 2011; 47: 103-5.
38. Hsu F, De Caluwe A, Anderson D et al. EGFR mutation status on brain metastases from non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016 Jun; 96:101-7.
39. Thunnissen E, Kerr KM, Herth FJF et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer*. 2012 Apr; 76(1):1-18.
40. Leiro-Fernández V, Mouronte-Roibás C, Ramos-Hernández C. Changes in clinical presentation and staging of lung cancer over two decades. *Arch Bronconeumol*. 2014 Oct; 50 (10):417-21.
41. Walker L, French S. Horner's Syndrome: A Case Report and Review of the Pathophysiology and Clinical Features. *West Indian Med J*. 2014 Jun; 63(3):278-80.
42. Windisch T, Fischer JR, Vega A. Infiltration of the superior vena cava in NSCLC: results of surgical intervention. *Pneumologie*. 2015 Jan; 69(1):23-9.
43. Sánchez de Cos Escuín J. Carcinoma broncogénico: epidemiología, factores etiológicos y manifestaciones clínicas. En Álvarez-Sala JL, et al. *Neumología clínica*. Barcelona: Elsevier; 2010. p. 459-65.
44. Niu FY, Zhou Q, Yang JJ et al. Distribution and prognosis of uncommon metastases from non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2016 Feb 24; 16(1):149.
45. Dalmau J, Myrna R. Rosenfed. Síndromes neurológicos paraneoplásicos En: Fauci AS et al. *Harrison, Principios de Medicina Interna*. Mc Graw Hill; 2009. p. 623-8.
46. Tsai MY, Jo-Ching W, Wu FZ. Hypertrophic pulmonary osteoarthropathy in a patient with lung cancer. *Intern Med*. 2014; 53(23):2757-8.

47. Paraschiv B, Diaconu CC, Toma CL et al. Paraneoplastic syndromes: the way to an early diagnosis of lung cancer. *Pneumologia*. 2015; 64(2):14-9.
48. Peter Goldstraw, FRCS, Executive Editor. *Staging Manual in Thoracic Oncology*. Editorial Rx Press; 2009.
49. De Groot PM, Carter BW, Betancourt Cuellar SL. Staging of lung cancer. *Clin Chest Med*. 2015 Jun; 36(2):179-96.
50. Kocher F, Lunger F, Seeber A et al. Incidental Diagnosis of Asymptomatic Non-Small-Cell Lung Cancer: A Registry-Based Analysis. *Clin Lung Cancer*. 2016 Jan; 17(1):62-7.e1
51. Sánchez de Cos J, Hernández JH, López MF et al. Normativa SEPAR sobre estadificación del cáncer de pulmón. *Arch Bronconeumol*. 2011 Sep 47 (9): 454-65.
52. Ruiz Guijarro JA, Carrera Delgado JL: Bases de la tomografía por emisión de positrones. En Carrera JL, Lapeña L, Asensio C, editores. *PET en Oncología*. First ed. Madrid: Nova Sidonia; 2002.p.7-31.
53. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Witteking C. *International Union against Cancer: TNM Classification of Malignant Tumours*, 7^o ed. Oxford, UK. Wiley-Blackwell, 2009.
54. Ren H, Xu W, You J. Analysis of the Role of PET/CT SUVmax in Prognosis and Its Correlation with Clinicopathological Characteristics in Resectable Lung Squamous Cell Carcinoma. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2016 Apr 20; 19(4):192-9.
55. Chang CY, Gill CM, Joseph Simeone F. Comparison of the diagnostic accuracy of 99 m-Tc-MDP bone scintigraphy and 18 F-FDG PET/CT for the detection of skeletal metastases. *Acta Radiol*. 2016 Jan; 57(1):58-65.
56. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA. *Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer*, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013 May; 143:e211S-50S.
57. Qureshi NR, Rahman NM, Gleeson FV. Thoracic ultrasound in the diagnosis of malignant pleural effusion. *Thorax*. 2009 Feb; 64(2):139-43.

58. Mazzone P et al. Bronchoscopy and needle biopsy techniques for diagnosis and staging of lung cancer. *Clinics in Chest Medicine* 2002; 23: 137-58.
59. Fujiwara T, Yasufuku K, Nakajima T. The utility of sonographic features during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for lymph node staging in patients with lung cancer: a standard endobronchial ultrasound image classification system. *Chest*. 2010 Sep; 138(3):641-7.
60. Larsen SS, Vilmann P, Krasnik M et al. Endoscopic ultrasound guided biopsy performed routinely in lung cancer staging spares futile thoracotomies: preliminary results from a randomised clinical trial. *Lung Cancer*. 2005 Sep; 49(3):377-85.
61. Villena Garrido V, Cases-Viedma E, Porcel- Pérez JM et al. Normativa SEPAR. Diagnóstico y tratamiento del derrame pleural. *Arch bronconeumol*, 2014; 50(6), 235-49.
62. Jiménez HL, Bravo JB, Zapatero G. Diagnóstico y manejo del derrame pleural maligno. *Rev Patol Respir* 2007; 10(3): 140-45.
63. Kravtsov V, Sukmanov I, Yaffe D. Diagnostic aspects of fine needle aspiration for lung lesions: series of 245 cases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(22):9865-9.
64. UICC. TNM Classification of malignant tumors. 2nd 1975. Geneve, UICC.
65. Peter Goldstraw, FRCS, Executive Editor. Staging Manual in Thoracic Oncology. Editorial Rx Press Orange Park FL, USA.
66. Rusch VR, Crowley JJ, Giroux DJ et al: The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for revision of N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2: 603-1
67. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical practice guidelines in oncology.
68. O'Rourke N, Roqué I Figuls M, Farré Bernadó N. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jun 16;(6):CD002140
69. Hanna NH, Sandier AB, Loehrer PJ Sr et al. Maintenance daily oral etoposide versus no further therapy following induction chemotherapy with etoposide

- plus ifosfamide plus cisplatin in extensive small-cell lung cancer: a Hoosier Oncology Group randomized study. *Ann Oncol.* 2002; 13: 95-102.
70. Cariboni U, Stella GM. Surgical options to early-stage lung cancer: can "the less" mean "the safe"? *Minerva Med.* 2015 Apr 22.
 71. Jiménez MF, Varela G, Novoa N, et al. Lobectomía broncoplástica frente a la neumonectomía en el tratamiento del carcinoma de pulmón no microcítico. *Arch Bronconeumol.* 2006; 42: 160-4.
 72. Van Meerbeeck JP, Damhuis RAM, Vos de Wael ML. High postoperative risk after pneumonec-tomy in elderly patients with right-sided lung cancer *Eur Respir J* January. 2002; 19: 141-5.
 73. Hernández M. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol.* 2001; 17 (1): 65-71.
 74. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in K-ras are predictive and prognostic indicators in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5900-9.
 75. Kamp WM, Wang PY1 Hwang PM. TP53 mutation, mitochondria and cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2016 Mar 19; 38:16-22.
 76. Cecchini MJ, Ishak CA, Passos DT. Loss of the retinoblastoma tumor suppressor correlates with improved outcome in patients with lung adenocarcinoma treated with surgery and chemotherapy. *Hum Pathol.* 2015 Dec; 46(12):1922-34.
 77. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol*, 29 (2002), pp. 3-9.
 78. Desai A, Menon SP, Dy GK. Alterations in genes other than EGFR/ALK/ROS1 in non-small cell lung cancer: trials and treatment options. *Cancer Biol Med.* 2016 Mar; 13(1):77-86.
 79. S.P. D'Angel,M.C. Pietanza,M.L. Johnson,G.J et al. Incidence of EGFR Exon 19 deletions and L858K in tumor specimens from men and cigarette smokers with lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*, 29 (2010), pp. 2066-2070.

80. Cho KM, Keam B, Kim TM. Clinical efficacy of erlotinib, a salvage treatment for non-small cell lung cancer patients following gefitinib failure. *Korean J Intern Med.* 2015 Nov;30(6):891-8.
82. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pages F, Galon J: Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol* 2010, 22: 215-222.
83. Bremnes RM, Al-Shibli K, Donnem T et al. The role of tumor-infiltrating immune cells and chronic inflammation at the tumor site on cancer development, progression, and prognosis: emphasis on non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 824–833.
84. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 298–306.
85. Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ. Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* 2005 Nov; 5(11): 866-79.
86. Bowers William. “Immunology-Chapter nine. Cells involved in immune responses”. *Microbiology and Immunology On-line Textbook.* USC School of Medicine 2006.
87. Mantovani A, Allavena P, Sica A et al. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454: 436-44.
88. Xiang R, Lode HN, Gillies SD. T cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of antigen. *J Immunol.* 1999 Oct 1; 163(7):3676-83.
89. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006 Sep 29; 313:1960-4.
90. Abi Berger. Th1 and Th2 responses: What are they? *BMJ.* 2000 Aug 12; 321(7258): 424.
91. Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010 Apr; 22:231-7.
92. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res* 2013; 73: 3591-603.
93. Wong SC, Puaux AL, Chittezhath M et al. Macrophage polarization to a unique phenotype driven by B cells. *Eur J Immunol.* 2010 Aug; 40(8):2296-307.

94. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, et al. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 2011; 331(6013):44-9.
95. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 2010; 116: 3853–64.
96. Jonsson AH, Yokoyama WM. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol* 2009; 101: 27–79.
97. Brodin P, Karre K and Hoglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends in Immunology* 2009; 30: 143–149.
98. Platonova S, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 2011, 71: 5412-5422.
99. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol.*2006; 90:51-81.
100. Garrido C, Romero I, Berruguilla E et al. Immunotherapy eradicates metastases with reversible defects in MHC class I expression. *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Sep; 60(9):1257-68.
101. Topfer K, Kempes S, Muller N, et al. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:918471
102. Chiu HY, Sun GH, Chen SY, et al. Pre-existing Fas ligand (FasL) in cancer cells elicits tumor-specific protective immunity, but delayed induction of FasL expression after inoculation facilitates tumor formation. *Mol Carcinog.* 2013 Sep; 52(9):705-14.
103. Anestakis D, Petanidis S, Kalyvas S et al. Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 2015 Jan 13;16(1):1691-710.
104. Hatanaka H, Abe Y, Naruke M, et al. Significant correlation between interleukin expression and vascularization through angiopoietin/TIE2 networks in non-small cell lung cancer. *Clin Canc Res.* 2007; 11(9): 1911-28. Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer.*2007; 110(9): 1911-28. *Res.*2001; 7: 1287-92.
105. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007; 110(9): 1911-28.

106. Gao SP, Mark KG, Leslie K, et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest.* 2007; 117: 3846-56.
107. Galon J, Pages F, Marincola FM et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med* 2012; 10: 205.
108. Galon J, Angell HK, Bedognetti D et al. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 2013; 39: 11–26.
109. Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232: 199–209.
110. Carlo C. Maley, Konrad Koelble, Rachael Natraja et al. An ecological measure of immune-cancer colocalization as a prognostic factor for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015; 17(1): 131.
111. Salgado R, Denkert C, Demaria S et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* 2015; 26: 259–271.
112. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006 Sep 29; 313:1960-4.
113. Duan MC, Zhong XN, Liu GN et al. The Treg/Th17 paradigm in lung cancer. *J Immunol Res* 2014; 2014: 730380.
114. Goc J, Germain C, Vo-Bourgais TK, et al. Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a Th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8 β T cells. *Cancer Res.* 2014; 74:705–715.
115. Al-Shibli K, Al-Saad S, Andersen S, et al. The prognostic value of intraepithelial and stromal CD3-, CD117- and CD138-positive cells in non-small cell lung carcinoma. *APMIS.* 2010; 118:371–382.
116. Djenidi F, Adam J, Goubar A, et al. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol.* 2015; 194: 3475–86.

117. Schalper KA, Brown J, Carvajal-Hausdorf D, et al. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015 Feb 3; 107(3).
118. Mori M, Ohtani H, Naito Y, et al. Infiltration of CD8+ T cells in non-small cell lung cancer is associated with dedifferentiation of cancer cells, but not with prognosis. *Tohoku J Exp Med.* 2000 Jun;191(2):113-8.
119. Gooden MJ, de Bock GH, Leffers N, et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2011; 105:93–103.
120. Donnem TP, Hald SM, Paulsen EE et al. Stromal CD8+ T cell density—a promising supplement to TNM staging in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2635–43.
121. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5944–51.
122. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, et al. Strategies to implement immunoscore in resected non-small cell lung cancer into the clinic. *Ann Oncol.* 2016 Feb; 27(2):225-32.
123. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FLM, et al. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin Exp Allergy* 2004; 34: 1156-1167.
124. Kim S, Nadel JA. Role of neutrophils in mucus hypersecretion in COPD and implications for therapy. *Treat Respir Med* 2004; 3: 147-159.
125. Hodge S, Hodge G, Ahern J, et al. Smoking alters alveolar macrophage recognition and phagocytic ability: implications in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37: 748-755.
126. Amin K, Ekberg-Jansson A, Lofdahl CG, et al. Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax* 2003; 58: 135-142.
127. Lams BE, Sousa AR, Rees PJ, et al. Subepithelial immunopathology of the large airways in smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2000; 15: 512-516.

128. Willemsse BW, ten Hacken NH, Rutgers B, et al. Smoking cessation improves both direct and indirect airway hyperresponsiveness in COPD. *Eur Respir J* 2004; 24: 391-396.
129. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015; 75:2139–2145.
130. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014; 515:563–67.
131. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366: 2443–2454.
132. Kim MY, Koh J, Kim S, et al. Clinicopathological analysis of PD-L1 and PD-L2 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: comparison with tumor-infiltrating T cells and the status of oncogenic drivers. *Lung Cancer.* 2015; 88: 24–33.
133. Soria JC, Marabelle A, Brahmer JR et al. Immune checkpoint modulation for non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2015 May 15; 21(10):2256-62.
134. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015 Apr; 14(4):847-56
135. Jia M, Feng W, Kang S et al. Evaluation of the efficacy and safety of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibody in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis. *J Thorac Dis.* 2015 Mar; 7(3):455-61.
136. Chatterjee M, Turner DC, Felip E et al. Systematic evaluation of pembrolizumab dosing in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2016 Jul;27(7):1291-8.
137. Gridelli C, Besse B, Brahmer JR et al. The Evolving Role of Nivolumab in Non-Small-Cell Lung Cancer for Second-Line Treatment: A New Cornerstone for Our Treatment Algorithms. Results From an International Experts Panel Meeting of the Italian Association of Thoracic Oncology. *Clin Lung Cancer.* 2016 May; 17(3):161-8.
138. Tratado de Cirugía Torácica. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Editores Médicos, S. A: Volumen 1. Pag. 417-431.
139. Vainshelboim B, Fox BD, Saute M, et al. Limitations in exercise and functional capacity in long-term postpneumonectomy patients. *J Cardiopulm Rehabil Prev.* 2015 Jan-Feb; 35(1):56-64.

140. Aguayo Canela M. Cómo realizar “paso a paso” un contraste de hipótesis con SPSS para Windows y alternativamente con EPIINFO y EPIDAT: (I) Asociación entre dos variables categóricas y test de Chi-cuadrado (X²). DocuWeb fabis org, 2007.
141. Marrugat J, Villa J, Pavesi M, et al. Estimación del tamaño muestral en la investigación clínica y epidemiológica. *Med Clin (Barc)*.1998; 111: 267-76. 1
142. Wang W, Hodkinson P, McLaren F, et al. Histologic assessment of tumor-associated CD45(+) cell numbers is an independent predictor of prognosis in small cell lung cancer. *Chest*. 2013 Jan; 143(1):146-51.
143. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015; 348: 74-80.
144. Roychoudhuri R, Eil RL, Restifo NP. The interplay of effector and regulatory T cells in cancer. *Curr Opin Immunol*. 2015 Apr; 33:101-11
145. Chen C, Chen D, Zhang Y, et al. Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28-regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. *Int Immunopharmacol* 2014; 18: 255-61.
146. Fu HY, Li C, Yang W, et al. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: implications for tumor progression and escape. *Acta Histochem* 2013; 115: 151-157.
147. Ciebiada M, Kasztalska K, Gorska-Ciebiada M, et al. Expression of IL-7 receptor in human peripheral regulatory T cells. *Arch Med Sci* 2013; 9: 555–60.
148. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* 1994; 153: 3574–83.
149. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, et al. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med* 2002; 8: 358–365.
150. Cai XY, Wang XF, Li J, et al. Overexpression of CD39 and high tumoral CD39(+)/CD8(+) ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 14757-64.
151. Umansky V, Shevchenko I, Bazhin AV, et al. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63(10):1073-80.

152. Gupta PK, Godec J, Wolski D, et al. CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* 2015;11: e1005177.
153. Bai A, Moss A, Rothweiler S, et al. NADH oxidase-dependent CD39 expression by CD8+ T cells modulates interferon gamma responses via generation of adenosine. *Nat Commun* 2015; 9: 6:8819.
154. Striojga M, Pasukoniene, Characiejus D. CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011; 134: 17–32.
155. Meloni F, Morosini M, Solari N, et al. Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+ CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol* 2006; 67: 1-12.
156. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, et al. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology* 2013; 1;2: e25443.
157. Gunderson AJ, Coussens LM. B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Exp Cell Res* 2013; 1; 319: 1644-9.
158. Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, et al. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR3s in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest* 2002; 110: 1823–1830.
159. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions. *Methods Mol Biol* 2008; 415: 151–162.
160. Huntington ND, Vosshenrich CAJ, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 703–714.
161. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203: 1033–43.
162. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol* 2003; 24: 603–9.
163. Somasundaram R, Ruehl M, Tiling N, et al. Collagens serve as an extracellularstore of bioactive interleukin 2. *J. Biol. Chem* 2000; 275, 38170–75.

8. ANEXOS

8.1 Certificado Comité Ético



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE SALUD

D. Miguel Ángel Calleja Hernández Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Centro de Granada (CEI-GRANADA)

CERTIFICA

Que este Comité ha analizado la propuesta de el S. Cirugía Torácica del Complejo Hospitalario Universitario de Granada (IIUVN) para que se realice el proyecto de investigación titulado: "Perfil inmunológico e implicaciones pronósticas en cáncer de pulmón. Dr. Sánchez Palencia. Unidad de Cirugía Torácica" y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del proyecto en relación con los objetivos del estudio.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este centro.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el Dr. Abel Sanchez Palencia en el Complejo Hospitalario Universitario de Granada (HUVN) como investigador principal en el mismo y colaboradores.

Lo que firmo en Granada a treinta de diciembre de dos mil catorce.

Dr. Miguel Ángel Calleja Hernández

Firmado

8.2 Publicación

Research Paper

Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer

María del Mar Valenzuela-Membrives¹, Francisco Perea-García³, Abel Sanchez-Palencia², Francisco Ruiz-Cabello³, Mercedes Gómez-Morales⁴, María Teresa Miranda-León⁵, Inmaculada Galindo-Angel⁴, María Esther Fárez-Vidal⁶

¹Department of Pneumology, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain

²Department of Thoracic Surgery, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

³Institute for Biomedical Research, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain

⁴Department of Pathology, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

⁵Department of Statistics and Operative Research, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

⁶Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

Correspondence to: María Esther Fárez-Vidal, **email:** efarez@ugr.es

Keywords: immunological response, lung cancer, immunohistochemistry, flow cytometry, lymphocyte subsets

Received: May 18, 2016

Accepted: September 19, 2016

Published: September 26, 2016

ABSTRACT

Immune cell infiltration is a common feature of many human solid tumors. Innate and adaptative immune systems contribute to tumor immunosurveillance. We investigated whether tumors evade immune surveillance by inducing states of tolerance and/or through the inability of some immune subpopulations to effectively penetrate tumor nests. Immunohistochemistry and flow cytometry analysis were used to study the composition and distribution of immune subpopulations in samples of peripheral blood, tumor tissue (TT), adjacent tumor tissue (ATT), distant non-tumor tissue (DNNT), cancer nests, cancer stroma, and invasive margin in 61 non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. A significantly higher percentage of T and B cells and significantly lower percentage of NK cells were detected in TT than in DNNT. Memory T cells (CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RO⁺) and activated T cells (CD8⁺DR⁺) were more prevalent in TT. Alongside this immune activation, the percentage of T cells with immunosuppressive activity was higher in TT than in DNNT. B- cells were practically non-existent in tumor nests and were preferentially located in the invasive margin. The dominant NK cell phenotype in peripheral blood and DNNT was the cytotoxic phenotype (CD56⁺ CD16⁺), while the presence of these cells was significantly decreased in ATT and further decreased in TT. Finally, the immunologic response differed between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma and according to the tumor differentiation grade. These findings on the infiltration of innate and adaptative immune cells into tumors contribute to a more complete picture of the immune reaction in NSCLC.

INTRODUCTION

Lung cancer accounts for the largest number of cancer-related deaths worldwide, and more than 85% of cases are non-small-cell lung cancer (NSCLC). There have been limited improvements in NSCLC therapy over the past few decades, and a five-year survival rate of only 16% has been estimated for NSCLC patients [1].

Immune cell infiltration is a common feature of many human solid tumors. Any type of infiltrating immune cell may be found in different tumors and in distinct localizations within tumors, i.e., in their core (center), invasive margin, or surrounds or in adjacent tertiary lymphoid structures [2]. The localization, density, and/or functional orientation of different immune cell populations can be beneficial or deleterious for patients. T lymphocytes

play a vital role in the immune response against tumor development, and clinical and histopathological studies [3, 4] have described T-cell immune infiltrate as the most important predictor of patient survival [5–9]. However, cells infiltrating tumors are highly heterogeneous, and most components of myeloid and lymphoid compartments are represented. Furthermore, infiltrating immune cells can become activated through a perturbed phenotype and/or a functional profile that creates an environment conducive to T-cell suppression [10]. Immunosuppression leads to Th1/Th2 imbalance and Th2 drift, affecting anti-tumor immunity. Regulatory T cells (Tregs) are a population of T cells that suppress the activation of the immune system and maintain immune tolerance to self-antigens. Tregs can contribute to immunosuppressive or antitumor activity, allowing tumors to evade the immune barrier in epithelial malignancies [11]. Tregs are upregulated or activated in the tumor microenvironment, and a higher number of Tregs has been correlated with a worse prognosis in epithelial cancers, including lung cancer [12, 13]. Potential mechanisms underlying the immunosuppressive effects of Tregs may include the production of inhibitory cytokines, such as TGF- β and IL-10, and the suppression of T cell function by competitive binding of interleukin-2 (IL-2) *via* cell surface receptor CD25 (IL-2 receptor). In addition, several co-inhibitory molecules, such as cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR), bind to ligands on effector T cells and directly contribute to the inhibitory function of Tregs [14].

There is a need for a more complete understanding of anti-tumor immune responses and of the role of NK cells in this process [15–17]. NK cells are innate lymphocytes with a natural ability to recognize and kill aberrant cells, including cancer cells [18–20]. There is increasing evidence that tumor-infiltrating NK cells have severe defects in their cell receptor repertoire, suggesting a local tumor-induced impairment of NK-cell function. Hence, the quality rather than quantity of intratumoral NK cells may account for their dysfunction. Intratumoral NK cells were found to express markedly lower levels of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in comparison to peripheral blood NK cells from the same patients [21, 22]. Tumor-infiltrating NK cells without KIR expression, as non-educated cells, have no cytotoxic capacity [23, 24]. Recent studies also indicated that the phenotype of tumor-infiltrating NK cells without KIR expression was characteristic of immature and nonfunctional NK cells [25]. In support of this hypothesis, several studies showed that the NK-cell developmental program is not entirely fixed and that mature NK cells can be re-educated by their environment [26–28]. Hence, the tumor microenvironment may have a negative impact on NK-cell maturation.

Despite the importance of T cells and NK cells in tumors and tumor microenvironments, a comprehensive analysis of these lymphocytic cell populations has not

been reported in NSCLC patients. All subsets of T cells and NK cells are present at the core and invasive margin of NSCLC tumors. Distinct functional populations of immune cells are found at different tumor localizations and their distribution pattern varies among cancer types, suggesting that different immune cell populations may have distinct roles in tumor control.

The objective of the present study was to analyze the composition and distribution of immune subpopulations in samples of peripheral blood, tumor tissue (TT), adjacent tumor tissue (ATT), distant non-tumor tissue (DNNT), cancer nests, cancer stroma, and invasive margin in NSCLC patients. The aim was to provide new insights into the distribution and phenotypic characteristics of different immune lymphocyte subpopulations in this disease.

RESULTS

Analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood samples

Significant differences in NK cell, B cell, and T cell subsets were found between peripheral blood samples from NSCLC patients and healthy controls. In comparison to the controls, the patient peripheral blood samples had a significantly higher percentage (30.9 vs. 18.2 respectively; $p < 0.001$) and absolute number (887.2 vs. 465.7 cells/ μ l; $p < 0.009$) of NK cells and a significantly lower percentage (4.2 and 8.3, respectively; $p < 0.001$) and absolute number (128.3 vs. 196.8; $p < 0.02$) of CD20⁺ B cells. Significant differences between patients and controls were observed in the percentage and absolute number of CD4⁺ T cells but not in the absolute number of CD8⁺ T cells ($p=0.634$). Peripheral blood samples from patients showed a higher percentage of the following lymphocyte subsets in comparison to controls: CD4⁺ CD45RO⁺ 72.7 vs. 63.1 ($p < 0.006$), CD8⁺ CD45RO⁺ 41.64 vs. 33.90 ($p < 0.02$), CD4⁺ DR⁺ 7.7 vs. 3.9 ($p < 0.001$), CD8⁺ DR⁺ 9.9 vs. 6.3 ($p < 0.001$) and CD4⁺ T regulatory (Tregs) cells (CD127^{low} CD25^{bright}) 6.9 vs. 5.9 ($p < 0.02$). Interestingly, a positive correlation was observed between the percentages of CD4⁺DR⁺, CD8⁺DR⁺, CD8⁺ CD45RO⁺, CD4⁺ CD39⁺, CD8⁺ CD39⁺ and CD4⁺ Treg subsets in the tumor sample and the percentages observed in peripheral blood. Thus, an increase in the percentage of CD4⁺DR⁺ cells in TT was accompanied by an increase in the percentage of CD4⁺DR⁺ cells in peripheral blood (see below).

Analysis of lymphocyte subsets in NSCLC patients

Among this series of 61 patients operated for NSCLC, statistically significant differences in immune cell density were found among the distinct regions sampled in each patient (TT, ATT, and DNNT). Figure 1 summarizes the results for each subpopulation analyzed.

Percentages of CD3⁺ T cells and CD20⁺ B cells were higher in TT (79.7 and 10.7, respectively) than in ATT (77.4 and 5.22) and DNTT (74.27 and 2.82). The difference between TT and DNTT was significant for both subsets ($p < 0.001$).

Most of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells had a memory-effector phenotype. However significant differences were observed in the percentage of these cells among the different regions. Memory T cells (CD4⁺ 45RO⁺ CD8⁺ CD45RO⁺) and Tregs cells (CD4⁺ CD25^{bright} CD127^{dim}) were more abundant in TT than in ATT or DNTT. CD4⁺ CD45RO⁺ count in TT (94.05) significantly differed ($p < 0.008$) from that in ATT (89.4) and DNTT (89.1). CD8⁺ CD45RO⁺ count in TT (73.5) significantly differed ($p < 0.002$) from that in ATT (64.9) and DNTT (61.8) samples. From a functional

viewpoint, T-cells predominantly expressed Th1 and Th17 markers in TT. Percentages of granulocytes and Th17 cells were positively correlated in TT ($p < 0.05$).

The percentage of CD4⁺DR⁺ cells was elevated in TT but did not significantly differ from that observed in DNTT. The percentage of CD8⁺DR⁺ cells was significantly ($p < 0.001$) higher in TT (30.9) than in ATT (22.10) or DNTT (18.58). In TT, the percentages of CD4⁺DR⁺ cells and CD8⁺DR⁺ cells were inversely correlated with the percentage of CD20⁺ B cells ($p < 0.01$).

The percentage of Tregs cells was significantly higher ($p < 0.001$) in TT (17.5) than in ATT (12.5 or DNTT (7.1). The percentage of CD4⁺CD39⁺ was significantly ($p < 0.001$) higher in TT (25.4) than in ATT or DNTT, and the percentage of CD8⁺CD39⁺ cells was

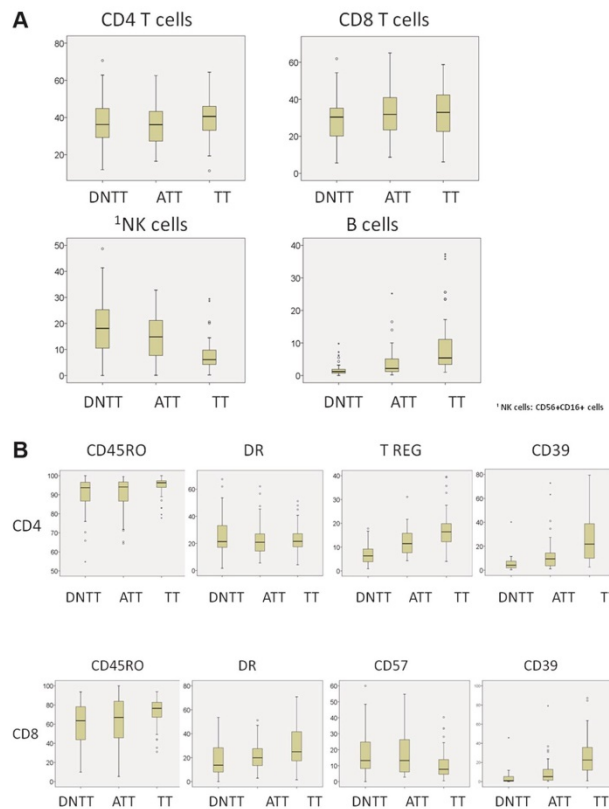


Figure 1: Analysis of immune cell density in tumor (TT), adjacent tumor (ATT), and distant non-tumor tissue (DNTT) samples from each patient. Upper horizontal line of box plot, 75th percentile; lower horizontal line of box, 25th percentile; horizontal bar within box, median value (in %) of each subpopulation analyzed; upper horizontal bar outside box, 90th percentile; lower horizontal bar outside box, 10th percentile. Circles represent outliers.

also significantly ($p < 0.02$) higher in TT (25.7) than in ATT or DNNT. Finally, an elevated percentage of fully-differentiated CD8⁺CD57⁺ cells was observed in the CD8⁺ T compartment (CD57 is a marker of T-cell exhaustion). In contrast to the above finding for CD39⁺, the percentage of CD8⁺ CD57⁺ T cells was significantly ($p < 0.01$) higher in DNNT (17.24) than in TT (11.2).

The balance between CD8/Tregs and Th1/Tregs has been shown to be important in tumor progression and prognosis in some studies of human cancer. The CD8/Tregs cell ratio was significantly ($p < 0.001$) higher in DNNT (17.8) than in TT (7.9), probably due to differences in T-regs and memory T- cells between the tissues. The Th1/T reg cell ratio was higher in DNNT (8.12) than in ATT (4.74) or TT (3.36), and the difference between TT and DNNT was significant ($p < 0.006$).

NK cells are characterized by the expression of CD56⁺ CD16⁺ and the absence of CD3. NK cells were increased in the peripheral blood and lung tissues of patients, with the highest percentage being observed in DNNT. The percentage was significantly ($p < 0.001$) lower in TT (7.39) than in ATT (14.48) or DNNT (19.74).

Various NK phenotypes were identified in the analyzed tissues depending on the CD56 and CD16 expression. The percentage of cytotoxic NK cells (CD56⁺ CD16⁺) was significantly ($p < 0.001$) lower in TT (22.8) than in ATT (40.29) or DNNT (44.45). In contrast, the percentage of CD56^{high} CD16⁻ NK cells, (non-cytotoxic producing cytokines phenotype), was significantly higher TT (9.3) than in ATT (4.95; $p < 0.03$) or DNNT (2.00; $p < 0.001$). Finally, the percentage of double-negative CD56⁻ CD16⁻ or single-positive CD56⁻ CD16⁺ immature NK phenotypes was also higher in TT but statistical significance was not reached, likely attributable to the low number of samples.

Analysis of TILs in relation to clinical-pathological features

Significantly higher percentages of CD4⁺CD39⁺ ($p < 0.03$) and CD8⁺CD39⁺ ($p < 0.02$) cells were found in samples from tumors with positron emission tomography (PET) standardized uptake value (SUV) ≤ 4.5 than in those from tumors with PET SUV > 4.5 .

The percentage of CD4⁺CD39⁺ cells was significantly higher ($p < 0.01$) in samples from tumors less than two centimeters in size than in those from larger tumors.

The most common histological tumor type was squamous cell carcinoma (31 cases), followed by adenocarcinoma (23 cases). A significantly higher percentage of CD3⁺ T ($p < 0.04$), CD8⁺ ($p < 0.03$), CD8⁺ CD45RO⁺ ($p < 0.01$), CD4⁺DR⁺ ($p < 0.02$), CD8⁺DR⁺ ($p < 0.05$), and CD8⁺ CD39⁺ ($p < 0.02$) cells were found in TT from an adenocarcinoma than in TT from a squamous cell carcinoma.

Immunohistochemical location and prognostic value of lymphocytic cell subpopulations

Location of lymphocytes and macrophages were studied in the invasive margin, stromal and within cancer nests in 42 patients (Figure 2A). The infiltration intensity of lymphocytes and macrophages was more evident in the invasive margin and in stroma surrounding tumor nests. Figure 3 provides an illustration of the immunohistochemistry results for the staining in stroma and invasive margins. In figure 3A depicts an example of hematoxylin-eosin staining. Mildly intensive infiltration of cancer nests (score of 2) was observed in 15 of the 42 cases. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were preferentially located in stroma and invasive margin (similar percentages of each), showing mild-moderate infiltration intensity. Figures 3C and 3D illustrate immunohistochemistry results for CD8 and CD45 staining, respectively.

There was a significantly higher frequency of CD8⁺ T- lymphocytes (15 cases) than of CD4⁺ T- lymphocytes (5 cases) in cancer nests.

The presence of Tregs in tissues was evaluated by analyzing the distribution and the absolute number of FoxP3⁺ Tregs. A higher number of Tregs were detected in stroma and tumor nest than in the corresponding invasive margin. There was a higher FoxP3⁺ cell count in stroma than in the other compartments. In 50% of studied cases, these cells were also observed within tumor nests, but with a mild infiltration intensity (score of 2). B cells were practically non-existent in tumor nests and were largely detected in the invasive margin and, to a lesser extent in the stroma. Figure 3B depicts an example of stromal staining for these cells. Finally, only a small number of cases showed the presence of macrophages (CD68) within cancer nests, with a score of 2; they were more prevalent in the stroma and even more so in the invasive margin in comparison to the other localizations.

Examination of the association of infiltration intensity and pattern with clinicopathological variables only revealed significant differences as a function of histological type and degree of differentiation. There was a higher T lymphocyte count in the stroma in adenocarcinomas than in squamous cell carcinomas ($p < 0.03$), attributable to differences in the CD4⁺ T subset ($p < 0.02$).

Significant differences as a function of the differentiation degree were only detected in T lymphocytes at the invasive margin, where CD4⁺ T cell infiltration was higher in well-moderately (69%) versus poorly (12.5%) differentiated tumors ($p < 0.05$), and CD8⁺ T cell infiltration was higher in well-moderately (64.3%) versus poorly (21.4%) differentiated tumors ($p < 0.04$). A higher percentage of CD8⁺ T cells was also found in well-moderately differentiated groups ($p < 0.024$) in tumor nests. A greater infiltration of FoxP3⁺ cells was observed

in the invasive margin in poorly *versus* well-moderately differentiated tumors ($p < 0.01$). However, the percentages of these subsets in the cancer nests were higher in well-moderately *versus* poorly differentiated groups ($p < 0.05$). Finally, the percentage of CD68⁺ macrophages in the invasive margin was higher in well-differentiated tumor *versus* poorly differentiated tumors (70% vs. 23.5%, respectively).

DISCUSSION

It is important to decipher the complex interactions of tumors with their microenvironments in order to understand anti-cancer defense systems [29]. The immune signature in NSCLC tumors was investigated in the present study, using a combination of immunohistochemistry and flow cytometry analysis. Comprehensive analysis of the majority of immune subsets that infiltrate NSCLC tumors demonstrated a wide host defense array and revealed the relevant role of different lymphocyte subsets in these patients. We analyzed the composition and distribution of immune subpopulations in peripheral blood, TT, ATT, DNNT, cancer nests, cancer stroma, and invasive margin, investigating the functional state of lymphocytes and the association of immune subsets with prognostic clinicopathological variables in NSCLC patients.

Our results showed a higher percentage of NK cells, memory T cells (CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RO⁺), activated T cells (CD4⁺DR⁺, CD8⁺DR⁺) and Tregs (CD4⁺CD25^{bright}CD127^{dim}) cells in the peripheral blood of NSCLC patients in comparison to the healthy controls, indicating a certain level of immune response in the patients. We cannot rule out the possibility that these differences were due to the presence of chronic obstructive

pulmonary disease, the most frequent comorbidity among the patients. However, the changes in cell subsets observed may also be induced directly, at least to some extent, by the tumor cells and/or tumor microenvironment, as indicated by our analysis of the lymphocyte subsets in these patients. Thus, the percentages of activated T cells and CD4-Tregs in peripheral blood samples were positively correlated with those in tumor samples from these NSCLC patients. The subpopulation of CD4⁺ Tregs cells was also more abundant in patients than in controls, consistent with the immunosuppressive status of the patients, which was confirmed in the analyses of lung tissues. These data show that study of the proportion of T cell subsets in peripheral blood can provide valuable information. These observations confirm those of other researchers in lung cancer [30–33] although previous reports indicated that alterations in immunoregulatory T cells in lung cancer are more pronounced in bronchoalveolar lavage fluid obtained from both lungs than in peripheral blood [34].

Infiltration of the tumor by cytotoxic CD8⁺ T-cells and memory CD4⁺ CD45RO⁺ cells proved to have prognostic discriminatory power, leading to a novel scoring system strongly correlated with the clinical outcome [29]. Tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes play important roles in anti-tumor immune responses and have prognostic value in various cancer types. Thus, immune infiltration in both the center and invasive margin of human colorectal tumors was associated with a favorable clinical outcome, while a low density of T cells was associated with a poor prognosis [7, 10, 28 29]. In most studies, immunoscores were based on immunohistochemistry techniques, which do not permit an in-depth characterization of the functional phenotype of T cells (activated or not, in an

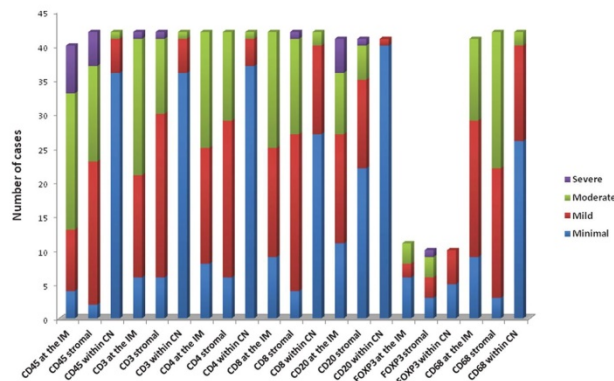


Figure 2: Immunohistochemistry results. (A) Intensity of the immunohistochemical staining of T lymphocytes (including memory T cells), B-lymphocytes and CD 68 (macrophages) in the invasive margin (IM), stromal and within cancer nests (CN) for samples analyzed. Severe (score of 4), Moderate (score of 3), Mild (score of 2), Minimal (score of 1).

energy state or not, or with maturation deficiencies or not). In the present study, an exhaustive and comprehensive analysis was carried using a combination of flow cytometry and immunohistochemistry, providing an in-depth characterization of the cellular components of a tumor biopsy specimen in comparison to DNTT and ATT samples from same patient. The results showed that T and NK cells are both highly heterogeneous in lung cancer and that some subpopulations may suppress the function of other immune cells, allowing the cancer cell to evade activation of immune system. The tumor samples showed a higher prevalence of cells with memory phenotype $CD4^+CD45RO^+$, a higher prevalence of $CD4^+$ versus $CD8^+$ T cells ($CD4 > CD8$), and a higher prevalence of Th1 versus Th17 phenotype, with a reduced presence of NK cells in TT. No significant differences in localization were found between $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells; however, $CD8^+$ T and especially $CD4^+$ T cells were excluded from direct contact with tumor and were trapped in the stroma or invasive margin (Figure 2). $CD8^+$ T cells were observed in tumor nests in a few cases, but always at a low density (Figure 3). Stromal cells in the tumor microenvironment (macrophages and cancer-associated fibroblasts) prevent the access of lymphocytes to tumor nests, leading to their accumulation in the vicinity of tumors [35].

Nevertheless, our data suggest the presence of some immunosuppressive factors that act from the center of tumor towards the outside and may affect and significantly disrupt the function of some immune subsets. Percentages of T and B cells were higher in TT than in

DNTT, at the expense of significant reduction in NK cells, and there was a higher percentage of memory T cells ($CD4^+CD45RO^+$, $CD8^+CD45RO^+$) and activated T cells ($CD8^+DR^+$) in TT. Parallel with this immune activation, TT showed: i) a higher percentage of Treg cells ($CD4^+CD25^{bright}CD127^{dim}$); ii) a lower CD8/Treg ratio, and iii) a lower Th1/Treg ratio and iv) higher percentage of T cells with immunosuppressive activity ($CD4^+CD39^+$ and $CD8^+CD39^+$) in comparison to DNTT ($p < 0.001$ and 0.02 , respectively).

Tregs may suppress the function of immune cells and allow lung cancer cells to evade escape, likely *via* cell interaction-dependent or cytokine-mediated suppression. However, the balance between T-effector and T-regs in tumors is known to determine the functional outcome of immune responses [36], and both Th1/Treg and CD8/Treg ratios were lower in TT than in DNTT. Although the precise mechanism of Tregs-mediated suppression has yet to be fully elucidated [37–39], at least part of the immunosuppressive effect may be exerted by CD39. This ectoenzyme serves as an integral component of the suppressive machinery of Tregs, inactivating and converting extracellular ATP into adenosine and allowing the immune escape of tumors [40–42]. CD39, which mediates immunosuppressive functions, is also present on different immune cell subsets. In non-Tregs cells, the expression of CD39 on CD4 and CD8 cells has been associated with energized [43] or exhausted T cells [44]. Furthermore, $CD8^+CD39^+$ T cells substantially inhibit IFN γ production by effector $CD8^+$ T cells *via* the paracrine

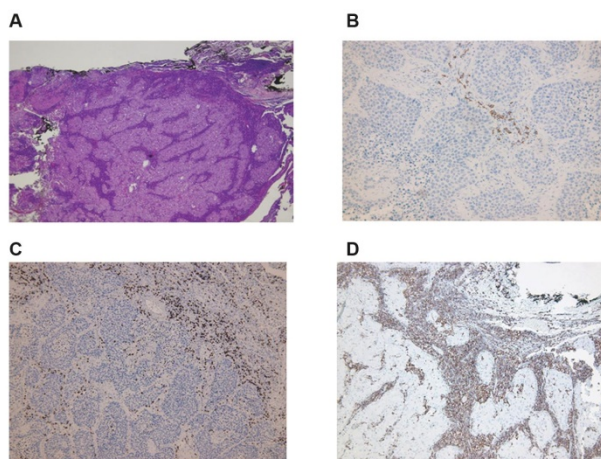


Figure 3: Immunohistochemistry results. The infiltration of lymphocytes was more intense in invasive margin and stroma surrounding tumor nests. (A) Hematoxylin-eosin staining of tissue; magnification X4 followed by computer magnification. (B) B lymphocyte (CD20) staining in stroma; magnification X20 followed by computer magnification. (C) $CD8^+$ staining in stroma and invasive margins; magnification X10 followed by computer magnification. (D) $CD45^+$ staining in stroma and invasive margins; magnification X10 followed by computer magnification.

generation of adenosine [45]. A marked accumulation of CD39⁺ T cells (both CD4 and CD8) in the lung tumor tissue was observed in the present study.

The accumulation of CD8⁺CD39⁺ in TT may be the result of chronic and persistent stimulation and could therefore be generated within the tumor. Indeed, CD39 was found to be a specific pathological marker of exhausted CD8⁺ T cells in chronic viral infection in humans and mouse models [45, 46]. CD57 is also a marker for exhausted senescent-T cells [47], but the presence of CD39⁺ exhausted CD8⁺ T cells in TT contrasts with the absence of CD8⁺CD57⁺ cells in TT.

Previous studies found that an increase in CD8⁺CD57⁺ (senescent) cells is associated with malignancy. Fully-differentiated CD8⁺CD57⁺ cells were abundant in peripheral blood of both patients and controls who showed similar values, attributable to the age-matching of the groups, but no CD8⁺CD57⁺ cells were observed in TT. Investigation of the role of these cells in cancer pathology has revealed their heterogeneity. Meloni et al found a significant level of FOXP3 expression in CD8⁺CD57⁺ cells from lung cancer patients, which they attributed to the immunosuppressive component of the antitumor immune response [41, 47]. Although the increase in this lymphocyte subset in peripheral blood may contribute to impairments in cellular activation and may play a role in the decreased immunologic responsiveness observed in NSCLC patients, these cells are not able to penetrate the tumor. Our results suggest that CD8⁺CD57⁺ senescent cells are generated outside the tumor but do not enter it. However, the accumulation of CD8⁺CD39⁺ T cells in TT indicates a subpopulation of dysfunctional, exhausted CD8⁺ T cells, probably as a result of chronic stimulation.

The true role of CD20⁺ B cells in anticancer immunity remains controversial. There is considerable evidence of a tumor-protective function for B cells by the production of antitumor antibodies and the induction of cytotoxic immune responses, but other studies have suggested that B cells may also exert tumor-promoting functions [48]. It has recently been observed that B cells are paracrine mediators of solid tumor development cytokines such as interleukin IL-4, IL-10, and transforming growth factor β (TGF β), which are among the most prominent immunosuppressive factors secreted by B cells in this setting [49–51]. In the present study, B-cells were practically non-existent in tumor nests and were preferentially located in the invasive margin when TT was analyzed by immunohistochemistry, while an inverse correlation between CD20⁺ B cells (high level in TT) and CD4⁺DR⁺ (activated T lymphocytes) was found in TT when analyzed by flow cytometry. In other words, an increase in B cells in TT was accompanied by a decrease in the percentage of CD4⁺DR⁺ cells and *vice-versa*. Furthermore, B cells in lung tumors can promote the suppression of CD8⁺ T-cell cytotoxicity and convert/recruit

CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs cells. In summary, our data suggest that the presence of B cell activities can also shift the balance of tumor specific immune response towards immunosuppression [48].

In the same way as effector T cells, NK cells are also involved in antitumor immunity. They comprise a heterogeneous functional population that can be divided into different subsets according to their surface expression [52, 53]. In the present NSCLC patients, a high percentage of NK cells with cytotoxic-phenotype (CD56⁺CD16⁺) were observed in peripheral blood, and these cells were also frequently located in DNTT. Around half of the tumor samples lacked HLA class I antigen expression (data not shown), and these two features make the cancer cells susceptible to NK cell attack. However, the most important study finding was the presence of two immune escape mechanisms: i) the exclusion of NK cells by cancer cells, given the very low percentage in ATT and the even lower percentage in TT; and ii) a progressive alteration in the phenotype of NK cells from HT to TT, leading to a non-cytotoxic phenotype or maturation alterations. Thus, whereas the dominant NK cell phenotype in the peripheral blood and DNTT was cytotoxic (CD56⁺ CD16⁺), the presence of cells with this phenotype was significantly decreased in ATT and even more so in TT. A low number of NK cells (CD56⁺ CD16⁺) in TT was previously attributed to their inefficient homing into malignant tissues [54, 55]. We also found a prevalence in TT of NK CD56^{bright} CD16⁻ (non-cytotoxic producing cytokines) and immature CD56⁺CD16⁻ (non-cytotoxic immature phenotype) subpopulations. These findings may have two hypothetical explanations: i) these NK phenotype changes may be induced directly at the tumor site, or there may be a preferential colonization of the tumor by NK cells at an early differentiation stage, following a specific chemokine-mediated migration pattern.

In summary, this study offers novel insights into the distribution and the phenotypic characteristics of different immune lymphocyte subpopulations. It provides the first comprehensive analysis of the immune infiltrate that shows quantitative and qualitative differences in subsets of immune infiltrate subpopulations among TT, ATT, and DNTT samples from the same patient. Our data showed how effector cells are mostly excluded from direct contact with cancer cells and are preferentially located in the stromal region, where an immunoprivileged space is generated, with a lack of cytotoxic response from T and NK cells, which may allow immune evasion in NSCLC patients and thereby contribute to cancer progression.

The immunologic response differed between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, with higher percentage of T lymphocytes detected by flow cytometry and immunohistochemistry in TT samples of the former, mainly located in the stroma. Immunohistochemistry studies showed that well-moderately differentiated tumors had a higher percentage

of tumor infiltrating lymphocytes, mainly in invasive margins and tumor nests, and a higher percentage of macrophages in invasive margins. These findings may indicate an improved immunological response in well-moderately differentiated tumors, consistent with their better prognosis in comparison to poorly-differentiated tumors, which had a higher percentage of FoxP3⁺ T reg cells, indicating an immunosuppressive state.

These data suggest that the evasion of immune surveillance by tumors is favored by the lack of penetration of tumor nests by certain immune subpopulations. This is in line with previous findings and may reflect the difficulty that immune cells attracted to the tumor site have in overcoming physical and endothelial barriers and penetrating tumor nests.

The present data on most of the innate and adaptive immune cells infiltrating tumors provide a more complete picture of the immune reaction in NSCLC, further revealing the complex interactions of tumors with their microenvironment.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

The study included samples from 61 NSCLC patients under treatment at Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain). All surgical samples were obtained for therapeutic and diagnostic purposes. Demographic, clinical, and histological characteristics of the patients are exhibited in Table 1. Samples were obtained from 32 sex-matched healthy blood donors aged between 50 and 80 years (controls).

All blood samples were drawn after overnight fasting. Plasma samples obtained by centrifugation of part of each sample were stored at -20°C until use. The remaining blood samples were directly labeled with antibodies for flow cytometry (FCM).

Tumor samples were taken from primary malignant lung tumors of non-treated patients by excision of a fragment of tumor mass \geq 100 mg during the initial surgery for the disease. After lung resection, half of the piece was immediately immersed in PBS solution and immediately analyzed by flow cytometry. The other half was fixed in buffered formalin and embedded in paraffin, and 3–4 micrometer sections were cut for conventional hematoxylin-eosin staining to evaluate tumor contents. All tumor samples had their paired adjacent tissue and distant non-tumor tissue samples. Only those with \geq 50% tumor cells were selected (\approx 70% of samples had $>$ 70% tumor cells). Because preneoplastic molecular changes may take place in adjacent non-tumor tissue, distant non-tumor tissue samples (mass \geq 500 mg) were taken from clinically tumor-free quadrants in the resected specimen as far as possible from the tumor. Adjacent tumor samples were taken from neighboring adjacent lung tissue with no

macroscopic tumoral appearance located at approximately one centimeter from the periphery of the tumor. Distant non-tumor and adjacent tumor tissue samples underwent meticulous histological analysis to guarantee the complete absence of epithelial tumor cells.

Before the study, all medical records and tumor sections were reviewed by an oncologist and a surgical pathologist. Informed consent was obtained from all patients and healthy controls for participation in the study, which complied with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983, and was approved by the human research ethics committee of our institution.

Stages were determined after pathologic evaluation of resected specimens according to the 7th Edition of TNM in Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer Staging Committee in 2009 [56].

Flow cytometry analysis

Flow cytometry analyses were carried out in TT, ATT, and DNTT samples, which were washed twice with PBS and resuspended in 0.5 mL of PBS for FCM analysis. GentleMACS™ Tubes (Miltenyi Biotec, Germany) were used for the dissociation and homogenization of samples. Each sample was processed twice, filtered, washed, and resuspended in 100 microliter of PBS; 20 microliter of sample tissue was added to labeled tubes containing specific antibodies for different lymphocytic populations and was incubated for 20 minutes at room temperature before addition of 1 ml red blood cell lysis buffer (BD Pharmalyse). Supplementary File 1 reports details of the flow cytometry analysis and the specific monoclonal antibodies used to identify the different lymphocytic populations.

Immunohistochemistry and image analysis

Tissue samples were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Details of the immunohistochemistry staining and analysis are described in Supplementary File 1.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (IBM, Chicago IL). Shapiro Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests were used to check the normality of variable distribution. Variables with normal distribution are expressed as means \pm standard deviation and those with non-normal distribution as medians with interquartile range. Results were compared between groups using a *t*-test for normally-distributed variables and a non-parametric test (Wilcoxon or Mann Whitney Test) or ANOVA or the Kruskal Wallis test for those with non-normal distribution. Categorical variables (sex, tumor stage, tumor size) were grouped into two groups and analyzed using the chi-square (X^2) or Fisher exact Test.

Table 1: Demographic, clinical, and histological characteristics of the study subjects

Variable	NSCLC <i>n</i> = 61	Healthy subjects <i>n</i> = 32
Gender <i>n</i> (%):		
Female	11 (18)	13 (40.6)
Male	50 (82)	19 (59.4)
Age, years, median (range)	66 (45–82)	62 (49–84)
Smoking history:		
Non-smoker	3 (5)	16 (50)
Ex-smoker	28 (46)	5 (15.6)
Smoker	30 (49)	15 (34.4)
Smoking pack-years, median (range)	55 (0–120)	7.78 (0–40)
Tumor size, median (range)	3.80 (0.5–9.5)	
Histological NSCLC subtype:		
Lung Adenocarcinoma	23 (36.1)	
Squamous cell carcinoma	32 (53.9)	
Metastasis from other cancer	6 (10)	
NSCLC stage:		
Stage IA	21 (36)	
Stage IB	18 (28)	
Stage IIA	13 (21.3)	
Stage IIB	7 (11.5)	
Stage IIIA	2 (3.3)	
T status:		
T1a	13 (20)	
T1b	10 (16)	
T2a	18 (29.5)	
T2b	11 (19)	
T3	8 (13.9)	
T4	1 (1.6)	
N status:		
Nx	4 (6.6)	
N0	45 (73.8)	
N1	6 (9.8)	
N2	6 (9.8)	
Differentiation:		
Moderate	27 (43)	
Good	11 (17.4)	
Poor	15 (24.6)	
SUVs PET, median (range)	9.52 (0–26.2)	

Correlation coefficients were calculated to evaluate the strength of linear associations. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to M^a Dolores Rodriguez Martinez for assistance with the immunohistochemical analysis of the tumor samples and to Eva Garcia Huertas for assistance with the flow cytometry analysis. This study forms part of the doctoral thesis of M^a del Mar Valenzuela Membrives.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This study was supported by Neumosur [grant N^o 16/2014 to AS-P].

REFERENCES

- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83:584–94.
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. *Nature Rev Cancer.* 2012; 12:298–306.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. *CA Cancer J. Clin.* 2006; 56:106–30.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2006; 6:295–307.
- Atreya I, Neurath M.F. Immune cells in colorectal cancer: Prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer.* 2008; 8:561–572.
- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pages F, Galon J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22:215–222.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006; 313:1960–1964.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011; 29:610–8.
- Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantuejoul S, Dunant A, Graziano S, Pirker R, Douillard JY, Le Chevalier T, Filipts M, Rosell R, Kratzke R, Popper H, et al. Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small cell lung cancer. *J of Clin Oncol.* 2016; 34:1223–30.
- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22:231–7.
- Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27:5944–51.
- Ronald J. deLeeuw, Sara E. Kost, Juzer A. Kakal, and Brad H. Nelson. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clinical Cancer Research.* 2012; 18:3022–29.
- Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, Okabe K, Matsumoto T, Sugi K, Ueoka H. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012; 75:95–101.
- Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res.* 2013; 73:3591–603.
- Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews Immunology.* 2007; 7:329–39.
- Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ. Can NK cells be a therapeutic target in human diseases? *Eur J Immunol.* 2008; 38:2964–68.
- Cervenka A, Falk CS, Watzl C. NK cells—from basic research to cancer therapy. *Eur J Immunol.* 2007; 37:1161–64.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells *Science.* 2011; 331:44–9.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology.* 2008; 9:503–1.
- Sun JC, Lanier LL. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol.* 2009; 39:2059–64.
- Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT, Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, Guzmán CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* 2010; 116:3853–64.
- Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK Cell Terminal Differentiation: Correlated Stepwise Decrease of NKG2A and Acquisition of KIRs. *PLoS One.* 2010; 5:e11966.

23. Jonsson AH, Yokoyama WM. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol.* 2009; 101: 27–79.
24. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 2005; 436:709–713.
25. Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *Journal of Clinical Investigation.* 2011; 121:3609–22.
26. Brodin P, Karre K, Hoglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends in Immunology.* 2009; 30:143–149.
27. Elliott JM, Wahle JA, Yokoyama WM. HC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I- sufficient environment. *Journal of Experimental Medicine.* 2010; 207:2073–79.
28. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulat DH. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *Journal of Experimental Medicine.* 2010; 207:2065–72.
29. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, and Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: Prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity.* 2013; 39:11–26.
30. Dehghani M, Sharifpour S, Amirghofran Z, Zare HR. Prognostic significance of T cells subsets in peripheral blood of B cell non-Hodgkin's lymphoma patients. *Med Oncol.* 2012; 29:2364–71.
31. Zikos TA, Donnenberg AD, Landreneau RJ, Luketich JD, Donnenberg VS. Lung T-cell subset composition at the time of surgical resection is a prognostic indicator in non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60:819–27.
32. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2005; 14:1269–73.
33. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gonsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:606–12.
34. Fracchia A, Pacetti M, Barberis M, Mura MA, Le Grazie C, Longhini E. Determination of T lymphocyte subpopulations in patients with lung cancer. A comparison between lung lavage and peripheral blood by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Respiration.* 1987; 51:161–9.
35. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science.* 2015; 348:74–80.
36. Roychoudhuri R, Eil RL, Restifo NP. The interplay of effector and regulatory T cells in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2015; 33:101–11.
37. Chen C, Chen D, Zhang Y, Chen Z, Zhu W, Zhang B, Wang Z, Le H. Changes of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ and CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. *Int Immunopharmacol.* 2014; 18:255–61.
38. Fu HY, Li C, Yang W, Gai XD, Jia T, Lei YM, Li Y. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: implications for tumor progression and escape. *Acta Histochem.* 2013; 115:151–157.
39. Ciebiada M, Kaszalska K, Gorska-Ciebiada M, Barylski M, Gorski P. Expression of IL-7 receptor in human peripheral regulatory T cells. *Arch Med Sci.* 2013; 9:555–60.
40. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol.* 1994; 153:3574–83.
41. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sévigny J, Matsue H, Enjoji K, Takashima A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med.* 2002; 8:358–365.
42. Cai XY, Wang XF, Li J, Dong JN, Liu JQ, Li NP, Yun B, Xia RL. Overexpression of CD39 and high tumoral CD39⁺/CD8⁺ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8:14757–64.
43. Umansky V, Shevchenko I, Bazhin AV, Utikal J. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63:1073–80.
44. Gupta PK, Godec J, Wolski D, Adland E, Yates K, Pauken KE, Cosgrove C, Ledderose C, Junger WG, Robson SC, Wherry EJ, Alter G, Goulder PJ, et al. CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8⁺ T Cells. *PLoS Pathog.* 2015; 11:e1005177.
45. Bai A, Moss A, Rothweiler S, Longhi MS, Wu Y, Junger WG, Robson SC. NADH oxidase-dependent CD39 expression by CD8⁺ T cells modulates interferon gamma responses via generation of adenosine. *Nat Commun.* 2015; 9:68819.
46. Strioga M, Pasukoniene, Characiejus D. CD8⁺ CD28⁻ and CD8⁺ CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011; 134:17–32.
47. Meloni F, Morosini M, Solari N, Passadore I, Nascimbene C, Novo M, Ferrari M, Cosentino M, Marino F, Pozzi E, Fietta AM. Foxp3 expressing CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol.* 2006; 67:1–12.

48. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013; 1;2:e25443.
49. Gunderson AJ, Coussens LM. B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Exp Cell Res*. 2013; 319:1644–9.
50. Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, Baumann U, Zwirner J, Schmidt RE, Gessner JE. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR1s in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest*. 2002; 110:1823–1830.
51. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions. *Methods Mol Biol*. 2008; 415:151–162.
52. Huntington ND, Voshenrich CAJ, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7:703–714.
53. Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketic AK, Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203:1033–43.
54. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol*. 2003; 24:603–9.
55. Lee SH, Jo EJ, Eom JS, Mok JH, Kim MH, Lee K. Predictors of Recurrence after Curative Resection in Patients with Early-stage Non-small Cell Lung Cancer. *Tuberc Respir Dis*. 2015; 78:341–48.
56. Goldstraw P. (Ed) *Staging Manual in Thoracic Oncology*. Editorial EXPress. 2015.