



VNiVERSIDAD D SALAMANCA

TESIS DOCTORAL

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES PRONÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS EN EL CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS ESCAMOSAS. CORRELACIÓN CLÍNICO- PATOLÓGICA

Programa de doctorado: Cirugía y Odontoestomatología

Ciencias de la Salud

Departamento de Biología Celular y Patología

Facultad de Medicina

Director: Dra. María Dolores Ludeña de la Cruz

Codirector: Dr. José María Sayagués Manzano

Luis Miguel Chinchilla Tábora

2023



Los Dres. Dña. María Dolores Ludeña de la Cruz, Catedrático de Anatomía Patológica, Universidad de Salamanca y D. José María Sayagués Manzano, Investigador Asociado al Sistema Nacional de Salud del Instituto Carlos III y profesor asociado de la Universidad de Salamanca, como directores de la tesis doctoral titulada **“Búsqueda de biomarcadores pronósticos y terapéuticos en el carcinoma pulmonar de células escamosas. Correlación clínico-patológica”**, de la que es autor D. Luis Miguel Chinchilla Tábora.

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Doctoral realizado bajo nuestra dirección reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el Tribunal Calificador para optar al **Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.**

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente Certificado en Salamanca a 09 de octubre de dos mil veintitrés.

Fdo.: Dña M^a Dolores Ludeña de la Cruz

Fdo.: José María Sayagués Manzano

Dedicatoria

A mis padres

“Uno no alcanza la iluminación fantaseando sobre la luz sino haciendo consciente la oscuridad... lo que no se hace consciente se manifiesta en nuestras vidas como destino”

Carl Gustav Jung

Agradecimientos

Quiero aprovechar esta oportunidad para agradecer a las siguientes personas, siendo consciente que muchas personas influyentes en mi vida no figurarán en esta lista, pero deben saber que siempre les estaré infinitamente agradecido por haber estado desde el principio ayudándome a ser una mejor persona y profesional.

1. En primer lugar, quiero agradecer a **mi familia**: mis padres Eligio Chinchilla y Gumerinda Tábor y mis hermanos Francisco A. y Ramón E. por haber creído en mí siempre y por ser mi apoyo y mi mayor motivación desde la distancia.

2. **A mis directores de tesis, los Doctores:**

Dra. María Dolores Ludeña de la Cruz: Licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid, Especialista en Anatomía Patológica, Doctora por la Universidad Complutense de Madrid, Catedrática de Anatomía Patológica del Departamento de Biología Celular y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Investigadora principal del grupo de investigación CANC-25 del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Le agradezco el haber creído en este proyecto de tesis doctoral desde el principio, por enseñarme que a veces es mejor avanzar despacio, creyendo en el esfuerzo personal y terminar alcanzando los objetivos, que abandonar un proyecto ante cualquier circunstancia adversa. Siempre le estaré agradecido por su apoyo en todo lo relacionado con mi carrera profesional.

Dr. José María Sayagués Manzano: Licenciado en Biología en 1998 y Doctor en Medicina y Cirugía en 2005, por la Universidad de Salamanca, España. Actualmente es Investigador del Sistema Nacional de Salud y director del laboratorio de patología molecular del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca. Ha participado en la creación del grupo de investigación CANC-25 de Patología Molecular en el ámbito del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL). Es profesor asociado del departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca, siendo su principal línea de investigación la caracterización genómica de los tumores del aparato digestivo, que ha venido desarrollando desde hace más de una década. Actualmente está aplicando nuevas técnicas de Biología Molecular en la rutina hospitalaria para la detección de biomarcadores en sangre periférica de pacientes con cáncer. Le agradezco por todo el apoyo moral, intelectual y científico que me ha dado para llegar a buen puerto con este proyecto de tesis doctoral. Gracias por creer en mi capacidad. En especial quiero agradecerle por haber estado siempre disponible para ayudarme a entender mejor el lenguaje de las moléculas en ese universo llamado cáncer.

3. Gracias **“I”** por encontrarme y traer color a mi vida cuando todo parecía gris. Los cafés que acompañan esas conversaciones “filosóficas/filológicas”, las risas, las escapadas turísticas, la comida y por supuesto la música, todo eso y más es mejor si estás tú. Gracias por tu tiempo y apoyo incondicional.

4. A los **servicios de Cirugía Torácica y Oncología Médica** del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, quienes han intervenido directa e indirectamente en el desarrollo de este trabajo.

5. A **mis maestros y amigos** quienes me han enseñado a ser mejor como persona y profesional y que, aunque no haya compartido con ellos todo el tiempo que me habría gustado, saben que los llevo conmigo allá donde voy.

6. Finalmente, a **los pacientes** que padecen esta enfermedad. Ellos son la piedra angular alrededor de la cual gira este trabajo de investigación y sin quienes no tendría sentido tanto esfuerzo y dedicación.

NUMÉRICO

1q:	Brazo largo del cromosoma 1.
3:	Cromosoma 3.
3D-CRT:	Radioterapia conformada tridimensional.
3p:	Brazo corto del cromosoma 3.
3q14:	Locus 14 del brazo largo del cromosoma 3.
3q34:	Locus 34 del brazo largo del cromosoma 3.
5:	Cromosoma 5.
5p15:	Locus 15 del brazo corto del cromosoma 5.
5p15.2:	Locus 15.2 del brazo corto del cromosoma 5.
5q31:	Locus 31 del brazo largo del cromosoma 5.
6:	Cromosoma 6.
7:	Cromosoma 7.
7p:	Brazo corto del cromosoma 7.
7p11:	Locus 11 del brazo corto del cromosoma 7.
7p11.1:	Locus 11.1 del brazo corto del cromosoma 7.
7p12:	Locus 12 del brazo corto del cromosoma 7.
7q31:	Locus 31 del brazo largo del cromosoma 7.
8:	Cromosoma 8.
8p:	Brazo corto del cromosoma 8.
8p11.1:	Locus 11.1 del brazo corto del cromosoma 8.
8q:	Brazo largo del cromosoma 8.
8q24:	Locus 24 del brazo largo del cromosoma 8.
9p:	Brazo corto del cromosoma 9.
9p11.1:	Locus 11.1 del brazo corto del cromosoma 9.

9p21:	Locus 21 del brazo corto del cromosoma 9.
12q:	Brazo largo del cromosoma 12.
13q14:	Locus 14 del brazo largo del cromosoma 13.
13q34:	Locus 34 del brazo largo del cromosoma 13.
17p:	Brazo corto del cromosoma 17.
17q:	Brazo largo del cromosoma 17.
22c3:	Clon 22C3 para determinación inmunohistoquímica de PD-L1.
22q11:	Locus 11 del brazo largo del cromosoma 22.
22q11.2:	Locus 11.2 del brazo largo del cromosoma 22.
22q12:	Locus 12 del brazo largo del cromosoma 22.
28-8:	Anticuerpo para determinación inmunohistoquímica de PD-L1.
34βE12:	Citoqueratina de alto peso molecular 34βE12
73-10:	anticuerpo para detección de niveles de PD-L1

ALFABÉTICO

A

aCGH: matrices de hibridación genómica comparativa

ACTB: actina- β

ADC: adenocarcinoma

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNct: ADN tumoral circulante

AJCC: American Joint Commission on Cancer

AKT: AKT serina/treonina quinasa

AKT1: AKT serina/treonina quinasa 1

ALK: receptor de tirosina quinasa del linfoma anaplásico

aNSP: matriz de polimorfismo de nucleótido simple

ARG1: arginasa 1

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ASCL4: factor de transcripción bHLH de la familia achaete-scute 4

B

B2M: beta-2-microglobulina

BAL: lavado broncoalveolar

BAS: aspirado bronquial

BAX: regulador de apoptosis X asociado a Bcl2 (BCL2L4).

Bcl2: regulador de apoptosis Bcl2

BCL2L1: Bcl2 tipo 1

BIM: Proteína 11 similar a Bcl-2

BL: biopsia líquida

BST2: antígeno 2 de células estromales de médula ósea

C

CCL19: Ligando de quimiocina con motivo CC 19

CCND1: ciclina D1

CCR2: Receptor 2 de quimiocinas con motivo CC

CCR4: Receptor 4 de quimiocina con motivo CC

CCR5: Receptor 5 de quimiocina con motivo CC

CD: grupo de diferenciación

CD3: grupo de diferenciación 3

CD3G: Subunidad gamma CD3 del complejo receptor de células T

CD8: grupo de diferenciación 8

CD8A: subunidad α de CD8

CD8B: subunidad β de CD8

CD19: grupo de diferenciación 19

CD27: grupo de diferenciación 17

CD31: grupo de diferenciación 31

CD34: grupo de diferenciación 34

CD40LG: ligando de CD40

CD56: molécula de adhesión de células neurales 1

CD274: grupo de diferenciación 274

CEP: centrómero (sondas de enumeración de centrómeros)

CIS: carcinoma in situ

CD3G: subunidad γ de CD3 del complejo receptor de células T

CDK: quinasa dependiente de ciclina

CDK4: quinasa dependiente de ciclina 4
CDK4/6: quinasas 4 y 6 dependientes de ciclina
CDK6: quinasas 6 dependientes de ciclina
CDKN2A: inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2^a
CK5/6: citoqueratinas 5 y 6
CLPTM1L: proteína relacionada con la resistencia al cisplatino tipo 1
CMYC: proto-oncogén MYC.
CP: cáncer de pulmón
CPCE: carcinoma pulmonar de células escamosas
CPCNP: carcinoma pulmonar de célula no pequeña
CPS: puntuación positiva combinada
CRKL: proteína adaptadora tipo protooncogén CRK
CTC: células tumorales circulantes
CTEC: células endoteliales vasculares tumorales circulantes
CTLA3: Serina esterasa-3 asociada a linfocitos T citotóxicos
CTLA-4: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxico
CUL3: cullín 3
CVN: variación en el número de copias
CXCL9: ligando de quimiocina con motivo C-X-C 9
CXCL10: ligando de quimiocina con motivo C-X-C 10
CXCL11: ligando de quimiocina con motivo C-X-C 11
CXCL13: ligando de quimiocina con motivo C-X-C 13
CXCL16: ligando de quimiocina con motivo C-X-C 16
CXCR6: Receptor de quimiocina con motivo C-X-C 6

D

D2-40: podoplanina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DDR2: discoidina 2

DE: displasia escamosa

DEPC: dietilpirocarbonato

DUSP: fosfatasa de doble especificidad

DUSP1: fosfatasa de doble especificidad 1

DUSP4: fosfatasa de doble especificidad 4

DUSP6: fosfatasa de doble especificidad 6

E

EBUS: ecografía endobronquial

EBUS-PAAF: punción aspiración con aguja fina guiada por ecografía endobronquial

EBUS-TBN: aspiración transbronquial con aguja guiada por ecografía transbronquial

ECO-TT: ecografía transtorácica

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

EGFR-TKI: inhibidores de tirosín Kinasa de EGFR

ERG: ERG del factor de transcripción ETS

ERK: EPH receptor B2

ERK1/2: proteína quinasa 3 activada por mitógenos. Quinasa regulada por señales extracelulares

EYS: Ojos cerrados homóloga

F

FASLG: superfamilia del factor de necrosis tumoral (ligando), miembro 6

FCRL2: receptor FC tipo 2

FDA: administración de fármacos y alimentos de los Estados Unidos

FFPE: fijación en formol e inclusión en parafina
FGF: factor de crecimiento fibroblástico
FGF110: factor de crecimiento de fibroblastos 110
FGF16-18: factor de crecimiento de fibroblastos 16-18
FGF19: factor de crecimiento de fibroblastos 19
FGF20: factor de crecimiento de fibroblastos 20
FGF21: factor de crecimiento de fibroblastos 21
FGF23: factor de crecimiento de fibroblastos 23
FGFR1: receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico
FGFR2: receptor 2 del factor de crecimiento fibroblástico
FGFR3: receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico
FGFR4: receptor 4 del factor de crecimiento fibroblástico
FGL2: fibrinógeno tipo 2
FHIT: triada frágil de histidina
FISH: hibridación *in situ* fluorescente
FOXP1: caja de horquilla P1
FTL1: polipéptido ligero de ferritina 1

G

G1: grado 1
G12C: mutación conductora (driver) oncogénica de *KRAS*
G2: grado 2
G3: grado 3
G4: grado 4
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GEP: perfil de expresión génica
GPLY: granulisin

GSK3: quinasa glicógeno-sintetasa3

GZMA: granzima A

GZMB: granzima B

GZMH: granzima H

H

HER: erbB del receptor de tirosina quinasa

HER1: EGFR/erbB 1

HER2: neu, erbB2

HER3: erbB3

HER4: erbB4

HLA-A: complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, A

HLA-B: complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, B

HLA-DRB1: complejo mayor de histocompatibilidad, clase II, DR beta 1

HLA-I: antígenos HLA de clase I.

I

ICI: inhibidores de punto de control inmunitarios

IDO1: indolamina 2,3-dioxigenasa 1

IFNG (IFN- γ): interferón gamma

IGF1: receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1

IgG1: inmunoglobulina G1.

IHQ: inmunohistoquímica

IMRT: radioterapia de intensidad modulada

IRF8: factor regulador de interferón 8

IRGAL: subunidad de integrina alfa L

ISEL: iressa survival evaluation in lung cancer

ITGAL: subunidad de integrina alfa L

ITK: quinasa de células T inducible por IL2

J

JAK: Janus quinasa

K

KDR: receptor de dominio de inserción de quinasa

KEAP1: kelch tipo proteína asociada a ECH 1

KIT: protooncogén KIT, receptor tirosina quinasa

KLRK1: receptor tipo lectina K1 de células asesinas

KMT2: metiltransferasa específica de lisina K 2

KRAS: protooncogén KRAS, GTPasa

L

LAG3: activación de linfocitos 3

LCK: protooncogén LCK, tirosina quinasa de la familia Src

LCR: líquido cefalorraquideo

LSI: sonda FISH para ganancias o pérdidas de la región estudiada

LYZ: lisozima

M

M1: metástasis a distancia

mAb: anticuerpos monoclonales neutralizantes

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MAPK1: proteína quinasa activada por mitógenos 1

MCM2: proteína de mantenimiento de microsoma 2

MDM2: doble minuto 2, homólogo humano de ratón; proteína de unión a p53 (protooncogén MDM2).

MEK: proteína quinasa activada por mitógenos

MET: protooncogén MET, receptor tirosina quinasa

miARN: microARN

MIB1: MIB E3 ubiquitina proteína ligasa 1

MIB E3 ubiquitina proteína ligasa 1

MKP: fosfatasa de doble especificidad

ML: metástasis leptomeníngea

MLL2 (KMT2D): lisina metiltransferasa 2D

MLPA: amplificación dependiente del ligando multiplex

MMP1: metaloproteasa de la matriz 1

MMP11: metaloproteasa de la matriz 11

MMP3: metaloproteasa de la matriz 3

MMP7: metaloproteasa de la matriz 7

MMP9: metaloproteasa de la matriz 9

MS4A1: membrana que abarca 4 dominios A1

mTOR: objetivo mecanicista de la rapamicina quinasa

mTORC1: objetivo de mamífero del complejo de rapamicina 1

mTORC2: objetivo de mamífero del complejo de rapamicina 2

MYC: protooncogén MYC, factor de transcripción bHLH

N

NF1: neurofibromatosis tipo 1

NFE2L1: factor nuclear eritroide 2 tipo 1

NFE2L2: factor nuclear eritroide 2 tipo 2

NGS: secuenciación de nueva generación

NKG5: granulicina

NKG7: proteína granular de células asesinas naturales 7

NOTCH1: receptor homólogo 1 de NOTCH (drosophila)

NOTCH2: receptor homólogo 1 de NOTCH (drosophila)

NRF2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2

NT5E: 5'-nucleotidasa ecto

NTRK: receptor neurotrófico tirosina quinasa

O

OAS3: 2'-5'-oligoadenilato sintetasa 3

OMS: organización mundial de la salud

P

P: grupo fosfato

P14: oncogén p14

p14ARF: inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A

P16: proteína supresora de tumores codificada por CDKN2A

p16INK4a: inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A

P40: proteína tumoral 40
P63: proteína tumoral 63
PAAF: punción aspiración con aguja fina
PCI: inhibidores de puntos de control inmunitarios
PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación
PD1: muerte celular programada 1 ligando 1
PDCD1: muerte celular programada 1
PDGFRA: receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada
PDYN: prodinorfina
PET: tomografía por emisión de positrones
PET-TC: tomografía computada- por emisión de positrones
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
PIK3CA: subunidad catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa
PIP2: fosfatidilinositol 4,5-trifosfato
PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PL: pleura
PLC γ : isoforma de fosfoinositida fosfolipasa C
PNO: prepronociceptina
PRKM1: proteína quinasa 1 activada por mitógenos
PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina
PTGER1: receptor 1 de prostaglandina E

R

RAF: protooncogén RAF, serina/treonina quinasa
RARB: receptor del ácido retinoico
RAS: protooncogén RAS.

RB1: retinoblastoma 1

Real Time-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

RET: protooncogén RET, receptor tyrosine kinase

RMN: resonancia magnética nuclear

RNAseq: ARN secuenciado

ROC: característica operativa del receptor.

ROS: especies reactivas a oxígeno

ROS1: protooncogén ROS 1, receptor tirosina quinasa

RPAS: resección pulmonar anatómica sublobar

RTK: receptor de tirosina quinasa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

RX: rayos X

S

SABR: radioterapia ablativa estereotáctica

SBRT: radioterapia corporal estereotáctica

SEAP: Sociedad Española de Anatomía Patológica

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SG: supervivencia global

SLP: supervivencia libre de progresión

SNC: sistema nervioso central

SOX2: factor de transcripción de caja-SRY 2

SP142: anticuerpo para la determinación inmunohistoquímica de PD-L1

SP263: pseudogen ribosomal 263

SRS: radiocirugía estereotáctica

STAT: transductor de señal y activador de la transcripción

STK11: serina/treonina quinasa 11

SUVMAX: valor máximo de captación estandarizado

T

T790M: (Thr 790 Met). Mutación de resistencia a terapia anti-Tirosina Quinasa de *EGFR*.

TAC: tomografía axial computarizada

TACAR: tomografía axial computarizada de alta resolución

TBX21: factor de transcripción de caja T 21

TCGA: atlas del genoma del cancer

TCR: receptor de antígeno de células T

TEP: plaquetas sanguíneas educadas en tumores

TERT: telomerasa transcriptasa inversa

TLR7: receptor tipo toll 7

TLR8: receptor tipo toll 8

TMA: tissue microarray (matriz tisular)

TMB: tumor mutational burden

TME: microambiente tumoral

TNM: tumor, nódulos linfáticos, metástasis

TP53: proteína tumoral p53

TP62: proteína de fusión TgTCEB1

TP63: proteína tumoral p63

TP73: proteína tumoral p73

TTF-1: factor de transcripción tiroidea 1

TUBB: tubulina β clase 1

U

UICC: Union for International Cancer Control (Unión Internacional para el control del Cáncer)

V

VATS: cirugía toracoscópica asistida por video

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular- A

VEGF-B: factor de crecimiento endotelial vascular- B

VEGF-C: factor de crecimiento endotelial vascular- C

VEGF-D: factor de crecimiento endotelial vascular- D

VEGF-E(105): factor de crecimiento endotelial vascular- E

VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR2: receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular

VPH: virus del papiloma humano

W

WHSC1L1: Proteína 3 del dominio SET de unión al receptor nuclear (Síndrome de Wolf-Hirschhorn candidato 1-tipo 1)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	29
1.1 Carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE): aspectos clínicos y biológicos de la enfermedad.....	29
1.2 Etiología y patogénesis del CPCE.....	30
1.3 Presentación clínica del CPCE.....	32
1.3.1 Signos y síntomas relacionados con la lesión primaria y la diseminación intratorácica.....	32
1.3.2 Signos y síntomas relacionados con las metástasis.....	33
1.3.3 Signos y síntomas relacionados con síndrome paraneoplásico.....	33
1.4 Pruebas diagnósticas.....	33
1.4.1 Pruebas de imagen.....	34
1.4.2 Tomografía axial computarizada (TAC).....	34
1.4.3 Tomografía por emisión de positrones (PET).....	34
1.4.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	35
1.4.5 Gammagrafía ósea.....	35
1.5 Pruebas para la obtención de tejido tumoral para el diagnóstico histopatológico del tumor y toma de decisiones terapéuticas.....	36
1.5.1 Biopsia.....	36
1.5.2 Broncoscopia.....	36
1.5.3 Biopsia por aspiración con aguja (transtorácica).....	37
1.5.4 Toracocentesis.....	37
1.5.5 Toracoscopia.....	37
1.5.6 Mediastinoscopia.....	38
1.5.7 Toracotomía.....	38
1.6 Diagnóstico anatomopatológico.....	38
1.6.1 Características macroscópicas.....	38
1.6.2 Características histopatológicas del CPCE.....	39
1.6.3 Grado histológico del CPCE.....	40
1.6.4 Características inmunohistoquímicas del CPCE.....	41
1.6.5 Estadio patológico TNM.....	41
1.7 Origen de la célula neoplásica en el CPCE.....	44
1.7.1 Lesiones precursoras y preinvasivas.....	44
1.8 Biología molecular del CPCE.....	46
1.8.1 Generalidades.....	46
1.8.2 Panorama genómico del carcinoma pulmonar de células escamosas.....	46

1.9	Alteraciones moleculares, vías de señalización, biomarcadores y dianas terapéuticas en CPCE.....	47
1.9.1	Alteraciones moleculares del CPCE.....	47
1.9.2	Vías de señalización en el CPCE.....	48
1.9.2.A.	Vía de señalización de EGFR.....	48
1.9.2.B.	Vía de señalización PI3K.....	51
1.9.2.C	Vía de señalización CDK4/6 en el ciclo celular del CPCE.....	52
1.9.2.D	Vía de señalización VEGF-VEGFR.....	52
1.9.2.E	Vía de señalización FGFR1.....	53
1.9.2.F	Vía de señalización de KEAP1/NRF2.....	54
1.9.3	Biomarcadores predictivos y dianas terapéuticas en el CPCNP...54	
1.10	Tratamiento.....	57
1.10.1	Tratamiento quirúrgico.....	58
1.10.2	Quimioterapia / Radioterapia.....	59
1.10.2.A.	Quimioterapia.....	59
1.10.2.B	Radioterapia.....	59
1.10.2.B.1	Radioterapia externa.....	60
1.10.2.B.2	Braquiterapia (radioterapia interna).....	61
1.11	Microambiente inmune tumoral e Inmunoterapia.....	61
1.12	Evolución clínica y seguimiento de los pacientes con CPCE.....	64
1.12.1	Monitorización de las recaídas y resistencias al tratamiento. Papel de la biopsia líquida.....	64
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	66
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	69
3.1	Pacientes y muestras.....	69
3.2	Diseño y construcción de matrices tisulares (tissue microarray-TMA).....	72
3.3	Técnicas de inmunohistoquímica.....	75
3.4	Técnicas de FISH.....	79
3.5	Estudios de expresión.....	82
3.5.1	Extracción de ARN.....	82
3.5.2	Análisis de expresión génica (GEP) mediante plataforma Nanostring: nCounter® Tumor Signaling 360 Panel.....	85
3.5.3	Análisis de datos.....	87
3.6	Análisis estadístico.....	87
4.	RESULTADOS.....	89
4.1	Alteraciones cromosómicas en el carcinoma pulmonar de células escamosas.....	89
4.2	Efectos pronósticos de las alteraciones cromosómicas y otras características de la enfermedad en pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas.....	90
4.3	Relación entre la expresión proteica del gen EGFR y la variación en el número de copias.....	99

4.4	Perfil de expresión génica del tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón tras terapia con inmunoterapia.....	100
4.5	Caracterización funcional del perfil de expresión génica (GEP) en las muestras tumorales de los pacientes con cáncer de pulmón.....	106
5.	DISCUSIÓN.....	111
5.1	Valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas en el CPCE.....	113
5.2	Valor pronóstico de las características clínicas, histopatológicas y evolutivas del CPCE.....	119
5.3	Análisis del perfil de expresión génica (GEP) y su caracterización funcional.....	121
6.	CONCLUSIONES.....	130
6.1	En relación con la incidencia y el valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas presentes en el carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE).....	130
6.2	En relación con el valor pronóstico de las características clínicas, histopatológicas y evolutivas del CPCE.....	130
6.3	En relación con el análisis del perfil de expresión génica (GEP) y su caracterización funcional.....	131
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	132
8.	ANEXOS.....	157
8.1	Artículo científico publicado en revista <i>Cancers</i> (MDPI) con factor de impacto (IF) 6.57 cuartil 1 (Q1). Se adjunta original.....	157
8.2	Premio al presente trabajo de investigación.....	158

ÍNDICE DE TABLAS

1. **Tabla 1.** Biomarcadores, alteraciones accionables, metodología para la determinación y fármacos de uso clínico aprobados en CPCNP. Consenso SEAP Y SEOM.....56
2. **Tabla 2.** Características clínico-patológicas de los 108 pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) incluidos en el presente estudio.....71
3. **Tabla 3.** Anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico.....77
4. **Tabla 4.** Datos de concentración y calidad de los valores de ARN obtenidos en las muestras analizadas.....84
5. **Tabla 5.** Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas en la supervivencia global (SG) en 48 pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE).....91
6. **Tabla 6.** Frecuencia de las distintas anomalías numéricas y estructurales identificadas para cada una de las regiones cromosómicas y cromosomas analizados en 48 pacientes con Carcinoma Pulmonar de Células Escamosas (CPCE) detectadas por FISH y su impacto en la supervivencia global (SG).....93
7. **Tabla 7.** Características clínicas, histopatológicas y biológicas de la enfermedad en pacientes con Carcinoma Pulmonar de Células Escamosas (CPCE), de acuerdo con el número de copias del gen EGFR detectadas por técnica de FISH (n=108).....95
8. **Tabla 8.** Características clínico-biológicas y patológicas de 10 pacientes con carcinoma de pulmón en estadio IV tratados con nivolumab. Los pacientes respondedores son marcadores en verde.....101
9. **Tabla 9.** Genes desregulados estadísticamente significativos en pacientes respondedores (n=3) vs, no-respondedores (n=7) tratados con nivolumab.....106

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Agrupación por estadio en cáncer de pulmón (AJCC 8ª edición).....	44
2. Figura 2. Mediadores clave intracelulares de la vía de señalización de EGFR en el cáncer de pulmón.....	50
3. Figura 3. Terapias dirigidas a la desregulación de la ruta de señalización de PI3K/AKT/mTOR.....	51
4. Figura 4. Algoritmo recomendado para el estudio de los biomarcadores en el diagnóstico de pacientes con CPCNP avanzado.....	57
5. Figura 5. Mecanismos del punto de control inmunitario.....	63
6. Figura 6. Aplicación clínica de la BL en el cáncer de pulmón.....	65
7. Figura 7. Tecnología para la para la construcción de los TMA.....	73
8. Figura 8. Proceso para la confección de los TMA.....	74
9. Figura 9. TMA construidos con el tejido de los 108 pacientes incluidos en el presente estudio.....	74
10. Figura 10. Procesador automático para técnicas de inmunohistoquímica.....	76
11. Figura 11. Representación del tissue microarray 1 (TMA1).....	78
12. Figura 12. Representación de tejido tumoral extraído de los TMA y contrateñidos con hematoxilina eosina y los anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico.....	79
13. Figura 13. Microscopio de fluorescencia.....	81
14. Figura 14. Distribución cromosómica de las sondas de FISH empleadas en el presente estudio.....	82
15. Figura 15. Panel nCounter Tumor Signaling 360 con capacidad para analizar un total de 760 genes involucrados en más de 40 vías de señalización de la biología del tumor, evasión inmune y remodelación del microambiente.....	85
16. Figura 16. Sistema Nanostring: nCounter Prep Station y nCounter Digital Analyzer.....	86
17. Figura 17. Anomalías cromosómicas detectadas en pacientes con CPCE por técnicas FISH.....	90
18. Figura 18. Núcleos en interfase con el gen EGFR amplificado detectado por técnicas FISH a partir de una biopsia de un paciente con CPCE.....	94
19. Figura 19. Características clínicas, histopatológicas y biológicas de la enfermedad de los pacientes con CPCE, con impacto significativo en la supervivencia global en el análisis univariante.....	97
20. Figura 20. Amplificación de EGFR detectada en tumores primarios de pacientes con CPCE por técnicas de FISH, la cual muestra un impacto significativo en la supervivencia global en el análisis univariante.....	98

21. Figura 21. Propuesta de un score pronóstico para los pacientes con CPCE, basado en los dos factores pronósticos más relevantes encontrados en nuestro estudio...	99
22. Figura 22. Imagen de una biopsia de un paciente con CPCE.....	100
23. Figura 23. Perfil de expresión de 760 genes en pacientes con cáncer de pulmón avanzado asociado a la respuesta al tratamiento con nivolumab.....	103
24. Figura 24. Heatmap mostrando las diferencias de expresión de 24 genes entre pacientes respondedores y no-respondedores tratados con nivolumab.....	105
25. Figura 25. Vías canónicas más representativas implicadas en el cáncer de pulmón definidas por el análisis de expresión génica (GEP) de los transcritos desregulados de forma significativa.....	107
26. Figura 26. Curvas ROC obtenidas de las bases públicas https://www.rocplot.org/ que contienen un total de 254 pacientes con cáncer de pulmón avanzado tratados con nivolumab.....	108
27. Figura 27. Análisis multivariante del impacto pronóstico del perfil de expresión de 2.166 pacientes con CPCNP.....	110

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Carcinoma pulmonar de células escamosas: aspectos clínicos y biológicos de la enfermedad.

El cáncer de pulmón es una enfermedad frecuente y constituye la principal causa de muerte relacionada con cáncer de manera global, con tasas de morbimortalidad que alcanzan el 18%, lo que representa 1,8 millones de muertes al año. El 85% de las neoplasias de pulmón lo constituye el grupo de carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP). Los dos grandes tipos histológicos que se incluyen dentro de los CPCNP son el adenocarcinoma (ADC) y el carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) o carcinoma epidermoide. El subtipo de CPCE representa entre un 20% a 30% de los CPCNP (1,2).

A nivel global, más de la mitad de los nuevos casos y de las muertes por cáncer de pulmón ocurren en Asia, debido, en parte, a que la región representa alrededor del 60% de la población mundial (58,5%), seguido de Europa (22,4%), América del Norte (12,1%), América Latina y Caribe (4,3%), África (1,9 %) y Oceanía (0,81%) (3).

El carcinoma pulmonar de células escamosas a menudo se origina y desarrolla en la región central del pulmón, próximo al hilio pulmonar o en la vía aérea principal, como los bronquios principales izquierdo o derecho y sus ramas. El principal factor ambiental causal que se ha relacionado directamente con la transformación celular es el humo del tabaco. En cuanto a la distribución poblacional por sexos, aproximadamente el 80% de las neoplasias de pulmón que se producen en varones y el 90% en mujeres están asociados con el tabaquismo. El CPCE está más fuertemente asociado con el hábito de fumar que cualquier otro tipo de CPCNP. Otros factores de riesgo incluyen la edad, los antecedentes familiares (carga genética/factores heredofamiliares), la exposición pasiva al humo del tabaco, las partículas minerales y metálicas o el asbesto. En su desarrollo, este tipo

tumoral pasa por una transformación celular que incluye metaplasia escamosa, displasia, carcinoma *in situ* y finalmente, carcinoma invasivo (4).

En las últimas décadas se ha avanzado mucho en el conocimiento del abordaje diagnóstico y terapéutico del cáncer en general y del cáncer de pulmón en particular. Muchos de estos avances han sido en materia de diagnóstico y detección por imagen de la neoplasia. En este sentido, algunas pruebas como la tomografía axial computarizada convencional (TAC) y de alta resolución (TACAR), así como la tomografía por emisión de positrones PET/TC, han venido a revolucionar la medicina, complementando algunas técnicas radiológicas menos precisas como la radiografía de tórax convencional (RX-tórax) o la Ecografía transtorácica (ECO-TT).

Las pruebas de diagnóstico son cada vez menos invasivas y consiguen obtener pequeñas muestras tumorales de tejido o células individuales vía broncoscópica para su correspondiente análisis microscópico, tales como el cepillado bronquial, aspirado bronquial (BAS), lavado broncoalveolar (BAL), la punción aspiración con aguja fina transbronquial guiada por ecografía endobronquial (EBUS-TBNA: EndoBronchial UltraSound-guided Transbronchial Needle Aspiration), que han permitido dar un gran salto cualitativo en el diagnóstico de la enfermedad. Además, con estas nuevas técnicas no solo es posible obtener material citológico o tisular para poder caracterizar el tipo de célula tumoral, estirpe histológica y características de expresión proteica, sino que también permiten analizar el material obtenido a nivel molecular, mediante técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) y de secuenciación, bien por los métodos convencionales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real Time PCR), o bien, mediante técnicas de secuenciación masiva de nueva generación (NGS). Además, los nuevos avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer de pulmón han permitido dar un gran salto a la medicina de precisión, permitiendo reducir las recaídas precoces y mejorar la supervivencia global (SG) de los pacientes.

1.2 Etiología y patogénesis del CPCE.

Se estima que el 90% de los pacientes diagnosticados de CPCE son fumadores activos o refieren antecedente de tabaquismo activo o pasivo. El CPCE muestra una predilección por el género masculino (5). Algunos de los factores de riesgo que

predisponen al desarrollo de cáncer de pulmón (factores cancerígenos), incluyen la exposición al gas radón, metales (arsénico, cadmio, cromo), radiación, contaminación del aire e infecciones (6). Otros factores de riesgo para CPCE incluyen la edad, los antecedentes familiares y la exposición pasiva al humo del tabaco.

Los componentes del cigarrillo tienen una firma mutagénica relativamente predecible (firma 4), que actúa preferentemente sobre los pares de bases de guanina y crea sustituciones C>A (7). En raras ocasiones, algunos CPCE se desarrollan en fumadores ocasionales o que nunca han fumado; en estos tumores son más frecuentes las mutaciones activadoras que se encuentran más comúnmente en el adenocarcinoma, como las mutaciones *EGFR* y *ALK* (8, 9, 10, 11). Hoy en día, continúa siendo controvertida la posible patogénesis del virus del papiloma humano (VPH) en CPCE. En este sentido, varios estudios con protocolos de detección de VPH rigurosamente controlados y que excluyen aquellos CPCE de origen metastásico de cánceres de cuello uterino u orofaríngeo, han cuestionado la asociación, al menos en poblaciones de ascendencia europea (12, 13, 14, 15).

La carcinogénesis del carcinoma de células escamosas está estrechamente relacionada con alteraciones genómicas, mutaciones genéticas y/o expresión alterada de moléculas que son clave en la transformación neoplásica del linaje de las células escamosas y/o diferenciación terminal (16, 17). La caracterización genómica integral de CPCE ha mostrado alteraciones genómicas complejas, con una media de 360 mutaciones exónicas, 165 reordenamientos genómicos y 323 segmentos de alteración del número de copias por tumor (18). Se han descrito al menos dos vías que podrían estar involucradas en la patogénesis de CPCE. La primera está relacionada con la vía del estrés oxidativo e incluye mutaciones en los genes *NFE2L2*, *KEAP1* o *CUL3*. La segunda está implicada en la diferenciación escamosa e incluye la sobreexpresión y amplificación de *SOX2* y *TP63*; mutaciones de pérdida de función en *NOTCH1*, *NOTCH2* y *ASCL4*; y deleciones intersticiales en *FOXPI*.

Desde el punto de vista citogenético, las alteraciones más frecuentemente encontradas en el CPCE incluyen ganancia/amplificación de los cromosomas 3q (*SOX2*, *TP63*) (19, 20), 7p (*EGFR*) y 8p (*FGFR1*), así como deleción del cromosoma 9p (*CDKN2A*) (21, 22). A nivel molecular, las mutaciones se encuentran con mayor frecuencia en los genes *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KEAP1*, *KMT2*, *HLA-A*,

NFE2L2, *NOTCH1* y *RBI* (23, 24). Desde el punto de vista genómico, en el CPCE se han identificado cuatro subtipos como veremos más adelante (primitivo, clásico, secretor y basal) (25, 26).

1.3 Presentación clínica del CPCE.

En el momento del diagnóstico de CPCE, la gran mayoría de los pacientes (80%-90% de los casos) muestran algún signo o síntoma relacionado con la enfermedad. Estos se clasifican de la siguiente manera:

- (1) los relacionados con la lesión primaria y con la diseminación intratorácica,
- (2) los relacionados con la metástasis a distancia,
- (3) los relacionados con síndromes paraneoplásicos.

No obstante, en dependencia de si el tumor se localiza en la zona central (próxima al hilio bronco-vascular) o en la región periférica del pulmón, los síntomas pueden variar.

1.3.1 Signos y síntomas relacionados con la lesión primaria y la diseminación intratorácica.

Los pacientes con CPCE pueden presentar signos y síntomas que generalmente están relacionados con la localización del tumor y las estructuras anatómicas que puedan estar comprometidas. Algunos de los síntomas más comunes incluyen dificultad progresiva para respirar, tos, dolor/presión en el pecho, ronquera o pérdida de la voz y hemoptisis. El CPCE tiende a ser localmente agresivo, con compromiso progresivo de las estructuras peribronquiales por invasión directa. Los síntomas están relacionados con la obstrucción endobronquial, lo que lleva a hemoptisis, tos y neumonitis recurrente. La proximidad a la carina traqueal en aquellos tumores de localización central, es un factor crucial y determinante en la planificación del abordaje quirúrgico (27). Los CPCE de localización periférica pueden desarrollar cavitación central por necrosis tumoral o queratinización, con la consecuente sobreinfección fúngica o bacteriana (28). Una forma de presentación poco común, pero a la vez muy característica del CPCNP es el conocido como Tumor Pancoast, un tumor pulmonar de localización apical que por su tamaño y agresividad local invade la pared torácica apical y los tejidos adyacentes.

1.3.2 Signos y síntomas relacionados con las metástasis.

Las metástasis a distancia ocurren de manera similar a otros CPCNP. Los síntomas relacionados con la enfermedad diseminada incluyen pérdida de peso; dolor abdominal debido a la afectación secundaria del hígado, las glándulas suprarrenales y otros órganos; y dolor debido a metástasis óseas. Las metástasis cerebroespinales o diseminación leptomeníngea pueden causar síntomas neurológicos. Se conoce que en el curso de la enfermedad neoplásica pulmonar, $\geq 20\%$ de los pacientes desarrollarán metástasis en el sistema nervioso central (SNC) (29).

1.3.3 Signos y síntomas relacionados con síndrome paraneoplásico.

Los síndromes paraneoplásicos, que ocurren en hasta el 10% de los pacientes con cáncer de pulmón, son un grupo de trastornos clínicos asociados con enfermedades malignas que no están directamente relacionados con los efectos físicos del tumor primario o metastásico. Estos síndromes pueden deberse a la producción de sustancias biológicamente activas o a otros mecanismos. Los síntomas paraneoplásicos no están relacionados con el tamaño del tumor primario, en algunos casos pueden preceder al diagnóstico de enfermedad maligna, y en otras ocasiones pueden ocurrir tarde en la enfermedad o predecir el primer signo de recurrencia (30). La hipercalcemia es uno de los principales signos paraneoplásicos del CPCE.

1.4 Pruebas diagnósticas.

La evaluación inicial de un paciente con un posible diagnóstico de cáncer de pulmón implica rutinariamente procedimientos quirúrgicos y de imagen para definir la extensión de la enfermedad; estos pueden incluir TAC, PET-TAC, RMN, broncoscopia, biopsia con aguja transtorácica, PAAF transbronquial de estaciones ganglionares o de la masa pulmonar guiada por ecografía endobronquial, mediastinoscopia. Estos procedimientos deben adaptarse para permitir una estadificación precisa (es decir, detectar sitios de metástasis ganglionares y enfermedad a distancia) y obtener material suficiente para obtener toda la información necesaria para el tratamiento (incluido el análisis histológico y molecular).

1.4.1 Pruebas de imagen.

Las exploraciones por imágenes son muy importantes en el cuidado de las personas con cáncer en general y cáncer de pulmón en particular. Sin embargo, ninguna prueba es perfecta y ninguna exploración puede diagnosticar CPCNP por sí sola. En estos momentos, la biopsia sigue siendo el “*gold estándar*” para el diagnóstico del cáncer de pulmón. Los resultados de la radiografía y la exploración del tórax deben combinarse con el historial médico, un examen físico, análisis de sangre e información de la biopsia para formar una historia completa sobre el origen del cáncer y si determinar si se trata de una enfermedad localizada en el pulmón o ya se ha propagado a otros órganos y tejidos a distancia.

1.4.2 Tomografía axial computarizada (TAC).

Esta técnica radiológica permite determinar el tamaño del tumor y su localización, así como la presencia de metástasis. Una tomografía computarizada toma imágenes del interior del cuerpo usando rayos X tomados desde diferentes ángulos. Una computadora combina estas imágenes en una imagen tridimensional detallada que muestra cualquier anomalía o tumor. En ocasiones se administra al paciente un contraste especial (medio de contraste), antes del escaneo, para brindar mejores detalles en la imagen. Este tinte puede inyectarse en la vena de un paciente o administrarse en forma de píldora o líquido por vía oral.

1.4.3 Tomografía por emisión de positrones (PET).

Generalmente es utilizada en combinación con una tomografía computarizada llamada tomografía PET-TAC. Una tomografía por emisión de positrones es una forma de crear imágenes de órganos y tejidos dentro del cuerpo. Se inyecta una pequeña cantidad de una sustancia de glucosa radiactiva en el cuerpo del paciente. Esta sustancia glucosada es absorbida por las células que utilizan la mayor parte de la energía. Debido a que el cáncer tiende a usar energía activamente, absorbe más sustancia radiactiva. Luego, un escáner detecta esta sustancia para producir imágenes del interior del cuerpo. La intensidad de señal que emiten esas imágenes se relaciona con la captación mayor o menor que las células tumorales hacen de esa sustancia glucosada (metabolismo glicídico) y se puede cuantificar. Existe un consenso internacional que emplea el

algoritmo que relaciona la captación con el volumen del vóxel de máxima captación (SUVmax; Standardized Uptake Value máximo) (31, 32), siendo el punto de corte establecido para separar los nódulos pulmonares benignos de los probablemente malignos de 2,5 (SUVmax \geq 2,5) (33, 34).

1.4.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Esta técnica de imagen también permite localizar el tumor y caracterizar con mayor precisión los tumores y su relación con estructuras vulnerables que podrían estar comprometidas por el tumor, como los vasos sanguíneos, nervios, tejido adiposo, músculo, hueso, etc. Utiliza campos magnéticos, no rayos X, para producir imágenes detalladas del cuerpo. Se administra un medio de contraste antes de la exploración para crear una imagen más clara y definida. La limitación de la RMN en el diagnóstico del cáncer de pulmón radica en que no es muy sensible para obtener imágenes de partes del cuerpo que se mueven constantemente, como los pulmones, que se mueven con cada respiración. Por esa razón, la resonancia magnética rara vez se usa para observar los pulmones, pero es muy útil en la búsqueda y caracterización de metástasis se haya propagado fuera de los pulmones, por ejemplo, al cerebro o a los huesos.

1.4.5 Gammagrafía ósea.

Una gammagrafía ósea utiliza un marcador radiactivo para observar el interior de los huesos. La cantidad de radiación en el marcador es demasiado baja para ser perjudicial para la salud del paciente. El trazador se inyecta en la vena del paciente. Se acumula en áreas del hueso y es detectado por una cámara especial. El hueso sano aparece más claro para la cámara y las áreas lesionadas, como las causadas por el cáncer, se destacan en la imagen. En las últimas décadas, la tomografía por emisión de positrones (ver arriba) ha reemplazado paulatinamente a la gammagrafía óseas para encontrar CPCNP que se ha propagado a los huesos.

1.5 Pruebas para la obtención de tejido tumoral para el diagnóstico histopatológico del tumor y toma de decisiones terapéuticas.

1.5.1 Biopsia.

Una biopsia es la extracción de una pequeña cantidad de tejido con el objeto de ser examinado con el microscopio. Cuando el tejido extraído es pequeño, nos referimos a él como biopsia endoscópica de forma general, ya que la gran mayoría de las biopsias de pequeño tamaño que se realizan para el diagnóstico de cáncer del pulmón, se obtienen por vía endoscópica y, en un menor número de casos, por vía percutánea o transtorácica. La cantidad y calidad del material obtenido serán determinantes para conseguir tipificar el subtipo de CPCNP y poder realizar pruebas moleculares adicionales como inmunohistoquímica (IHQ) y estudios moleculares. La biopsia es clave para el diagnóstico correcto del cáncer de pulmón y para su caracterización molecular (patología de precisión). En ocasiones en que el material obtenido no es suficiente, se requiere una segunda biopsia (rebiopsia). La biopsia debe ser evaluada por el especialista en Anatomía Patológica, que es el médico cualificado para el estudio de las células, tejidos y órganos y para el diagnóstico de las enfermedades.

En ocasiones, el diagnóstico se realiza con una biopsia de mayor envergadura con, la que se persigue la extirpación completa del nódulo tumoral, a la que denominamos biopsia quirúrgica: segmentectomía (extirpación de un segmento de tejido pulmonar en el que está incluido el tumor), lobectomía (extirpación de un lóbulo pulmonar en el que se encuentra el tumor) y, excepcionalmente, neumonectomía (extirpación quirúrgica total de un pulmón).

1.5.2 Broncoscopia.

Es un procedimiento diagnóstico llevado a cabo por el médico broncoscopista, generalmente un neumólogo, que consiste en introducir por la boca o la nariz, un tubo delgado y flexible con una luz en el extremo, a través de la tráquea y hacia las vías respiratorias principales de los pulmones. El tubo le permite al médico ver en directo el interior de los pulmones, a través de la imagen captada por una videocámara. Pequeñas herramientas dentro del tubo pueden tomar muestras de líquido o tejido para que el patólogo pueda examinarlas. A menudo, se examinarán los ganglios linfáticos y se

tomarán biopsias usando un ultrasonido para guiar la broncoscopia. Esto se llama ecografía endobronquial (EBUS). Un procedimiento ampliamente extendido para estadificación de la extensión tumoral a los ganglios linfáticos. Es un procedimiento que requiere sedación o anestesia para evitar dolor o molestias mayores a los pacientes. También es posible obtener muestras directamente del tumor mediante una Punción Aspiración transbronquial guiada por ecografía (EBUS-PAAF). Las muestras líquidas obtenidas durante la broncoscopia serán analizadas por el patólogo. Las tres muestras líquidas más comúnmente analizadas son: Lavado broncoalveolar (BAL), Aspirado bronquial (BAS) y cepillado bronquial. Estas muestras contienen células que analizadas citológicamente y en ocasiones en forma de bloques celulares, constituyendo una fuente de material celular de gran utilidad para el diagnóstico anatomopatológico y estudios moleculares.

1.5.3 Biopsia por aspiración con aguja (transtorácica).

Tras realizar anestesia local en la piel, el radiólogo intervencionista, extrae una muestra del tumor localizado en la periferia de pulmón para ser analizada por el patólogo. Esto se puede hacer con una aguja más pequeña o una aguja más grande, dependiendo del tamaño de la muestra. A menudo, el radiólogo intervencionista se apoya en una tomografía computarizada torácica o una máquina especial de rayos X llamada fluoroscopia para guiar la aguja.

1.5.4 Toracocentesis.

Tras anestesiar la zona del tórax donde se hará la punción, se inserta una aguja a través de la pared torácica hasta llegar al espacio pleural, un espacio virtual que separa la pared torácica de la superficie pleural del pulmón, donde se puede acumular líquido. Este líquido se extrae y es analizado por el patólogo en busca de células tumorales.

1.5.5 Toracoscopia.

Este procedimiento se realiza en el quirófano y el paciente recibe anestesia general. A través de una pequeña incisión en la piel de la pared torácica, un cirujano puede insertar un instrumento especial y una pequeña cámara de video para asistir en el examen del interior del tórax. Este procedimiento puede denominarse cirugía toracoscópica

asistida por video (VATS). Se puede realizar otro tipo de cirugía mínimamente invasiva llamada "cirugía asistida por robot" en lugar de una toracoscopia.

1.5.6 Mediastinoscopia.

Este es un procedimiento quirúrgico que se realiza en el quirófano bajo anestesia general. Un cirujano cardiorácico examina y toma una o más muestras de los ganglios linfáticos del mediastino o de tumores alojados en esta localización por debajo del esternón, haciendo una pequeña incisión en la parte superior del esternón.

1.5.7 Toracotomía.

Este procedimiento se realiza en un quirófano bajo anestesia general. Luego, un cirujano realiza una incisión en el tórax, examina el pulmón directamente y toma muestras de tejido para analizarlas. Rara vez se usa una toracotomía para el diagnóstico del cáncer de pulmón, pero es una de las técnicas más empleadas para el tratamiento quirúrgico del cáncer de pulmón, ya que permite su extirpación completa.

1.6 Diagnóstico anatomopatológico.

1.6.1 Características macroscópicas.

El CPCE presenta un tamaño muy variable y es dependiente del estadio tumoral, desde unos pocos centímetros en estadios precoces hasta pudiendo alcanzar >10cm en estadios avanzados. Muestra una superficie de corte firme de color blanco, marrón claro o gris. En ocasiones presenta depósitos de pigmento carbónico en el centro y retracciones estrelladas en la periferia. La hemorragia focal no es infrecuente. En tumores más grandes, puede ocurrir cavitación central debido a la necrosis tumoral. Los tumores centrales pueden mostrar un crecimiento papilar exofítico endobronquial. La obstrucción de los bronquios es común, a menudo con atelectasias adyacentes y neumonía postobstructiva, siendo frecuentes las sobreinfecciones del parénquima pulmonar adyacente al tumor (35).

1.6.2 Características histopatológicas del CPCE.

En la actual clasificación de la Organización mundial de la Salud (OMS) correspondiente a la 5ª ed, del año 2021 (36), se reconocen tres subtipos histomorfológicos:

- CPCE queratinizante: su principal característica es la queratinización (presencia de queratina en forma de perlas corneas y/o acúmulos de láminas de queratina). La extensión de la queratinización varía con el grado de diferenciación: es prominente en los tumores mejor diferenciados donde típicamente hay una queratinización generalizada, aunque puede estar presente solo focalmente o ser menos evidente en aquellos que están menos diferenciados.
- CPCE no queratinizante: es un tipo de CPCE sólido que muestra un menor tamaño de las células y total ausencia de queratinización. Este tipo histológico requiere de confirmación inmunohistoquímica, ya que en ocasiones pueden ser muy semejantes a otros tumores por ejemplo el carcinoma urotelial de células transicionales, o incluso, al adenocarcinoma sólido de pulmón, siendo en necesario en ocasiones recurrir a técnicas inmunohistoquímicas para su correcta tipificación.
- CPCE basaloide: se caracteriza por un tamaño pequeño-intermedio de las células neoplásicas, que se disponen formando nidos o lobulillos con organización en empalizada de las células ubicadas más hacia la periferia de dichos nidos y que carecen de morfología escamosa, pero muestra un perfil escamoso en el estudio inmunohistoquímico. El estroma puede ser hialino o mixoide. Los CPCE (ya sean queratinizantes o no queratinizantes), con un componente basaloide de $\geq 50\%$, deben ser clasificados como CPCE basaloide.

Otros patrones morfológicos/arquitecturales de CPCE inusuales o que se presentan con menor frecuencia:

- CPCE papilar: es un tipo de carcinoma de células escamosas bien diferenciado, caracterizado por un patrón de crecimiento papilar exofítico con hiperqueratosis.

- CPCE de células claras: se trata de un rasgo o cambio que adquieren las células escamosas neoplásicas en algunas formas raras e infrecuentes de CPCE. La apariencia microscópica se vuelve difícilmente distinguible de las células del carcinoma sebáceo o incluso del carcinoma de células claras renales. En 1999, la OMS definió el carcinoma de células claras como un carcinoma de células grandes con características de células claras. Cuando se encontraba diferenciación escamosa o glandular en el componente de células claras, éste debía ser clasificado como un CPCE o ADC variante de células claras, respectivamente (36).
- CPCE fusocelular (también conocido como carcinoma sarcomatoide): compuesto por células neoplásicas ahusadas o fusiformes con co-expresión de marcadores inmunohistoquímicos epiteliales y mesenquimales (37).
- CPCE pseudovascular: es una variante epitelial de CPCE con la propiedad morfológica de simular el patrón de crecimiento de neoplasias vasculares como el Angiosarcoma ya que histológicamente presenta espacios pseudoluminales interanastomosados, tapizados por células epitelioides atípicas, con inmunofenotipo epitelial, siendo negativos para marcadores vasculares y endoteliales como CD31, CD34, ERG o D2-40. Se ha descrito en mama, piel y más recientemente en pulmón (38).

1.6.3 Grado histológico del CPCE.

Hasta el momento la OMS no ha establecido un sistema de gradación para el CPCE. Tradicionalmente, en algunos órganos como laringe, lengua, esófago o piel entre otros, el sistema para gradar el carcinoma de célula escamosas se ha basado en el grado de diferenciación o de queratinización que presenta el tumor; de este modo, se emplea el sistema de cuatro grados para estos tumores del siguiente modo (39):

G1: Carcinoma de células escamosas bien diferenciado. En este grado, el epitelio escamoso es fácilmente reconocible, con abundante queratinización, puentes intercelulares aparentes, pleomorfismo mínimo y figuras de mitosis presentes solo en el estrato basal.

G2: Carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado. En este grado, los nidos de células tumorales muestran solo focal queratinización (características intermedias entre el grado bien diferenciado y el pobremente diferenciado).

G3: Carcinoma de células escamosas pobremente diferenciado. En este grado, no se observa queratinización o existe solo de manera muy focal, la atipia nuclear es marcada y puede ser difícil establecer la existencia de diferenciación escamosa.

G4: Carcinoma de células escamosas indiferenciado. En este grado no se observa queratinización. Por lo general se requiere de técnicas inmunohistoquímicas para confirmar el diagnóstico y poder excluir otras neoplasias como melanomas o sarcomas.

1.6.4 Características inmunohistoquímicas del CPCE.

La tinción positiva difusa con un marcador de células escamosas: p40 y la ausencia de tinción (negatividad) para TTF-1, confirman el diagnóstico de CPCE. En las biopsias incisionales o diagnósticas, la tasa de tinción positiva para p40 en las células tumorales debe ser > 50% (40). p40 se considera el marcador más específico para CPCE, mientras que las citoqueratinas de alto peso molecular como CK5/6, 34βE12 y otros anticuerpos como desmocolina, desmogleína y p63, son marcadores menos específicos de diferenciación de células escamosas (41, 42, 43, 44). En ocasiones, los marcadores neuroendocrinos pueden ser positivos (especialmente CD56), pero si p40 es difusamente positivo, el tumor se clasifica como CPCE.

1.6.5 Estadio patológico TNM.

La clasificación por etapas es un pilar esencial y fundamental para brindar atención a los pacientes con cáncer. Proporciona una nomenclatura para describir la extensión anatómica del tumor. Estas características tumorales tienen un gran impacto en el pronóstico, así como sobre las opciones terapéuticas. Es fundamental que podamos comunicarnos claramente entre los médicos y demás personal sanitario quienes somos responsables del seguimiento cuidado y tratamiento de los pacientes con cáncer.

La estructura fundamental de la clasificación por etapas es la Sistema TNM: T para características del tumor primario, N para afectación ganglionar y M para metástasis

(a distancia). Las instituciones que deciden formalmente sobre las definiciones de las categorías T, N y M y los grupos escénicos son la “American Joint Commission on Cancer” (AJCC) en los Estados Unidos y la “Union for International Cancer Control” (UICC) a nivel internacional. Estas dos entidades emprenden revisiones periódicas. El 1 de enero de 2017 se presentó la octava edición de la clasificación TNM que sigue vigente a fecha en que se leerá este documento de tesis doctoral, y que se expone a continuación:

TNM Clasificación clínica.

T – Tumor primario

TX El tumor primario no se puede determinar, o el tumor se detecta por la presencia de células malignas en el esputo o en los lavados bronquiales; pero no se visualiza mediante imágenes o broncoscopia.

T0 No hay evidencia de tumor primario.

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor de 3 cm o menos de dimensión mayor, rodeado por parénquima pulmonar o pleura visceral, sin evidencia broncoscopia de invasión o invasión más proximal que el bronquio lobar (que no afecta al bronquio principal).

T1mi Adenocarcinoma mínimamente invasivo.

T1a Tumor de 1 cm o menos de dimensión mayor.

T1b Tumor de más de 1 cm, pero no más de 2 cm de dimensión mayor.

T1c Tumor de más de 2 cm, pero no más de 3 cm de dimensión mayor.

T2 Tumor de más de 3 cm, pero no más de 5cm; o tumor con cualquiera de las siguientes características:

- Afecta al bronquio principal independientemente de la distancia a la carina, pero sin afectación de la carina.
- Afecta a la pleura visceral
- Asociada con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar y afecta parte o todo el pulmón.

T2a Tumor de más de 3 cm, pero no mayor a 4 cm de dimensión mayor.

T2b Tumor de más de 4 cm, pero no mayor a 5 cm de dimensión mayor.

T3 Tumor de más de 5 cm pero no mayor a 7 cm de dimensión mayor o que infiltre directamente una de las siguientes estructuras: pleura parietal, pared torácica, (incluyendo tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal; o nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo que el primario.

T4 Tumor de más de 7 cm o de cualquier tamaño que infiltre cualquiera de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulos tumorales separados en un lóbulo ipsilateral diferente al del primario.

N – Ganglios Linfáticos Regionales

NX No se puede determinar la afectación de ganglios linfáticos regionales.

N0 No hay evidencia de metástasis a ganglios linfáticos.

N1 Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales peribronquiales y/o ipsilaterales hiliares e intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa.

N2 Metástasis en ganglios linfáticos ipsilaterales mediastínicos y/o subcarinales.

N3 Metástasis en ganglios linfáticos contralaterales mediastínicos, contralaterales hiliares, ipsilaterales o contralaterales escalenos o supraclaviculares.

M – Metástasis a Distancia

M0 No metástasis a distancia.

M1 Metástasis a distancia.

M1a Nódulos tumorales separados en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico maligno.

M1b Metástasis única en un órgano extratorácico.

M1c Metástasis múltiple en uno o múltiples órganos extratorácicos.

La información arriba descrita ha sido extraída de la clasificación TNM de tumores malignos de 2017, octava edición (45).

La clasificación del estadio en cáncer de pulmón es desarrollada por la “International Association for the Study of Lung Cancer” por sus siglas en inglés: IASLC, basándose en un sofisticado análisis estadístico de una base de datos internacional de más de 100.000 pacientes.

La clasificación por etapas contempla aspectos fundamentales para el manejo de los pacientes con cáncer de pulmón. A continuación, la 8ª edición de la clasificación TNM de cáncer de pulmón (46) (**Figura 1**).

T/M	Label	N0	N1	N2	N3
T1	T1a ≤ 1	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b $>1-2$	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c $>2-3$	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a <i>Cent, Yisc Pl</i>	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2a $>3-4$	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b $>4-5$	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3 $>5-7$	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Inv</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 <i>Satell</i>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 >7	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Inv</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T4 <i>Ipsi Nod</i>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a <i>Contr Nod</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a <i>Pl Dissem</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b <i>Single</i>	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c <i>Multi</i>	IVB	IVB	IVB	IVB

Figura 1. Agrupación por estadio en cáncer de pulmón (AJCC 8ª edición).

La agrupación de diferentes casillas por colores se ha empleado para facilitar la identificación de los diferentes estadios con números romanos seguidos por una letra mayúscula del alfabeto, como se indica a continuación: IA (en verde pálido), IB (en verde intenso), IIA (en color salmón), IIB (en amarillo), IIIA (en azul turquesa), IIIB (en azul cielo), IIIC (en azul índigo), IVA (en color rosa) y IVB (en morado). T (tumor), N (ganglios linfáticos), M (metástasis). La unidad de medida del tumor está representada en centímetros.

1.7 Origen de la célula neoplásica en el CPCE.

1.7.1 Lesiones precursoras y preinvasivas.

A lo largo de las últimas décadas, muchos estudios han volcado su interés en investigar los procesos que inician los cambios genéticos que aparecen en las células escamosas pulmonares de las lesiones precursoras y pre-invasoras (carcinoma *in situ*, carcinoma escamoso *in situ*, CIS). Los estudios inmunohistoquímicos han demostrado presencia de proteínas asociadas al ciclo celular como antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), MIB1 y proteína de mantenimiento de microsoma 2 (MCM2) en displasia escamosa (DE) y CIS, lo que indica un aumento en la actividad del ciclo celular (47). Además, el tabaquismo parece tener un efecto sobre la actividad del ciclo celular,

un aumento del consumo de tabaco se correlaciona con el aumento del ciclo celular mientras que dejar de fumar hace que disminuya (48).

No se sabe mucho sobre la actividad del gen *EGFR* y sus vías de señalización (RAS/RAF/MAPK, JAK/STAT y PI3K/AKT/mTOR) durante la transición desde la displasia escamosa (DE) hasta el CIS y neoplasia escamosa. La proteína EGFR está presente en el epitelio bronquial normal, así como en la hiperplasia y metaplasia de células basales bronquiales. El humo del tabaco fosforila y amplifica PI3K provocando que se active, regulando al alza AKT en DE bronquial severa (49). A pesar de la heterogeneidad de los estudios, la desregulación de *TP53* en la progresión de epitelio normal a hiperplasia, DE y CIS, ha sido un hallazgo constante. La inactivación de *TP53* provoca la desregulación de la expresión de Bcl2 y una disminución en el regulador de apoptosis X asociado a Bcl2 (*BAX*), aumentando la actividad del ciclo celular y la resistencia a mecanismos apoptóticos. Curiosamente, la pérdida de función real del gen *TP53* (por mutación o delección cromosómica en 17p) es mucho menos común en DE/CIS que en CPCE, y se detecta solo en el 10% de las lesiones de alto grado (50, 51).

Por el contrario, el gen *CDKN2A* (*P16*) (supresor del promotor de crecimiento de múltiples complejos) se pierde comúnmente en DE / CIS a través de la disminución de la expresión de proteínas y/o función génica disminuida, causado por la eliminación de 9p21 o silenciamiento epigenético por hipermetilación del promotor del gen *CDKN2A* (52). Aunque existe una gran variabilidad entre diferentes estudios, se acepta, en general, una tendencia de aumentar la desregulación de *CDKN2A* a medida que el grado de atipia es mayor. La sobreexpresión de *CCND1* está presente inicialmente en etapas inflamatorias tempranas de la DE, aumentando el número de lesiones de alto grado (53). Otros genes supresores tumorales de papel incierto también se pierden en DE/CIS, especialmente se conoce la pérdida de la expresión del receptor del ácido retinoico (*RARB*) y el gen de la tríada frágil de histidina (*FHIT*) (54).

La estimulación de la angiogénesis también es relevante para el desarrollo y establecimiento de lesiones precursoras. Por ejemplo, el estroma subepitelial en DE/CIS se vuelve más vascular en relación con el grado de la lesión (55). Neuropilina, *KDR* y *FIT1*, todos ellos ligandos del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular por sus siglas en inglés (*VEGFR*), están incrementados en la DE/CIS, y junto con una mayor expresión del gen del factor de crecimiento del endotelio vascular (*VEGF*) contribuyen al

aumento en la vascularización (56). *COX-2* también es un factor proangiogénico que parece aumentar en los grados superiores de DE/CIS (57, 58).

Otras alteraciones moleculares en la génesis del CPCE incluyen factores relacionados con la invasión y migración celular, el incremento anómalo de la expresión de metaloproteinasas de la matriz (*MMP3*, *MMP9* y *MMP11*), una disminución de *MMP1* y sus inhibidores *TIMP1* y *MMP7*, promoviendo así la invasión tisular en CIS (59).

Otros estudios genéticos globales sobre DE/CIS reportan aneuploidía y aneusomía cromosómica específica de cromosomas 3, 5, 6, 7 y 8. (60, 61). Ganancias cromosómicas y pérdidas en los cromosomas 1q, 3p, 8p, 8q, 12q y 17q han sido mostrados previamente en CIS usando hibridación genómica comparativa (61, 62, 63).

1.8 Biología molecular del CPCE.

1.8.1 Generalidades.

En la última década, los estudios masivos de secuenciación no solo han identificado alteraciones genómicas recurrentes a través de grandes cohortes de muestras de CPCE, también ha puesto en evidencia la gran heterogeneidad inter e intratumoral que supone uno de los grandes retos a la hora de definir un perfil molecular específico (64, 65). Además, con el paso del tiempo se ha demostrado que el microambiente tumoral juega un papel relevante en la progresión del cáncer de pulmón (66).

Desde la perspectiva genética, el CPCE presenta mutaciones recurrentes en varios genes como el receptor 2 que contiene el dominio de discoidina (*DDR2*); receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1, 2 y 3 (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*); y los genes en la vía del fosfatidilinositol 3 quinasa (*PI3K*) (67, 68, 69).

1.8.2 Panorama genómico del carcinoma pulmonar de células escamosas.

La caracterización del genoma del ADC se ha completado de manera integral (70), no obstante, el conocimiento de las alteraciones genéticas del carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) se ha quedado relegado y requiere mayor investigación que permita avanzar en el conocimiento de su biología, genómica y susceptibilidad a nuevas dianas terapéuticas. El CPCE está fuertemente asociado con el consumo de tabaco. La

mayoría de las cohortes arrojan resultados que relacionan el consumo de tabaco en más del 90% de los casos de CPCE (71). Es probable que la alta tasa de mutaciones en el CPCE conduzca a la expresión de una gran variedad de antígenos tumorales, siendo similar entre las poblaciones del norte y del sur América, Europa y Asia (72, 73, 74). Curiosamente, las alteraciones genómicas encontradas en el CPCE son sorprendentemente similares a los encontrados en los tumores de cabeza y cuello, así como en tumores de cérvix uterino no relacionados con el virus del papiloma humano (VPH) (75).

Varios cambios genéticos se han relacionado con CPCE, incluyendo amplificaciones en los *TP63*, *PIK3CA*, *PDGFRA*, *SOX2* o *FGFR1*, así como mutaciones a nivel de los genes *TP53*, *EGFR*, *PIK3CA*, *NRF2*, *PTEN* y *DDR2* (76). En 2012, el proyecto del Atlas del Genoma del Cáncer por sus siglas en inglés (TCGA), detecta alteraciones genómicas complejas en el CPCE, con una media de 165 reordenamientos genómicos, 360 mutaciones exónicas y 323 variaciones en el número de copias de secuencias específicas de ADN. El TCGA también identificó mutaciones estadísticamente recurrentes en 11 genes (*TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KEAP1*, *MLL2*, *HLA-A*, *NRF2*, *NOTCH1*, *RBI* y *HLA-A*) y alteraciones en el número de copias somáticas de segmentos cromosómicos que contienen los genes *SOX2*, *PDGFRA* y/o *KIT*, *EGFR*, *FGFR1*, *WHSC1L1*, *CCND1*, *CDKN2A*, *NFE2L2*, *MYC*, *CDK6*, *MDM2*, *BCL2L1*, *EYS*, *FOXP1*, *PTEN* y *NF1* (3, 18). Resultados más recientes han confirmado estos hallazgos mediante técnicas de PCR multiplex. No obstante, demostraron que las mutaciones conductoras de la enfermedad se albergan en los genes *PIK3CA*, *PTEN* y *DDR2*, así como la amplificación de *FGFR1*.

1.9 Alteraciones moleculares, vías de señalización, biomarcadores y dianas terapéuticas en CPCE.

1.9.1 Alteraciones moleculares del CPCE.

Las mutaciones genéticas más relevantes por su significación estadística, detectadas en el estudio del proyecto TCGA (2012) (79) fueron a nivel de los genes *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *KEAP1*, *MLL2*, *HLA-A*, *NFE2L2*, *NOTCH1*, *RBI* y *PDYN*. El 90 % de los tumores albergan mutaciones en *TP53*. Además, observaron mutaciones en

la vía relacionada con el estrés oxidativo (*KEAP1* y *NFE2L2*), en los genes relacionados con la diferenciación de células escamosas (*SOX2* y *TP63*) y la vía PI3K/RTK/RAS en el 34 %, 44 % y 69 % de los casos, respectivamente; La inactivación de *CDKN2A* se observó en el 72% de los casos.

Desde el punto de vista genómico, el perfil de ARNm clasificó el CPCE en cuatro subtipos; clásico, basal, secretor y primitivo. El subtipo clásico se caracteriza por alteraciones en los genes *KEAP1*, *NFE2L2* y *PTEN*, hipermetilación e inestabilidad cromosómica. El subtipo basal presenta una alta frecuencia de mutaciones en *NF1*. El subtipo secretor se caracteriza por la activación de *TP53* y *RBI*. El subtipo primitivo alberga con frecuencia mutaciones *RBI* y *PTEN*. Los autores en el informe de TGCA finalmente subdividieron el CPCE en tres categorías basadas en la agrupación integradora de mutaciones somáticas, números de copias de ADN, metilación de ADN y perfiles de expresión de ARNm utilizando el método iCluster (80).

1.9.2 Vías de señalización en el CPCE.

Las numerosas alteraciones adquiridas a nivel genómico por las células inmaduras escamosas, células planas que cubren el interior de las vías respiratorias, asociadas a la influencia de factores epigenéticos, conlleva el desarrollo de un estado de inestabilidad genómica responsable del origen, transformación maligna y progresión del CPCE. En este sentido, se producen alteraciones en diferentes vías de señalización. A continuación, discutiremos las vías o rutas de señalización más relevantes en el CPCE, incluida la vía de señalización: EGFR, PI3K, VEGF/VEGFR y la vía CDK4/6. Otras vías de señalización en CPCE que pueden ser potencialmente relevantes por su frecuencia, son FGFR1 y la ruta KEAP1/NRF2. Las alteraciones de estas vías de señalización están estrechamente interconectadas entre sí, como veremos más adelante.

1.9.2.A. Vía de señalización de EGFR.

EGFR pertenece a la familia HER/erbB del Receptor de Tirosina Quinasa (RTK), que incluye HER1 (EGFR/erbB1), HER2 (neu, erbB2), HER3 (erbB3) y HER4 (erbB4). (81). Los receptores EGFR (ErbB1) y ErbB2 estimulan varias vías de señalización

intracelular en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (82). La señalización intracelular de la vía EGFR es mediado principalmente a través de la vía RAS/MAPK, PI3K y la vía STAT (83, 84). La señalización intracelular de EGFR, conduce a una mayor proliferación (83), angiogénesis (85), metástasis (86) y disminución de la apoptosis (87). La dimerización de *EGFR* da como resultado la autofosforilación, activación de quinasas y activación posterior de tres vías de señalización principales, incluidas: RAS/RAF/MEK/ERK1/2, PI3K/AKT y la ruta STAT. *BIM* induce significativamente las funciones pro-apoptóticas tras la inhibición de *EGFR* a través de la regulación principalmente de ERK en células de CPCNP. La *CCND1* se suprime en gran medida por la inhibición de *EGFR*, lo que promueve la detención del ciclo celular. La señalización de ERK1/2 normalmente está regulada negativamente por una familia de fosfatasas MAPK de doble especificidad, conocidas como *DUSP* o *MKP*, especialmente *DUSP1*, *DUSP4* y *DUSP6* en *CPCNP*. *DUSP1* y *DUSP4* cumplen la función de terminar la señalización de *ERK* en el núcleo, mientras que *DUSP6* inhibe la activación de *ERK* en el citoplasma, como se muestra en la **figura 2**.

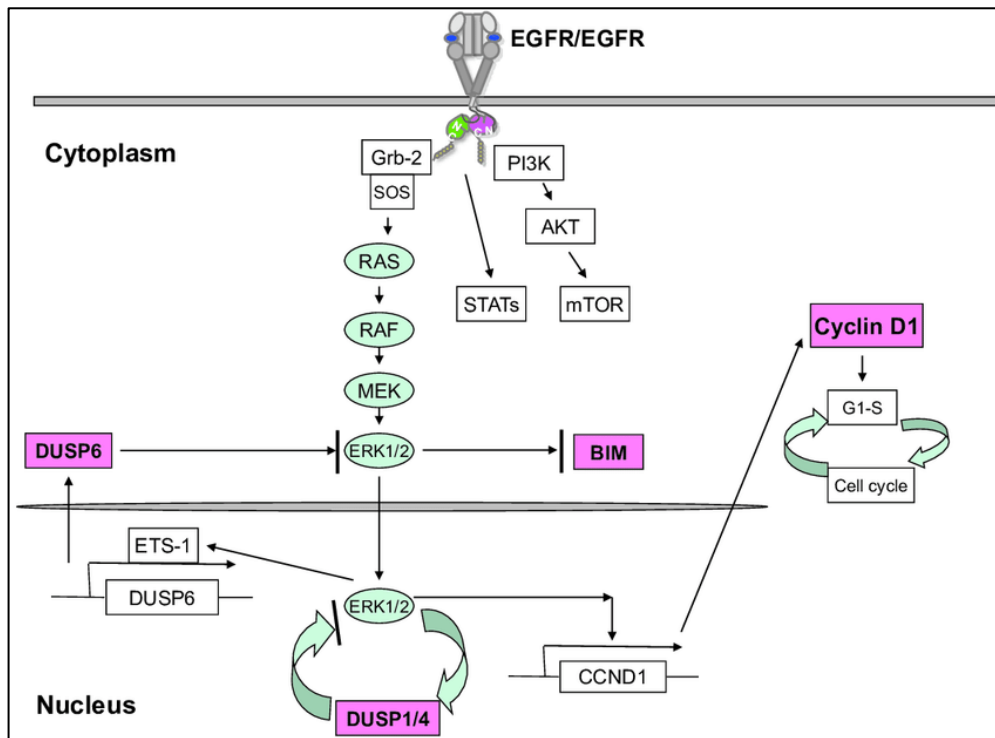


Figura 2. “Mediadores clave intracelulares de la vía de señalización de *EGFR* en el cáncer de pulmón.

La tasa de mutación de *EGFR* en pacientes con CPCE es 4–7% (88, 89, 90), siendo mucho más baja en comparación con los pacientes con histología ADC. Los pacientes con CPCE con mutaciones de *EGFR* que reciben tratamiento con inhibidores de la tirosinasa de EGFR (TKI) pueden beneficiarse más de este tratamiento, en comparación con la quimioterapia en monoterapia. Sin embargo, su eficacia no es tan robusta como la observada en pacientes con ADC con mutaciones de *EGFR* en tratamiento con EGFR-TKI. Por otra parte, parece ser que la amplificación de *EGFR* en CPCE no muestra una ganancia de función clara (91), pero sí una alta correlación con la abundancia de ARNm de los cinco ligandos de *EGFR*, estímulo necesario para impulsar la actividad de las vías de señalización de EGFR y podría ser un mejor predictor de la respuesta a los EGFR-TKI en pacientes con CPCE (92).

1.9.2.B. Vía de señalización PI3K.

La vía de señalización de PI3K es una de las más frecuentemente alteradas en el cáncer en humano (93-96), que pueden activarse por varios factores de crecimiento/ligandos específicos para diferentes Receptores de Tirosina Kinasa (RTK), incluidos los miembros de la familia EGFR, y la insulina y receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), entre otros (97). La principal vía alterada en el CPCE es la vía PI3K, identificada hasta en un 68% de los pacientes con CPCE (98). La activación de la vía de señalización PI3K mediada a través de alteraciones moleculares es fundamental en la génesis tumoral, así como en la resistencia a terapias antineoplásicas (96-99), como se puede observar en la **figura 3**.

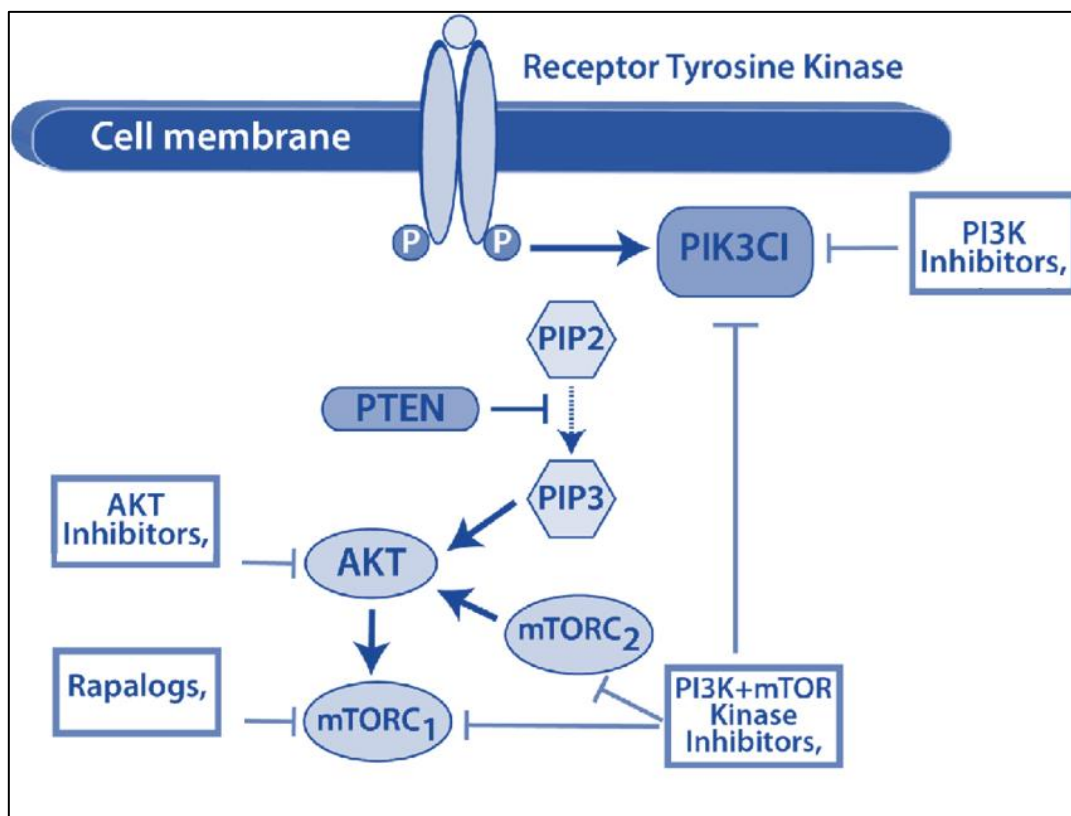


Figura 3: Terapias dirigidas a la desregulación de la ruta de señalización de PI3K/AKT/mTOR. Esquema gráfico de la vía de señalización de PI3K (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase), AKT (serine/threonine kinase), mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase). P (phosphate group). PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate). PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate). mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2).

1.9.2.C Vía de señalización CDK4/6 en el ciclo celular del CPCE.

La delección del locus *CDKN2A*, ubicado en el cromosoma humano 9p21, es una de las pérdidas genéticas más comunes en el cáncer humano (100, 101). *CDKN2A* está inactivado en el 72% de los casos de CPCE (4). El locus *CDKN2A* codifica dos proteínas relacionadas alternativamente, p16INK4a (p16) y p14ARF (p14), que funcionan como inhibidores del ciclo celular y como supresores de tumores. Las proteínas funcionan en distintas vías anticancerígenas: p16 regula el gen del retinoblastoma (*RBI*) y p14 regula p53. Rb1 es una proteína supresora de tumores que controla el ciclo celular al prevenir la entrada en la fase de síntesis de ADN (fase S), del ciclo de división celular (102). La proteína p16 inhibe directamente las actividades de la Ciclina. La quinasa dependiente de Ciclina (CDK) 4 y CDK6, mantienen RB1 en su estado desfosforilado, antiproliferativo y conduce a la detención del crecimiento celular (103). La proteína p53 es un supresor tumoral que juega un papel fundamental en la regulación del crecimiento celular después de exposición de las células a varios estímulos de estrés (104). La proteína p14 se asocia directamente con el doble minuto murino 2 (*MDM2*), un regulador negativo. En este mecanismo está involucrado frecuentemente en el desarrollo del CPCE.

1.9.2.D Vía de señalización VEGF-VEGFR.

El factor de crecimiento endotelial vascular, también denominado *VEGF-A*, es un miembro de una familia de proteínas que también incluye *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E* (105). *VEGF-B* salvaguarda el equilibrio entre el crecimiento y la degeneración de los vasos sanguíneos para garantizar la densidad e integridad normal de los vasos sanguíneos. *VEGF-C* y *VEGF-D* están principalmente implicados en la linfangiogénesis. *VEGF-A* juega un papel dominante en la regulación de la angiogénesis y la enfermedad, por lo que se le conoce simplemente como *VEGF*.

Los anticuerpos monoclonales neutralizantes (mAb) contra *VEGF* han mostrado un gran efecto en estudios preclínicos (106), y fueron el primer tipo de fármacos antiangiogénicos comercializados. En 2004, bevacizumab fue aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer colorrectal metastásico basado en los resultados de AVF2107

ensayo clínico (107). Sin embargo, a medida que los beneficios de bevacizumab se extendieron a otras neoplasias malignas, incluido CPCE, carcinoma de células renales, cáncer de ovario y cáncer de cuello uterino, se encontró que, en el CPCE, a pesar de su beneficio, el bevacizumab aumenta el riesgo de hemorragias pulmonares potencialmente mortales (108, 109). El Ramucirumab, es el único antiangiogénico (un anticuerpo monoclonal humano IgG1 dirigido al dominio extracelular de *VEGFR2*), que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de CPCE. Basado sobre los resultados del ensayo clínico de fase III REVEL (109). En la actualidad, Ramucirumab combinado con docetaxel se recomienda como terapia en segunda línea en CPCNP metastásico, tras progresión a la quimioterapia basada en platino (110).

1.9.2.E Vía de señalización *FGFR1*.

El receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR1*), pertenece a la familia del receptor de tirosina quinasa (RTK) de *EGFR*, que consta de cuatro miembros: *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* y *FGFR4*. Todos estos cuatro miembros comparten una arquitectura RTK canónica, que consiste en un gran enlace de ligando dominio extracelular que comprende tres inmunoglobulinas (D1, D2, D3), seguidos de una única hélice transmembrana y un dominio intracelular que contiene la "división" catalíticamente activa (111, 112). El ligando nativo de los FGFR es el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), que se pueden dividir en dos categorías: FGF similares a hormonas (*FGF19*, *FGF21* y *FGF23*) y FGF canónicos (*FGF110*, *FGF16–18* y *FGF20*) (112-114). La señalización intracelular de la vía FGFR está mediada principalmente a través de cuatro rutas descendentes e íntimamente interrelacionadas, siendo la primera RAS-RAF-MAPK, seguida de PI3K-AKT, transductor y activador de la transcripción (*STAT*) y finalmente la ruta de la fosfolipasa C γ (PLC γ) (115–117). La desregulación de la señalización de FGFR promueve la proliferación, la supervivencia y el desarrollo de resistencia a fármacos en las células tumorales, así como el desarrollo de angiogénesis y evasión inmune en el microambiente tumoral (TME). Es por esta razón que *EGFR* es un gen potencialmente susceptible de ser blanco terapéutico, particularmente en cáncer de pulmón.

1.9.2.F Vía de señalización de KEAP1/NRF2.

La proteína 1 asociada a ECH similar a Kelch (KEAP1, codificada por KEAP1)/factor nuclear eritroide 2 relacionado (NRF2, codificado por NFE2L2) juega un papel protector fisiológico contra elementos ambientales dañinos (118). Este sistema *KEAP1-NRF2* funciona como un sistema típico de dos componentes: *KEAP1* como sensor de elementos ambientales perjudiciales y *NRF2* como un efector para la activación coordinada de citoprotección genética. La vía de señalización de *NRF2* es primariamente regulada por *KEAP1* en respuesta a las especies reactivas a oxígeno (ROS) y electrófilos, pero también por la vía de señalización de PI3K con la quinasa glicógeno-sintetasa 3(*GSK3*) actuando como mediador. También interactúa con la vía autofágica a través del adaptador *TP62*. La hiperactivación de *NRF2* juega un papel crítico promoviendo la tumorigénesis y la resistencia a múltiples terapias.

Las alteraciones en la vía *KEAP1/NRF2* están significativamente potenciadas en cáncer de pulmón y de las vías respiratorias superiores. En el CPCE, las mutaciones en *NRF2* son más prevalentes mientras que las mutaciones en *KEAP1* son más comunes en ADC (113, 119–121). Se han encontrado mutaciones de la vía *KEAP1/NRF2* en aproximadamente un tercio de los pacientes con CPCE. *NRF2* tiene una doble función durante la carcinogénesis, prevenir el inicio del cáncer y promover la progresión del tumor. La activación de *NRF2* en las células tumorales se asocia con mal pronóstico y con enfermedad más agresiva (122,123). Esta contribución de *NRF2* al fenotipo maligno de las células tumorales es independiente de sus actividades antioxidantes y se asocia con su papel clave en la reprogramación metabólica de las células neoplásicas.

1.9.3 Biomarcadores predictivos y dianas terapéuticas en el CPCNP.

En la **tabla 1** se muestra los genes/proteínas recomendados en la práctica clínica en el último consenso nacional alcanzado en territorio español entre la Sociedad española de Oncología Médica (SEOM) y la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP), publicado en *Clinical and Translational Oncology* en 2023 (124). Además de recomendar los biomarcadores a estudiar en el diagnóstico de la enfermedad, describe el algoritmo que debe ser utilizado. El número de secciones para cada prueba se muestra en azul. Los

requisitos para la extracción de ácidos nucleicos para pruebas moleculares individuales o para pruebas genéticas ampliadas con paneles (NGS) son variables. (**Figura 4**).

Tabla 1: Biomarcadores, alteraciones accionables, metodología para la determinación y fármacos de uso clínico aprobados en CPCNP. Consenso SEAP Y SEOM

Gen	Alteración accionable	Metodología	Drogas (uso clínico aprobado)
ALK	Fusiones	IHQ, FISH, RT-PCR y NGS	alectinib
			ceritinib
			crizotinib
	Mutaciones oncogénicas	RT-PCR y NGS	brigatinib
			lorlatinib
BRAF	V600E	RT-PCR y NGS	dabrafenib + trametinib
EGFR	Deleciones exón 19, L858R	RT-PCR y NGS	afatinib
			dacomitinib
			erlotinib
			erlotinib + ramucirumab
			gefitinib
	osimertinib		
Inserciones exón 20	RT-PCR y NGS	amivantamab	
		mobocertinib	
		afatinib	
G719, L861Q, S768I		osimertinib	
T790M			
KRAS	G12C	RT-PCR y NGS	sotorasib
MET	D1010, exón 14 deleción, exón 14 splice, Y1003	FISH, RT-PCR y NGS	capmatinib
	Amplificación	FISH, RT-PCR y NGS	crizotinib
RET	Fusiones	IHQ, FISH, RT-PCR y NGS	tepotinib
			pralsetinib
ROSI	Fusiones	IHQ, FISH, RT-PCR y NGS	selpercatinib
			crizotinib
NTRK1,2,3	Fusiones	IHQ, FISH, RT-PCR y NGS	entrectinib
			crizotinib
PD-L1	IHQ+ >50% de las células	IHQ	entrectinib
			pembrolizumab
			durvalumab
			nivolumab,
EGFR	A763_Y764insFQEA	RT-PCR y NGS	aterozolizumab
ERBB2	Mutaciones oncogénicas	RT-PCR y NGS	erlotinib
			ado-trastuzumab emtansine
RET	Fusiones	FISH, RT-PCR y NGS	trastuzumab deruxtecan
EGFR	Exón 20 inserciones	RT-PCR y NGS	cabozantinib
	T790M		afatinib, gefitinib, erlotinib
ALK	C1156Y, G1269A, L1196M	RT-PCR y NGS	gefitinib, erlotinib, afatinib
	G1202R, I1171N		crizotinib
EGFR	C797G, C797S, G724S, L718V	RT-PCR y NGS	alectinib
	D761Y		osimertinib
			gefitinib

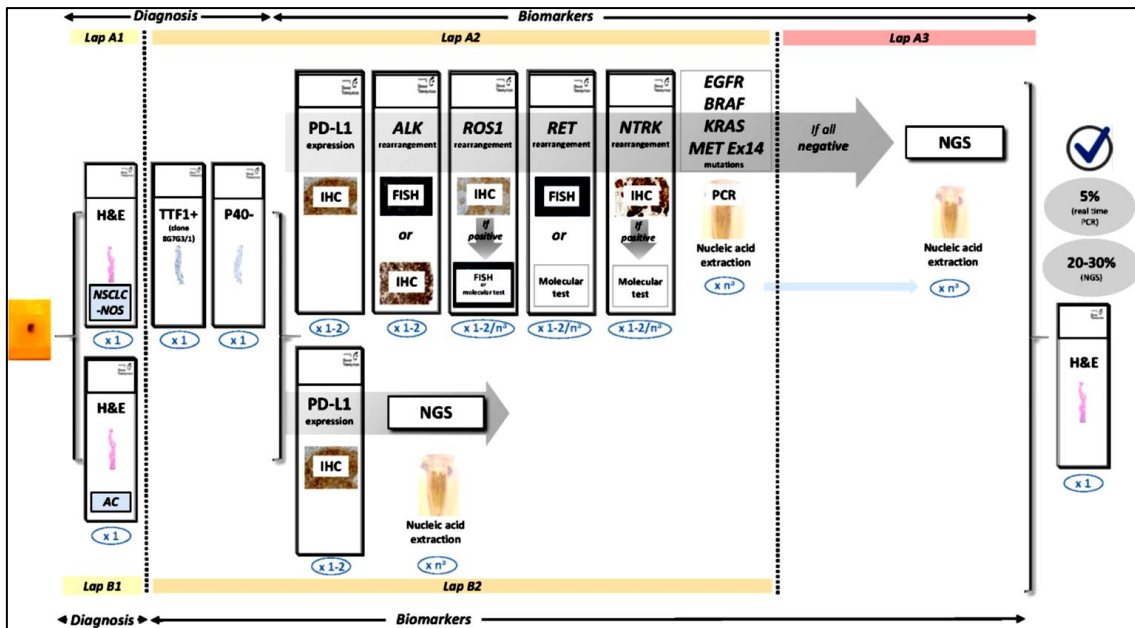


Figura 4. “Algoritmo recomendado para el estudio de los biomarcadores en el diagnóstico de pacientes con CPCNP avanzado.

1.10 Tratamiento.

El tratamiento varía según la etapa del cáncer. La resección quirúrgica es el único tratamiento con intención curativa para los estadios I y II. Para el estadio 1A, la quimioterapia no tiene ninguna relevancia. Por el contrario, para el estadio 1B, la quimioterapia adyuvante tras la resección quirúrgica del tumor se considera en los casos en los que el tamaño del tumor presenta un diámetro >4 cm. Para los estadios II la cirugía seguida de quimioterapia continúa siendo el *gold estándar*; por lo general, se prefiere la lobectomía y en los malos candidatos quirúrgicos, se puede considerar la resección sublobar. En los estadios I y II se considera la radioterapia si hay márgenes quirúrgicos positivos y también en aquellos casos irresecables o con contraindicaciones quirúrgicas (3, 125).

La mayoría de los tumores en estadio III son irresecables. El estadio IIIA, que definitivamente se estadifica durante la cirugía de resección, se puede considerar quimioterapia adyuvante sola o en combinación con radioterapia concomitante que es la

opción habitual. Para el estadio IIIB, se usan quimioterapia y radioterapia combinadas. En el estadio IV, se usa quimioterapia con radiación paliativa. Múltiples ensayos controlados aleatorizados y grandes metaanálisis confirman la superioridad de los regímenes de quimioterapia combinada para el CPCNP avanzado (126).

Como veremos en el siguiente apartado, la terapia dirigida a la aplicación de anticuerpos monoclonales en monoterapia son dependientes del estado mutacional del tumor.

1.10.1 Tratamiento quirúrgico.

Se pueden usar diferentes variantes de intervención quirúrgica para tratar (y posiblemente curar) el CPCNP. Con cualquiera de estas operaciones, también se extirpan los ganglios linfáticos cercanos para buscar una posible diseminación del cáncer. Estas operaciones requieren anestesia general y por lo general se realizan a través de una gran incisión quirúrgica entre las costillas en el lado del pecho o la espalda (llamada toracotomía).

Neumonectomía: esta cirugía extirpa un pulmón completo. Esto podría ser necesario si el tumor está cerca del bronquio principal.

Lobectomía: los pulmones están formados por 5 lóbulos (3 a la derecha y 2 a la izquierda). En esta cirugía, se extirpa todo el lóbulo que contiene el tumor. Cuando es posible, este suele ser el tipo de operación preferido para operar el CPCNP.

Resección pulmonar anatómica sublobar (RPAS), también denominada segmentectomía reglada: los pulmones, además de su organización anatómica por lóbulos (3 a la derecha y 2 a la izquierda), también se organiza por segmentos (10 segmentos en el pulmón derecho y 10 segmentos en el pulmón izquierdo). Este procedimiento consiste en reseca el segmento pulmonar donde se localiza el tumor, seccionando su correspondiente bronquio segmentario y los elementos vasculares que lo irrigan (arteria y vena segmentarias) junto con el parénquima pulmonar correspondiente. En estas cirugías, solo se extrae una parte de un lóbulo. Este enfoque podría usarse si una persona no tiene suficiente función pulmonar normal para resistir la extirpación de todo el lóbulo. Por su parte, la **segmentectomía atípica** es un procedimiento consistente en la resección de la lesión pulmonar incluyendo el parénquima circundante; pero sin incluir

estructuras broncovasculares. Este procedimiento quirúrgico está indicado para extirpar lesiones pulmonares periféricas.

1.10.2 Quimioterapia / Radioterapia.

1.10.2.A. Quimioterapia.

Aproximadamente, el 40% de los pacientes con cáncer de pulmón de nuevo diagnóstico se encuentran en estadio IV. El objetivo del tratamiento de estos pacientes es mejorar la supervivencia y reducir los eventos adversos relacionados con la enfermedad. Para el CPCNP en estadio IV, la quimioterapia de combinación citotóxica es la terapia de primera línea, que podría estar influenciada por la histología, la edad frente a la comorbilidad y el estado funcional (127). Los regímenes más extendidos incluyen antineoplásicos como el platino (Cisplatino o Carboplatino) más Paclitaxel, Gemcitabina, Docetaxel, Vinorelbina, Irinotecán o Pemetrexed (128). Los resultados de varios estudios han demostrado que ningún régimen único mostró una superioridad significativa sobre cualquier otra combinación. La mediana de SG de los pacientes en estos estudios fue entre 8 y 10 meses (129-132). La combinación específica depende de los tipos y frecuencias de los efectos tóxicos y debe decidirse de forma individual. El Cisplatino a pesar de ser más eficaz, se ha asociado con múltiples efectos adversos. Algunas razones por las que la quimioterapia debe interrumpirse son los efectos adversos graves y la falta de respuesta tumoral o el crecimiento progresivo del tumor y si después de cuatro ciclos de tratamiento, la enfermedad se estabiliza, pero sin embargo el tratamiento no reduce el tamaño del tumor (133, 134).

1.10.2.B Radioterapia.

La radioterapia utiliza haces de alta energía para dañar el ADN dentro de las células cancerosas, destruyéndolas. Esta terapia puede ayudar a controlar o eliminar tumores en sitios específicos del cuerpo. Los pacientes con CPCNP que se localiza en el tórax y que no son candidatos para la resección quirúrgica pueden beneficiarse de la radioterapia. La radioterapia también puede ser parte de los cuidados paliativos para

mejorar la calidad de vida de los pacientes con CPCNP que no responden a la cirugía o la quimioterapia (135).

Si bien es cierto que se pueden usar diferentes tipos de radioterapia para tratar el CPCNP, los 2 tipos principales y más empleados en la práctica clínica son:

1. Radioterapia de haz externo
2. Braquiterapia (radioterapia interna)

1.10.2.B.1 Radioterapia externa: La radioterapia de haz externo enfoca la radiación desde el exterior del cuerpo hacia el cáncer. Este es el tipo de radioterapia que se usa con más frecuencia para tratar el CPCNP. El tratamiento es muy parecido a hacerse una radiografía, pero la dosis de radiación es más fuerte. El procedimiento es indoloro y cada tratamiento dura solo unos minutos. La mayoría de las veces, los tratamientos de radiación a los pulmones se administran 5 días a la semana durante 5 a 7 semanas, pero esto puede variar según el tipo de radioterapia y las características del tumor. Se ha demostrado que las técnicas de radioterapia externa más modernas ayudan a los médicos a tratar los cánceres de pulmón con mayor precisión y, al mismo tiempo, reducen la exposición a la radiación de los tejidos sanos cercanos. Éstos incluyen:

- I. La radioterapia corporal estereotáctica (SBRT), también conocida como radioterapia ablativa estereotáctica (SABR). Se usa para pacientes con CPCNP en etapa temprana que tienen un solo nódulo pequeño en el pulmón sin metástasis en los ganglios linfáticos cercanos. Esta técnica utiliza un sistema de coordenadas avanzado para localizar con precisión el tumor y garantizar la colocación precisa del dispositivo de seguimiento. Esto permite dar la radiación concentrada y altamente enfocada. Se ha descubierto que la SBRT ofrece control local y resultados que se aproximan a la resección quirúrgica con tasas más bajas de morbilidad relacionada con el tratamiento (136, 137).
- II. Radioterapia conformada tridimensional (3D-CRT)
- III. Radioterapia de intensidad modulada (IMRT)
- IV. Radiocirugía estereotáctica (SRS)

1.10.2.B.2 Braquiterapia (radioterapia interna): La braquiterapia a veces se emplea para reducir los tumores en las vías respiratorias para aliviar los síntomas de los pacientes con CPCNP. Consiste en colocar una fuente de material radiactivo (a menudo en forma de pequeños gránulos) directamente en el cáncer o en las vías respiratorias junto al cáncer. Esto generalmente se hace a través de un broncoscopio, pero también se puede hacer durante la cirugía. La radiación viaja solo una corta distancia desde la fuente, lo que limita los efectos sobre los tejidos sanos circundantes. La fuente de radiación generalmente se elimina después de un corto tiempo. Con menos frecuencia, pequeñas "semillas" radiactivas se dejan en su lugar de forma permanente y la radiación se debilita durante varias semanas.

1.11 Microambiente inmune tumoral e Inmunoterapia.

Las interacciones recíprocas entre células del cáncer de pulmón y los componentes estromales e inmunitarios de su microambiente influyen no sólo en la evolución del tumor (138, 139), sino también en su respuesta a las terapias de base inmunológica (140). En este sentido, se ha encontrado que el CPCE está enriquecido en neutrófilos, diversos subconjuntos de células CD4+, incluidas las inmunosupresoras células T reguladoras y células CD8+ que expresan muerte celular programada (PD1, codificada por PDCD1), mientras que contiene cantidades más bajas de macrófagos (141). La supresión inmune parece desempeñar un papel importante en la progresión del CPCE en modelos animales (murinos). El aumento de los niveles de varias moléculas inmunosupresoras, incluido el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1, también conocido como CD274), se han observado en varios modelos transgénicos de CPCE (142, 143-145).

El desarrollo y crecimiento del tumor primario dependen, entre otros factores, de la capacidad de evadir la respuesta inmunomediada. Una de esas formas en que la evasión inmune puede lograrse es mediante la regulación de la expresión tumoral de PDL1. PD1 se expresa en linfocitos T y se une a su ligando PDL1 en las células tumorales y células estromales asociadas. Esto da como resultado la inhibición de la activación de las células T y el agotamiento de las células T previniendo de este modo la respuesta inmune mediada por células T. Actualmente, existen anticuerpos monoclonales PD1/PDL1 utilizados eficazmente en el tratamiento del CPCNP, entre los que podemos mencionar: nivolumab,

pembrolizumab, atezolizumab y durvalumab (146). Sin embargo, estos logran una respuesta en sólo ~ 15-25% de los pacientes con alta incidencia de efectos secundarios inmunomediados (147). Una mejor comprensión de los mecanismos a través de los cuales las células del CPCE evaden la respuesta inmune es clave para la identificación de biomarcadores para la estratificación de pacientes y el desarrollo de terapias combinadas que pueden mejorar respuesta a los tratamientos actuales.

Estudios recientes han confirmado el papel preponderante que supone la expansión de la inmunoterapia [incluida la muerte celular programada-1 (PD-1)/muerte celular programada-ligando 1 (PD-L1) y la inhibición de la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4)], mejoran la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con CPCE (148, 149).

Una vía potencial en el campo de las terapias para los pacientes con CPCE implica la inhibición del punto de control inmunitario. Las alteraciones en el gen HLA-A se observaron con frecuencia en el CPCE en los estudios llevados a cabo por el Proyecto Atlas del Genoma del Cáncer, lo que sugiere un papel prominente para la evasión inmune para estos cánceres (150). Los caminos más avanzados en el estudio incluyen el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1) y muerte celular programada-1 (PD-1) y la vía CTLA-4. Los tumores intentan escapar de la vigilancia y detección inmunitaria expresando PD-L1, que a su vez interactúa con el PD-1 en las células T. Esta interacción conduce a la supresión de la respuesta de células T antitumorales. Hoy en día existen terapia aprobadas por las agencias de fármacos y alimentos de los Estados Unidos (FDA) y europea (EMA), para interrumpir este punto de control PD-1/PD-L1 (**Figura 5**). Dos de estas terapias son nivolumab y pembrolizumab, que son anticuerpos monoclonales contra el receptor PD-1 en las células T para desenmascarar la latente respuesta antitumoral de la célula T (151-153). Los tumores pueden expresar PD-L1, que interactúa con PD-1 en las células T, lo que lleva a la supresión de la respuesta de células T antitumorales. PD-L1 y los inhibidores de PD-1 previenen esta interacción, liberando la respuesta antitumoral de la célula T. Los anticuerpos anti-CTLA-4 se unen a CTLA-4 para aumentar la proporción de células T efectoras para la regulación negativa de las células T para lograr el mismo efecto. Muerte celular programada-1 (PD-1); ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1); antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4), tal como se muestra en la **Figura 5**.

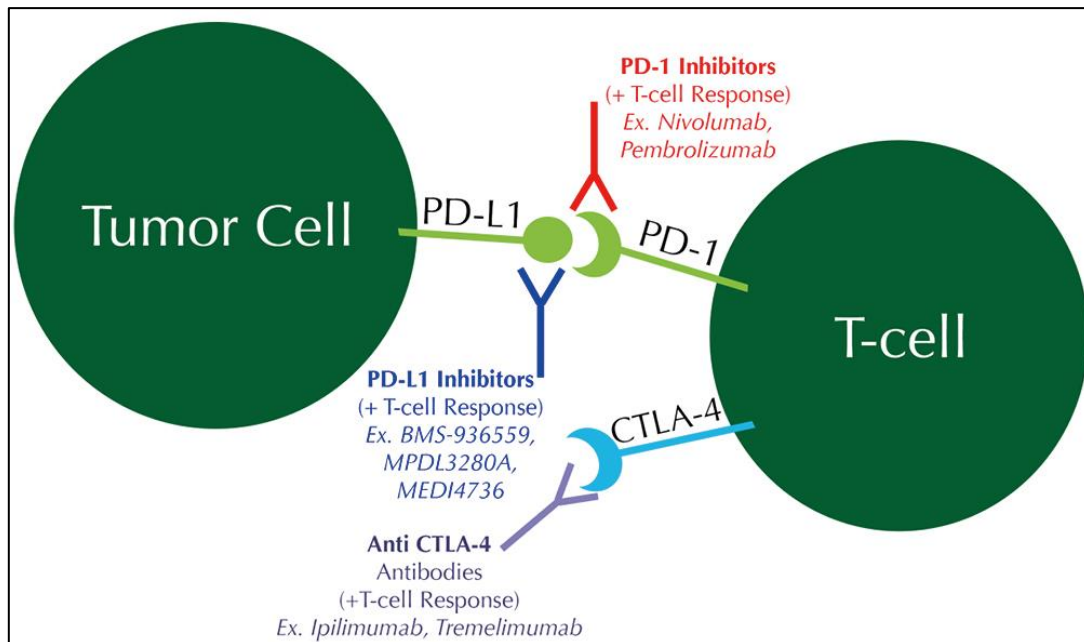


Figura 5. Mecanismos del punto de control inmunitario.

En estudios realizados antes de octubre de 2014, pembrolizumab había logrado la designación de terapia revolucionaria para aquellos casos de CPCNP que no mostraban alteraciones en *EGFR* y *ALK* tras la quimioterapia basada en platino (fase I del estudio KEYNOTE-001). Se analizó un total de 282 pacientes con CPCNP avanzado que no habían recibido tratamiento previo. Fueron tratados con pembrolizumab una vez cada 3 semanas. La tasa de respuesta global en el grupo de histología escamosa fue 18-25% y del 23% para el grupo de histología no escamosa. La supervivencia libre de progresión y la SG también fue mayor en pacientes con expresión inmunohistoquímica de PD-L1 fuertemente positiva (154).

Los inhibidores de puntos de control inmunitarios (PCI) dirigidos a PD-L1, tales como el nivolumab, han mejorado notablemente el panorama del tratamiento del CPCE avanzado. Los inhibidores de puntos de control inmunitarios solos o en combinación con quimioterapia o con otros inhibidores de puntos de control inmunitarios, debe ser el tratamiento de elección de primera línea para pacientes con CPCNP avanzado que no tengan contraindicaciones para inmunoterapia y cuyos tumores no albergan mutaciones específicas que permitan comenzar con una terapia dirigida frente a dicha mutación. La

combinación de inmunoterapia con quimioterapia basada en platino en primera línea es beneficioso, independientemente del estado de PD-L1 tumoral. Por el contrario, la combinación de ipilimumab y nivolumab está aprobado en primera línea para el tratamiento de pacientes con CPCNP avanzado/metastásico cuyo PD-L1 tumoral es $\geq 1\%$.

1.12 Evolución clínica y seguimiento de los pacientes con CPCE.

1.12.1 Monitorización de las recaídas y resistencias al tratamiento. Papel de la biopsia líquida.

La biopsia líquida (BL) se perfila como un método prometedor para la identificación de pacientes con alto riesgo de progresión de la enfermedad después de la cirugía curativa, así como seguimiento longitudinal de la progresión de la enfermedad y la respuesta a la terapia. Además, la BL es una forma no invasiva de obtener fácilmente ADN tumoral circulante (ADNct) por la sangre periférica de pacientes con neoplasias avanzadas. Los métodos de BL permiten el seguimiento en tiempo real del comportamiento biológico del tumor (155) como se representa en la **Figura 6**. En la actualidad, las técnicas de BL pueden detectar células tumorales circulantes (CTC), ADNtc, exosomas, microARN (miARN), ARN circulante en sangre periférica, plaquetas sanguíneas educadas en tumores (TEP) y células endoteliales vasculares tumorales circulantes (CTEC) (156). Sin embargo, la detección de ADNct es la más utilizada en los laboratorios de patología molecular.

Las aplicaciones prácticas de la biopsia líquida, en particular la realizada a partir de muestras de sangre venosa de pacientes con cáncer de pulmón, tienen especial relevancia en el uso clínico para el monitoreo en tiempo real de la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento, además de resolver con éxito la heterogeneidad tumoral (155, 157), incluso en aquellos casos en los que no se puede acceder al tejido tumoral del paciente. La biopsia líquida tiene el potencial de usarse clínicamente para brindar oportunidades únicas para el monitoreo en tiempo real de la progresión de la enfermedad y de la respuesta al tratamiento, además de estudiar la heterogeneidad tumoral (**Figura 6**).

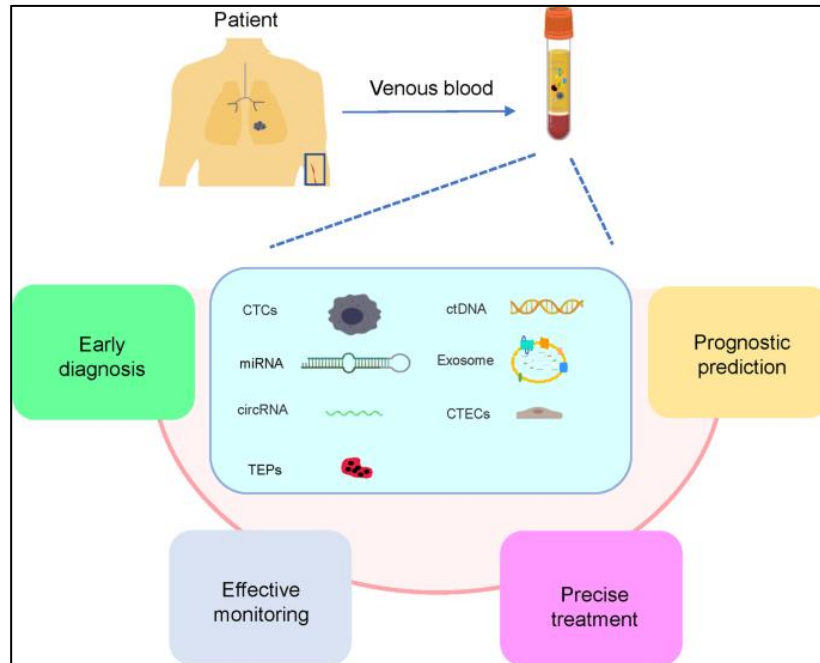


Figura 6. “Aplicación clínica de la BL en el cáncer de pulmón. Células tumorales circulantes (CTC), ADN tumoral circulante (ADNtc), exosomas, microARN (miARN), ARN circular (circARN), plaquetas educadas en tumores (TEPs) y células endoteliales vasculares tumorales circulantes (CTECs)”.

Otra de las principales aplicaciones de la BL en la práctica clínica actual es la monitorización de pacientes con CPCNP que han progresado después de una terapia inicialmente exitosa con inhibidores de tirosina quinasa (TKI) de *EGFR* de primera o segunda generación, en los que se ha detectado la mutación de resistencia T790M (Thr790Met) detectable en el exón 20 del gen *EGFR*. La mutación T790M podría detectarse en un tumor o en una nueva biopsia de ganglio linfático o en el ADN tumoral circulante libre (cfDNA) en una biopsia líquida. En caso de detectarse dicha mutación en estos pacientes, podría estar indicado avanzar hacia otra línea de tratamiento con TKI de *EGFR* de tercera generación frente a los inhibidores que aún no se han detectado mutaciones de resistencia, por ejemplo, Osimertinib (158).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Recientes investigaciones en el campo de la genética tumoral y en el estudio de nuevos biomarcadores oncológicos, ponen de manifiesto que el carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) es una neoplasia biológicamente muy heterogénea en cuanto a sus características moleculares, respuesta terapéutica y pronóstico de los pacientes.

Se ha acumulado una gran cantidad de información sobre los biomarcadores predictivos en el carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP). La mayoría de ellos se han identificado en el subtipo histológico de adenocarcinoma (ADC). En este sentido, las alteraciones a nivel del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y los reordenamientos de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*) merecen especial atención por su significado terapéutico. Se estima que uno de cada tres pacientes con histología ADC se benefician de este tipo de tratamientos, evitando recaídas precoces y mejorando la supervivencia global del paciente. Sin embargo, la aplicación de terapias moleculares dirigidas al CPCE en el entorno clínico es muy limitado, convirtiéndose en una de las principales áreas de enfoque en la investigación. Para este subtipo histológico, la inmunoterapia genera en la actualidad una nueva esperanza y se está aplicado con éxito en algunos pacientes. Aunque los pacientes con terapia de PCI pueden lograr una supervivencia global (SG) a largo plazo, los mecanismos subyacentes a la resistencia y/o sensibilidad frente al bloqueo PD-L1/PD-1 actualmente no se conocen bien, existiendo la necesidad inminente de identificar nuevos biomarcadores capaces de predecir con precisión la respuesta a la inmunoterapia en este tipo de pacientes.

El perfil de expresión génica (GEP), es una herramienta interesante para la identificación de nuevos marcadores genéticos, que permite el estudio de varios miles de genes específicos de forma simultánea. En el caso concreto del cáncer de mama, las

herramientas basadas en análisis de GEP como PAM50® (Prosigna; NanoString Technologies, Seattle, WA) y Oncotype DX® (RS; Genomic Health, Redwood City, CA), se han establecido de forma rutinaria en la práctica clínica y resultan fundamentales como predictores de recaídas tempranas, posicionándose como una importante herramienta para identificar biomarcadores asociados al pronóstico y tratamiento de pacientes con diferentes tipos de neoplasias, incluido el CPCE. La identificación de estas moléculas permitirá un protocolo más rápido, barato y preciso en la toma de decisiones para un tratamiento personalizado del CPCE.

OBJETIVOS:

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo doctoral nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Profundizar en el conocimiento de la heterogeneidad genética/genómica del carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) a nivel intratumoral, buscando identificar aquellas alteraciones implicadas en pronóstico y/o en la respuesta al tratamiento mediante la identificación de los diferentes clones de células tumorales presentes en el tumor con técnicas de FISH multicolor, análisis del número de copias de secuencias de DNA (CVN) y perfiles de expresión mediante arrays de alta densidad.
2. Identificar las alteraciones cromosómicas más frecuentes y los patrones de evolución clonal a nivel intratumoral en el CPCE, así como la posible correlación con las características clínico-biológicas e histopatológicas de la enfermedad con influencia significativa en la SG de una serie larga de pacientes.
3. Analizar el perfil de la expresión diferencial de genes involucrados en la compleja interacción entre el tumor, el microambiente y la respuesta inmunitaria en pacientes con CPCE, lo que podría permitir conocer los mecanismos de evasión inmunitaria.
4. Establecer las posibles asociaciones existentes entre las alteraciones individuales de cada cromosoma y gen estudiado y los patrones de expresión encontrados, con el comportamiento clínico-biológico de la enfermedad y respuesta al tratamiento, con especial énfasis en la identificación de la

expresión anómala de genes que nos permitan predecir la respuesta al tratamiento en pacientes CPCE que hayan recibido inmunoterapia.

5. Diseñar un algoritmo genómico que nos permita predecir la respuesta a la terapia anti-PD-L1 en el momento del diagnóstico y validarlo en una serie independiente de pacientes con CPCE tratados con inmunoterapia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Pacientes y muestras.

En este estudio, analizamos retrospectivamente especímenes quirúrgicos procedentes, en un primer momento, de 48 pacientes consecutivos diagnosticados de carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE), en el período de tiempo comprendido entre los años 1999 y 2010. Todos los pacientes provenían de diferentes provincias de la comunidad autónoma de Castilla y León, incluso de otras comunidades autónomas vecinas. Los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente en el servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de Salamanca (centro de referencia de Cirugía Torácica en la comunidad autónoma de Castilla y León). Las características clínico-patológicas y aquellas regiones cromosómicas en las que se encontró una influencia significativa en el pronóstico de la enfermedad se extendieron al estudio que incluía un total de los 108 pacientes (105 hombres y 3 mujeres; con una mediana de edad de 66 años, con un rango de 27 a 83 años). Cada paciente proporcionó su consentimiento informado antes del comienzo del estudio. Todos los sujetos fueron sometidos a una resección quirúrgica del tumor primario en nuestra institución, y fueron diagnosticados y clasificados según los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) vigentes al momento del diagnóstico y reclasificados según los criterios de la reciente clasificación de la OMS y del sistema de estadificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC 8^o edición), de los tumores pulmonares (159), previo a cualquier tipo de tratamiento médico. Se clasificaron 85 casos en estadios precoces (tumores pT1-pT2) y 23, en estadios avanzados (tumores pT3-pT4).

El estudio histopatológico de los casos y su respectivo diagnóstico anatomopatológico fue realizado por un patólogo experto en cáncer de pulmón.

Confirmamos completamente las características histopatológicas y el grado en una segunda evaluación, que fue realizada por dos patólogos independientes con amplia experiencia en este campo. El estudio cerró con una mediana de tiempo de seguimiento de 47 meses (rango: 26-58 meses). El estudio fue autorizado por el comité de ética local del Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, España) y también obtuvimos previamente el consentimiento informado de cada paciente en estudio. Las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio fueron revisadas, previa autorización de los centros responsables. Las historias clínicas revisadas se encontraban tanto en formato físico (papel), como en formato digital. Estas últimas se recogieron del sistema informático JIMENA que recopila información clínica de los pacientes a nivel de toda la comunidad autónoma de Castilla y León (España). La **tabla 2** proporciona los datos clínicos, biológicos, histopatológicos y evolutivos de los pacientes incluidos en nuestro estudio (n=108 casos).

Tabla 2. Características clínico-patológicas de los 108 pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) incluidos en el presente estudio.

Variables	Nº de casos (%)
Sexo	
Hombre	105 (97)
Mujer	3 (3)
Edad	
< 65	37 (34)
≥ 65	71 (66)
T- estadio del tumor primario	
pT1-T2	85 (79)
pT3-T4	23 (21)
Ganglios linfáticos	
pN0	76 (70)
pN1	18 (17)
pN2	14 (13)
pN3	0 (0)
Invasión pleural	
PL0	86 (80)
PL1	18 (17)
PL2	4 (3)
Estadio según AJCC	
I	52 (48)
II	35 (32)
III	19 (18)
IV	2 (2)
Tipo de cirugía	
R0	105 (97)
R1	3 (3)
Recurrencia Local	
No	30 (34)
Si	57 (66)
Metástasis	
No	42 (49)
Si	44 (51)
Seguimiento	
Exitus	
No	16 (15)
Si	89 (85)

Tabla 2. AJCC: American Joint Committee on Cancer (basado en la 8ª ed de la AJCC); NS: estadísticamente no significativo ($P > .05$); pT1: tumor ≤ 3 cm de diámetro máximo, rodeado por ejido pulmonar o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal al bronquio lobar (ej. no en el bronquio principal); pT2: tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm; pT3: tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm de diámetro máximo; o que invade directamente alguno de los siguientes: pleura parietal (PL3), pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal; o nódulo(s) tumorale(s) separado(s) en el mismo lóbulo que el

primario; pT4: tumor >7 cm de diámetro mayor; o tumor de cualquier tamaño invadiendo uno o más de los siguientes: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral o Carina; o nódulo(s) tumoral(les) separado(s) en un lóbulo diferente, ipsilateral al del tumor primario; pN0: no metástasis en ganglios linfáticos regionales; pN1: metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales e intrapulmonares, incluyendo aquellos afectados por extensión directa; pN2: metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales; pN3: metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales; PL0: tumor que no infiltra la capa elástica de la pleura visceral; PL1: invasión de la pleura visceral está presente cuando el tumor infiltra más allá de la capa elástica de la pleura visceral; PL2: extensión tumoral a la superficie de la pleura visceral; R0: ausencia microscópica de infiltración tumoral en los márgenes quirúrgicos; R1: presencia microscópica de infiltración tumoral en los márgenes quirúrgicos.

La recogida de los datos para la obtención de las variables clínico-biológicas de los pacientes, correspondientes al diagnóstico y estadio patológico de la enfermedad, el tipo de cirugía, el estado de los márgenes quirúrgicos, así como variables demográficas (ej. edad, sexo), fueron obtenidas a partir del informe correspondiente del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca a través de su programa PAT-Win; en cuanto a los datos de seguimiento (supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global y evolución), así como la clínica del paciente, se obtuvieron a partir del portal JIMENA de la Junta de Castilla y León. Finalmente se recopiló toda la información mencionada anteriormente en el programa SPSS 21.0 (Software Programs, Chicago, IL, USA).

3.2 Diseño y construcción de matrices tisulares (tissue microarray-TMA).

El sistema de análisis de múltiples muestras tisulares en un mismo bloque de parafina se denomina “tissue microarray” (TMA). Consiste en colocar varios cilindros de tejido procedentes de diferentes muestras tisulares previamente fijadas, parafinadas y debidamente identificadas, en un bloque de parafina virgen, haciendo coincidir la localización de cada uno de los cilindros, con la localización preestablecida en una plantilla o mapa. Por lo tanto, al realizar cortes histológicos de dicho bloque, obtenemos preparaciones con múltiples muestras de tejido, resultando de gran utilidad en investigación ya que nos permite analizar de una sola vez múltiples muestras de tejido.

En la actualidad, existen mecanismos y aparatos que permiten realizar bloques de TMA de manera automática. En nuestro caso, empleamos un mecanismo manual (manual

tissue arrayer) para confeccionar los tres tissue microarrays incluidos en el presente estudio (**Figura 7**).

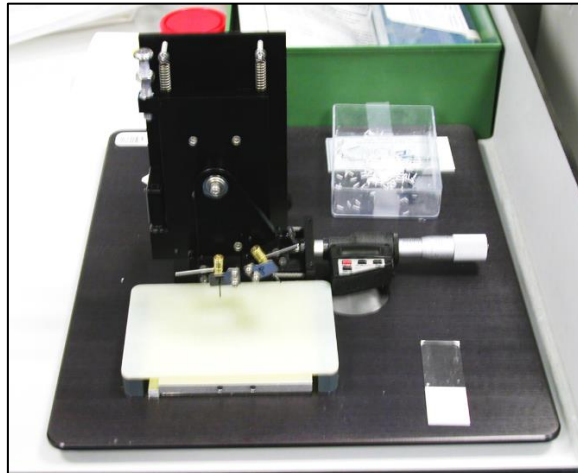


Figura 7: Aparato para la para la construcción de los TMA. Los microarrays de tejido consisten en bloques de parafina en los que se ensamblan múltiples cilindros de tejido separados y controlados con una matriz para permitir el análisis histológico.

Utilizando un instrumento de matrices tisulares manual, extrajimos un fragmento central de biopsia de 0,6 mm de diámetro de los bloques de tejido fijado en formol tamponado al 10% e incluido en parafina, que contenían biopsias de los tumores primarios de todos los pacientes ($n = 108$). Una vez seleccionadas por un patólogo las áreas tumorales de las secciones histológicas, se incrustaron los cilindros de tejido de cada espécimen en bloques de parafina virgen (**Figura 8**).

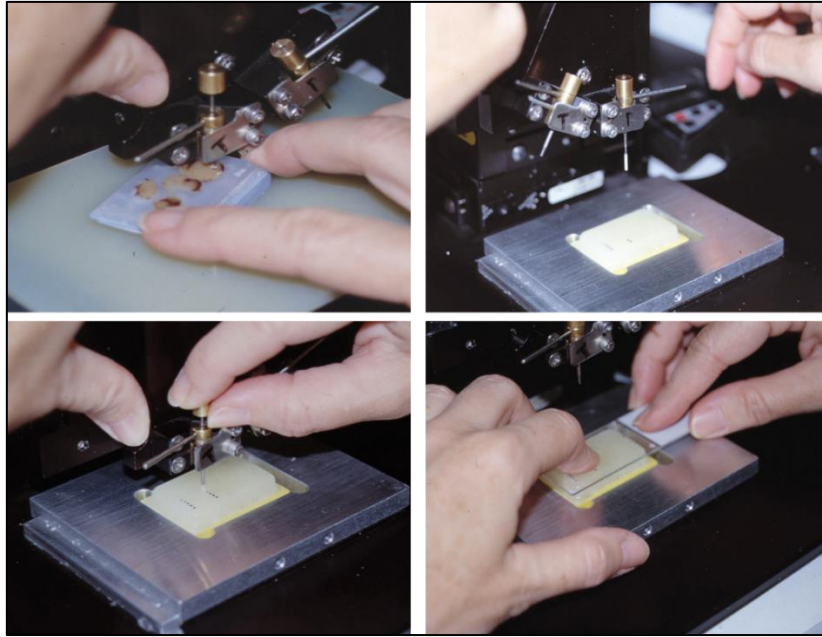


Figura 8: Proceso para la confección de los TMA.

Todas las muestras de tumores se incluyeron por triplicado en los TMA, utilizando muestras de tejido normal del mismo paciente como control (ganglio linfático normal, bronquio normal y parénquima pulmonar normal alejado del tumor). Se completaron tres TMA de CPCE (**Figura 9**).

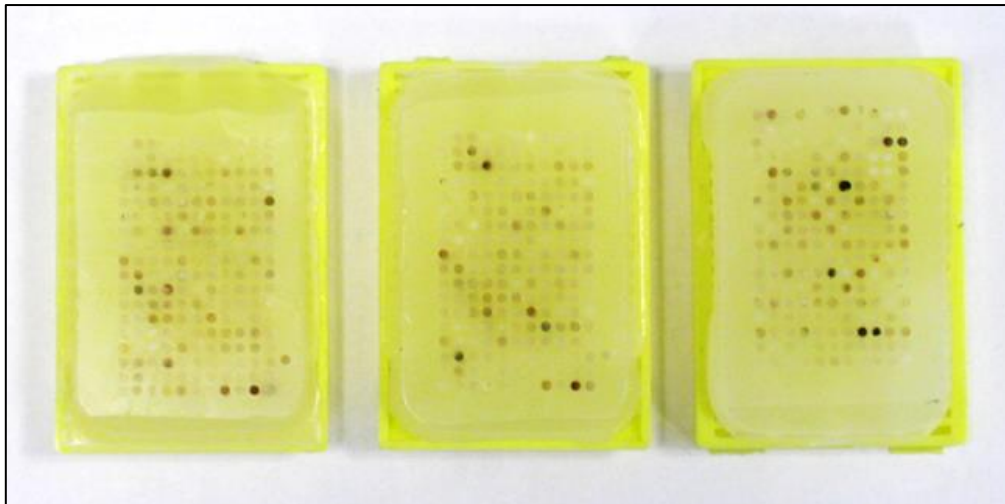


Figura 9: TMA contruidos con el tejido de los 108 pacientes incluidos en el presente estudio. En cada uno de los bloques de parafina se introdujeron varios tejidos no tumorales como control externo para la correcta valoración e interpretación de la calidad de las técnicas.

3.3 Estudio de la expresión proteica. Técnicas de inmunohistoquímica.

Para ello, procedimos al desparafinado de las secciones de TMA fijadas en formalina e incrustadas en parafina de 4 micras de espesor en xileno y posteriormente rehidratadas. La recuperación antigénica se realizó utilizando un calentador en tampón citrato 0,01 M y pH 6,0. La inactivación de la peroxidasa endógena se realizó con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0,3% en metanol durante 15 minutos.

Los anticuerpos y los reactivos se incluyeron automáticamente utilizando el procesador Leica BOND-III (Leica Biosystems, Newcastle, CA, EE. UU.) (**Figura 10**), utilizando los protocolos y recomendaciones estándar de los fabricantes. Las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina. Las clonas utilizadas con sus respectivas diluciones, fabricantes e interpretaciones de los anticuerpos primarios utilizados se especifican en la **tabla 3**. Los criterios de expresión inmunohistoquímica empleados para la interpretación proteica de EGFR fueron los siguientes: (0/+), sin tinción membranosa o baja expresión en células tumorales; (++) , 1–35% de células tumorales con tinción moderada de membrana; y (+++), >35% de células tumorales con tinción fuerte de membrana. Los criterios de expresión inmunohistoquímica empleados para la interpretación de la expresión proteica de TTF-1 fueron los siguientes: Positivo (+), tinción positiva moderada-intensa en los núcleos de todas las células tumorales y Negativo (-) ausencia de tinción nuclear en las células tumorales. Los criterios de expresión inmunohistoquímica empleados para la interpretación de p40 fueron los siguientes: Positivo (+), tinción positiva moderada-intensa en los núcleos de todas las células tumorales y Negativo (-), ausencia de tinción nuclear en las células tumorales.



Figura 10. Procesador automático Leica BOND-III (Leica Biosystems, Newcastle, CA, EE. UU.), con el que se llevaron a cabo las tinciones inmunohistoquímicas de las tres TMA. Para su aplicación se siguieron los protocolos y las recomendaciones estándar de los fabricantes.

Tabla 3. Anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico.				
Anticuerpo	Clon	Dilución	Fuente	Interpretación
TTF-1	SPT24	1:200	Novocatra TM Leica Biosystems	Negativo: ausencia de tinción en núcleos de las células tumorales. Positivo: tinción nuclear.
p40	BC28	Prediluido	BOND prediluido. Anticuerpo primario TM Leica Biosystems	Negativo: ausencia de tinción en los núcleos de las células tumorales Positivo: tinción nuclear.
EGFR	EGFR113	1:20	Novocatra TM Leica Biosystems	Negativo: ausencia de tinción en las membranas de las células tumorales. Positivo: tinción positiva de membrana en cualquier cantidad de células tumorales.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para el estudio inmunohistoquímico de los TMA. Factor de Transcripción Tiroideo-1 (TTF-1). proteína anti-p40 (p40), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus características de laboratorio e interpretación microscópica.

A modo de ejemplo se ilustra 4 TMA (**Figura 11**) contrateñidos con los diferentes anticuerpos empleados en el presente trabajo (n=108). Además, se muestra un ejemplo de la positividad de cada uno de los anticuerpos empleados, EGFR (**Figuras 12 B**), P40 (**Figura 12.C**), TTF-1 (**Figura 12 D**).

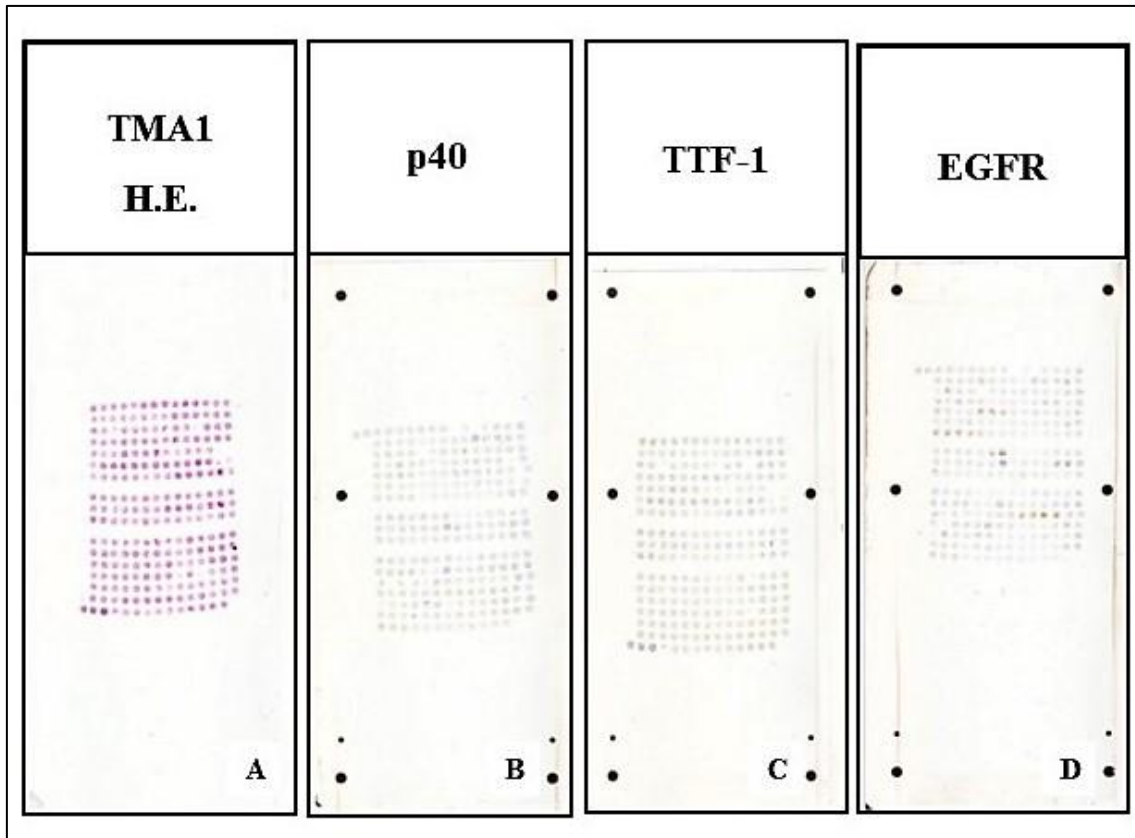


Figura 11. Representación del tissue microarray 1 (TMA1). Tinción de Hematoxilina Eosina (H.E) (A), inmunohistoquímica con anticuerpo p40 (B), inmunohistoquímica con anticuerpo TTF-1 (C), inmunohistoquímica con anticuerpo EGFR (D).

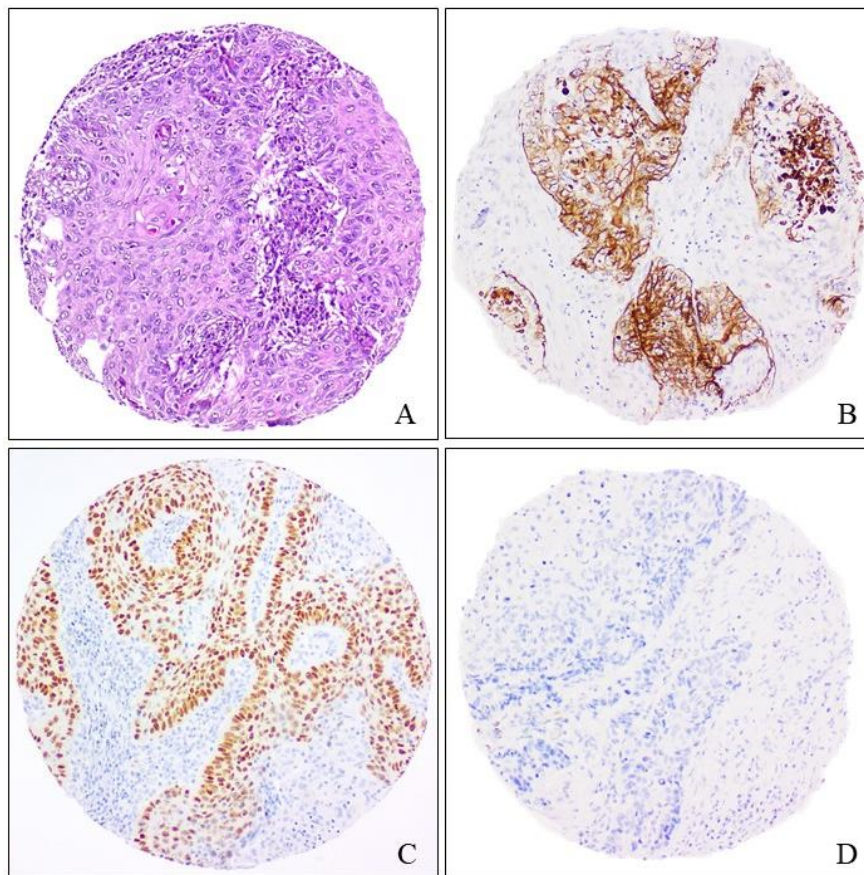


Figura 12. Representación de tejido tumoral extraído de los TMA y contrateñidos con hematoxilina eosina y los anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico: Hematoxilina Eosina, correspondiente a un carcinoma de células escamosas de pulmón (A). Técnica inmunohistoquímica con anticuerpo EGFR. Se observa tinción positiva fuerte en color marrón, en la membrana y citoplasma de las células tumorales. Los núcleos de las células tumorales y el estroma entre los nidos tumorales son negativos y se ven de color azul (B). Técnica inmunohistoquímica con anticuerpo p40. Se observa tinción positiva fuerte de color marrón en el núcleo de las células tumorales. El citoplasma y la membrana de las células tumorales, así como el estroma entre los nidos de células tumorales son negativos (C). Técnica inmunohistoquímica con Factor de Transcripción Tiroideo-1 (TTF-1). Se observa ausencia total de expresión en las células tumorales (D).

3.4 Estudio de alteraciones genéticas. Técnicas de FISH.

Los estudios de hibridación in situ fluorescente (FISH) para las regiones cromosómicas: 5p15.2, 5q31, 7q31, 8p11.1, 8q24, 9p21, 9p11.1, 13q14 y 13q34 se realizaron en un total de 48 pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE) en un único TMA, mientras que los estudios para las regiones cromosómicas: 7p12, 7p11.1 y 22q12

(regiones cromosómicas con influencia significativa en la supervivencia; $p < 0.05$) se analizaron en 108 casos de CPCE distribuidos en tres TMA.

Las secciones histológicas de los TMA se deshidrataron durante la noche a 60°C y se desparafinaron en Xileno, seguido de 13 minutos a 80°C en solución de pretratamiento de la casa comercial Vysis (Vysis; Downers Grove, IL, USA). Las preparaciones fueron lavadas con agua desionizada e inmediatamente tratadas con proteasa (250mg pepsina + 62.5mL 0.2N HCl, pH 1.0) durante 13 minutos a 37°C.

Empleamos un conjunto de 12 sondas diferentes (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA), específicas para cada una de las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas en el CPCE. Estas sondas fueron utilizadas sistemáticamente usadas con dos fluorocromos de espectro naranja (Spectrum Orange (SO)) y verde (Spectrum Green (SG)). El panel de sondas utilizado se muestra en la **figura 14**:

- Para el cromosoma 5: LSI D5S721 (5p15.2) (SG)/EGR1 (5q31) (SO)
- Para el cromosoma 7: LSI D7S486 (7q31) (SO), LSI EGFR (SO)/CEP 7 (SG)
- Para el cromosoma 8: CEP 8 (SG)/MYC (8q24) (SO).
- Para el cromosoma 9: CEP 9 (SG)/CDKN2A (9p21) (SO).
- Para el cromosoma 13: LSI RB1 13q14 (SO)/LSI 13q34 LAMP1 (SG)
- Para el cromosoma 22: LSI EWRS1 22q11.2 (SG)

Una vez añadida la sonda, sellamos cada portaobjetos con cubreobjetos 24 x 50 mm. Posteriormente, las preparaciones fueron desnaturalizadas a 75°C durante 5 minutos e hibridados a 37°C durante toda la noche en termociclador Hybrite (Vysis). Los portaobjetos se dejaron secar al aire en la oscuridad antes de contrateñirse con 20 µL de DAPI (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.). Además, para conservar la fluorescencia se añadió Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE. UU.). El análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia BX60 (Olympus, Hamburgo, Alemania) equipado con un objetivo de 100x con aceite de inmersión. Para caracterizar y cuantificar el número de señales de hibridación se realizó un conteo de al menos 200 células tumorales por muestra (**Figura 13**).



Figura 13. Microscopio de fluorescencia modelo BX60F (Olympus, Hamburgo, Alemania) equipado con Cubo de filtros de fluorescencia: Torreta mecánica de 4 posiciones U-URBC dotado con filtro azul DAPI y tres rangos de frecuencia de color: (1) CFP (Azul) - EX: 435 DM: 455 EM: 490 (2) FITC (Verde) - EX: 480/40 DM:505 EM: 535/5 (3) TexasRed (Rojo) - EX: 560/55 DM: 595 EM: 645/5. Un objetivo de 100 (para uso con aceite de inmersión). Fuente de luz de fluorescencia con lámpara halógena U-LH100 12V 100W, con fuente de alimentación incorporada. Lámpara de mercurio de 100 W con fuente de alimentación BH2-RFL-T3. Cámara Olympus EP50, 5 Mpx, 1/1.8 pulgadas, CMOS Cámara a color, USB 2.0, interfaz HDMI.

La amplificación del gen *EGFR* se definió cuando la relación de señales de hibridación *EGFR/CEP7* es ≥ 2 , de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Vysis; Downers Grove, IL, EE. UU.). Además, incluimos el término “altos niveles” de amplificación cuando se encontraron señales de hibridación *EGFR* en forma de grupos (*clusters*). Para cada muestra, fue posible cuantificar al menos 200 núcleos tumorales. Simultáneamente, dos patólogos experimentados interpretaron los resultados no encontrando diferencias respecto a la interpretación entre ellos.

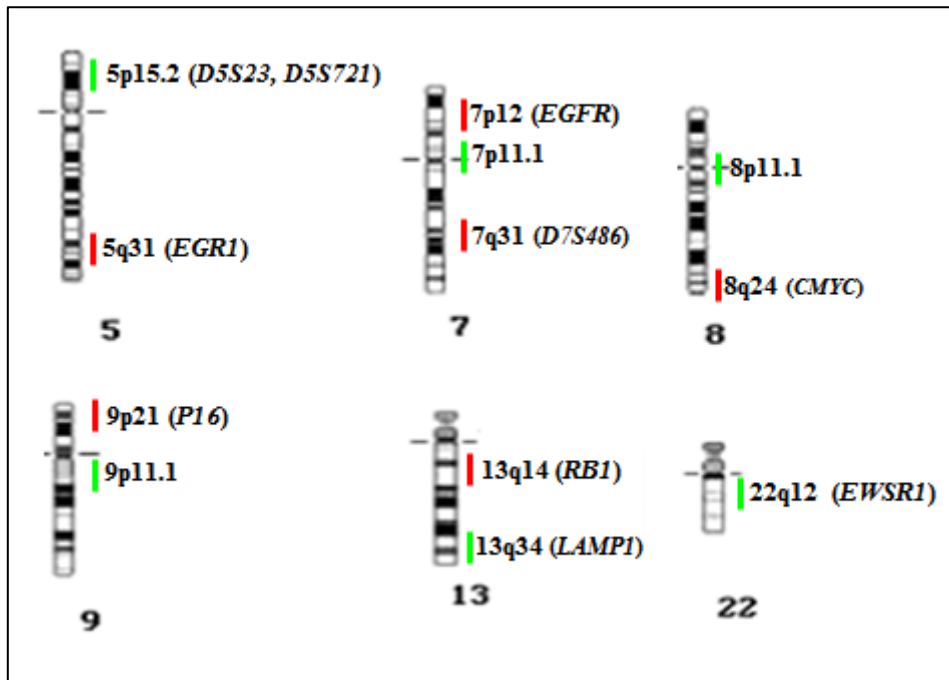


Figura 14: distribución cromosómica de las sondas de FISH empleadas en el presente estudio, dirigidas a 12 regiones específicas de 6 cromosomas diferentes. Las líneas verticales verdes y rojas corresponden a los fluorocromos usados. Todas las sondas fueron adquiridas en la casa comercial Vysis Inc. (Chicago, IL, USA).

3.5 Estudio del perfil de expresión génica.

3.5.1 Extracción de ARN.

Las muestras de trabajo fijadas en formol e incluidas en parafina (FFPE) tanto las de tejidos tumorales como las muestras de tejido normal fueron desparafinadas mediante tres lavados en Histoclear II; cada lavado se realizó durante 3 minutos a 50°C; posteriormente se centrifugaron durante dos minutos a máxima revolución, tras lo cual, el sobrenadante formado fue descartado. Se realizó un lavado posterior con etanol y centrifugación de nuevo a máxima velocidad durante otros dos minutos, para posteriormente eliminar el sobrenadante; el pellet generado se dejó secar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos.

A continuación, se añadió el buffer de digestión que contiene 20mg/ml de Proteasa K (Thermo Fisher Scientific inc, Waltham, MA, USA) a cada una de las muestras y se

dejó lisando toda la noche a 55°C. Al día siguiente, se usó Easy-BLUETM (iNtRON) para disociar los complejos de nucleoproteínas y posteriormente, se adicionó cloroformo. Tras este paso, las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 15 segundos y centrifugadas durante 15 minutos a 4°C y 12,000g. Tras esta centrifugación, la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo.

El total de ARN fue precipitado mediante alcohol isopropílico, paso tras el que se mantuvo a -20°C durante mínimo una hora para, posteriormente, centrifugar a velocidad máxima y 4°C durante 10 minutos. El pellet de ARN generado fue disuelto en 200µl de agua DEPC (Ambion) y precipitado de nuevo con una mezcla de etanol frío al 100%, acetato de sodio al 10% y 2µl de glicógeno 20mg/ml (Thermo Fisher Scientific), durante mínimo 3 horas a 20°C. A continuación, la muestra se sometió a una última centrifugación durante 10 minutos a 4°C y un posterior lavado con etanol al 70% en hielo. Finalmente, el pellet de ARN generado fue disuelto en 10µl de agua DEPC.

Tras la obtención de ARN, se utilizó la plataforma Nanodrop para verificar la calidad y cantidad del ARN extraído. El volumen total de ARN aislado fue tratado con DNAsaI Amplification Grade (Sigma) para, finalmente, proceder a la cuantificación del ARN libre de ADN usando el kit Quant-iT RNA Assay (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La evaluación de la calidad del ARN se basa en los valores obtenidos en la relación de absorbancias A260/280 y A260/230; mientras que el primero de las ratios es muy estable, la relación 260/230, indicador de la contaminación de la muestra por sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, es mucho más variable y depende de otros factores como la concentración de ADN en la muestra o la composición del tampón de resuspensión de la muestra. De forma general se considera que valores de absorbancias A260/280 entre 2.0-2.2 indicarían una pureza óptima de ARN, mientras que valores A260/280 > 1.7 se corresponden a una muestra de ARN con una pureza aceptable. Sin embargo, una ratio A260/280 < 1.7 sería indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos.

Al igual que en muestras de ADN la relación A260/230 en muestras de ARN se corresponde a un valor de 2 o ligeramente superior. Sin embargo, no existe una opinión consensuada sobre el valor mínimo en la relación A260/230 que una muestra debe tener

para ser considerada funcional. En general se considera que el ARN es aceptable si A260/230 es > 1.5.

Las muestras las tienen previamente extraídas, tras ser cuantificadas con Qubit se analizaron con TapeStation ya que es necesario el valor DV200 para ajustar la cantidad de RNA de partida a utilizar. Este valor hace referencia al % de RNA que tiene un tamaño superior a 200bp y que es susceptible de hibridación. Por lo tanto, este es el RNA realmente analizable y en función de eso debe ajustarse la cantidad de RNA de partida para que haya 150 ng de RNA con más de 200bp.

La **tabla 4** recoge los datos tanto de concentración de ARN como de los valores de calidad de éste en las diferentes muestras usadas en el presente estudio.

Tabla 4. Datos de concentración y calidad de los valores de ARN obtenidos en las muestras analizadas.					
Nº Caso	Código ID	ng/µl (Qbit)	260/280	260/230	Dv200
1	B//10611//15	272,00	1,99	1,77	24,93
2	B//13796//15	156,00	1,95	1,49	54,01
3	B//03523//16	290,00	1,95	1,86	36,56
4	B//21064//16	350,00	2,02	1,88	63,85
5	B//21248//16	141,00	1,96	1,51	24,73
6	B//05293//17	160,00	1,91	1,35	26,16
7	B//13308//18	122,00	1,91	1,25	31,05
8	B//14820//18	314,00	2,00	1,55	72,52
9	B//07017//19	192,00	1,96	1,42	18,26
10	B//20359//18	624,00	1,99	1,72	78,68

3.5.2 Análisis de expresión génica (GEP) mediante plataforma Nanostring: nCounter® Tumor Signaling 360 Panel.

El análisis de expresión génica (GEP) realizado posteriormente a la obtención del material genético, se basó en un panel que cubre cientos de genes implicados en la tumorigénesis, la metástasis e inflamación, concretamente el panel nCounter Tumor Signaling 360 con capacidad para analizar un total de 760 genes involucrados en más de 40 vías de señalización de la biología del tumor, evasión inmune y remodelación del microambiente, tal como se muestra en la **figura 15**. Los tres genes control para normalizar el análisis de expresión de cada uno de los genes de interés fueron *GAPDH*, *ACTB* y *TUBB*.

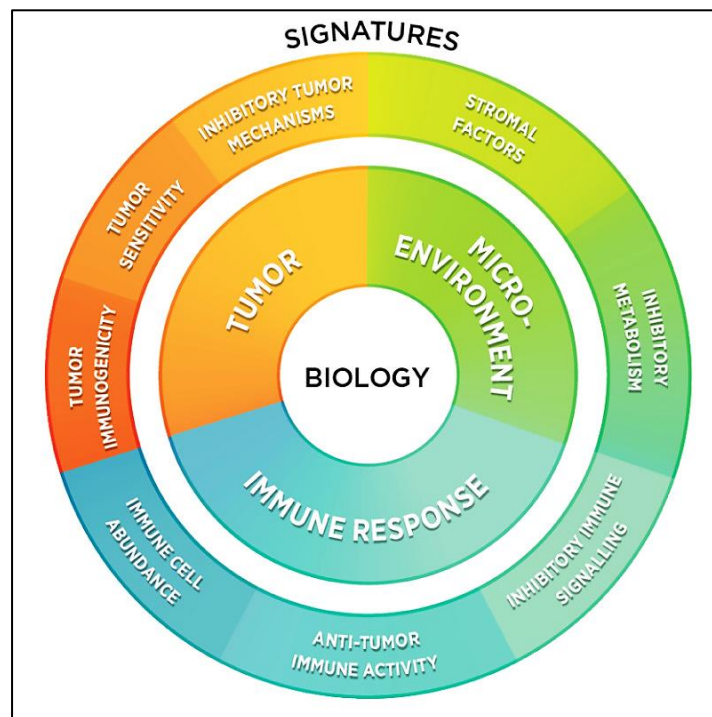


Figura 15: PanCancer IO 360™ está diseñado específicamente para investigadores de inmunooncología y traslacionales que estudian el impacto de la evasión inmunitaria en el microambiente tumoral y desarrollan firmas potencialmente pronósticas, predictivas o de mecanismo de acción para la inmunoterapia.

Para llevar a cabo los experimentos de GEP (*Gene Expression Profile*) se usó la plataforma Nanostring que consta de dos instrumentos independientes (**figura 16**):

- **nCounter® Prep Station:** se trata del primer componente del sistema Nanostring en el que se procesan las muestras tras el proceso de hibridación de forma totalmente automatizada y cuyo objetivo es el prepararlas para la recogida de datos posterior en el nCounter Digital Analyzer.

- **nCounter® Digital Analyzer:** será el encargado de recoger los datos de emisión de fluorescencia emitidos por las sondas de marcaje en cada uno de los cartuchos, a través de una lente de microscopio. Las imágenes obtenidas son procesadas internamente y los resultados se exportan como un archivo de formato de valores separados por comas.



Figura 16. Sistema Nanostring: nCounter Prep Station (izquierda) y nCounter Digital Analyzer (derecha).

El material de partida para los ensayos es el ARN aislado previamente, ajustado en todos los casos a una concentración final de 60ng/μl. Realizadas las diluciones necesarias para obtener este valor, se preparó la reacción de hibridación en la que el ARN se unirá a la sonda de captura y a la sonda de marcaje mediante incubación a 65°C durante unas 18 horas. Finalizada la primera etapa de hibridación, las muestras eran procesadas en el primero de los instrumentos, nCounter® Prep Station, donde se eliminaban los residuos de sonda no unidos y se inmovilizaban las secuencias marcadas en el cartucho correspondiente. Una vez preparado el cartucho era inmediatamente introducido en el nCounter® Digital Analyzer para proceder a la lectura del etiquetado fluorescente unido

a cada uno de los genes de interés. Estas imágenes de fluorescencia se procesaban internamente en el aparato para, finalmente, generar un archivo RCC con los resultados de lectura obtenidos. Estos datos hacen referencia a los niveles de expresión para cada uno de los genes de interés.

3.5.3 Análisis de datos.

Los datos obtenidos a partir del nCounter® Digital Analyzer, se preprocesaron y se comprobó su calidad utilizando el lenguaje de programación R y paquetes asociados a tal efecto. Los recuentos de expresión obtenidos fueron normalizados basándose en la expresión de los genes control *TUBB*, *ACTB* y *GAPDH* y fueron transformados en logaritmo en base 2. Posteriormente se realizaron análisis no supervisados como escalas multidimensionales no supervisadas (MDS) y dendrogramas, mediante el software estadístico SIMFIT (versión 7.5.4). En relación con el análisis de expresión diferencial, se consideraron significativos aquellos genes que alcanzaron un valor p ajustado $<0,05$.

El análisis de sobrerepresentación de genes se realizó en el servidor WebGestalt (160), utilizando las fuentes KEGG y Reactome para el análisis de vías y el análisis de procesos biológicos y funciones moleculares de Gene Ontology, como fuente para el análisis de funciones génicas.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para evaluar la calidad de los datos estadísticos para las diferenciaciones de los grupos, utilizamos las pruebas o test de t de Student y U de Mann-Whitney. El primero se usó para las variables continuas de distribución normal y el segundo se utilizó para las variables continuas de distribución anormal. Para el cálculo de las variables continuas se usó el paquete informático SPSS v.22 (IBM Corp., Armonk, NY, EE. UU.) así como para calcular las medidas de tendencia central como la media y la desviación estándar (DE). Las frecuencias y los porcentajes se indicaron como nuestras variables dicotómicas utilizando la prueba X^2 de Pearson. La significación estadística de las diferencias entre las curvas de supervivencia se determinó con la prueba de Mantel-Cox (log-rank test), mientras que las curvas de supervivencia global (SG) se modelaron según el método de

Kaplan-Meier. El análisis multivariante de los factores pronósticos para la SG se identificó mediante análisis de regresión de Cox (Multivariate Cox regression análisis), considerando solo aquellas variables que muestran una asociación significativa con la SG en el análisis univariado los valores de $p < 0,05$ (o, si corresponde, p corregido de Pearson) se consideraron estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Alteraciones cromosómicas en el carcinoma pulmonar de células escamosas.

Todos los pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE), incluidos en este estudio presentaban anomalías numéricas y/o estructurales en al menos una de las 12 regiones cromosómicas analizadas (**figura 17**). En general, las pérdidas cromosómicas fueron más frecuentes (61%) que las ganancias (19%) con relación al conjunto de anomalías cromosómicas detectadas. Sin embargo, cuando analizamos los cromosomas de manera individual, encontramos que 9p21 y 7q31 resultaron ser las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas (90% y 96%, respectivamente). Además, identificamos altos niveles de amplificación (>100 copias) en las siguientes regiones cromosómicas: 5p15.2, 7p12, 8q24 y 22q11, algunas en las cuales se albergan genes que están potencialmente involucrados en la patogénesis y progresión del CPCE. Entre otros se encuentra el gen *EGFR* a nivel del cromosoma 7p12 y el gen *CMYC*, a nivel del cromosoma 8q24. La región cromosómica amplificada más habitual (10/48; 21%), correspondió a la región localizada en el cromosoma 5p15.2, donde se encuentran los loci *D5S23* y *D5S721*. Por el contrario, la pérdida cromosómica más prominente se detectó a nivel del gen *CDKN2A*, localizado en 9p21, como se muestra en la **Figura 17**. Cabe destacar, que fue habitual encontrar esta pérdida genética de forma bi-alélica, quedando inactivados los genes ubicados en esta región.

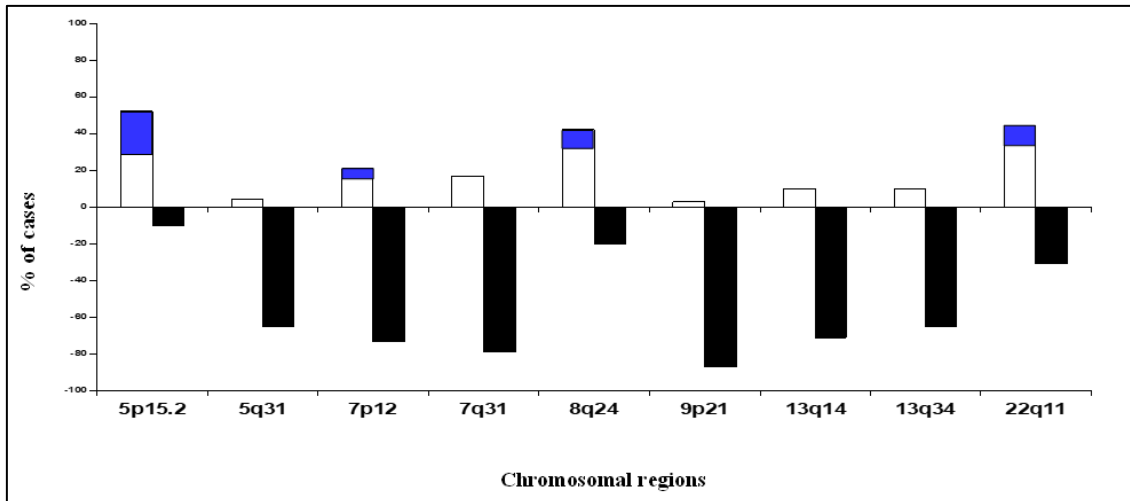


Figura 17: Anomalías cromosómicas detectadas en pacientes con CPCE por técnicas FISH. Esta gráfica ilustra de forma resumida, la frecuencia y el número de copias, ganancias (trazadas en blanco por encima de los valores cero en el eje X) y pérdidas (trazadas en negro por debajo de los valores cero en el eje X) identificadas en pacientes con CPCE. El color azul indica la acumulada frecuencia de la amplificación de la región cromosómica analizada, pudiendo discriminar la polisomías de la amplificación del gen.

4.2 Efectos pronósticos de las alteraciones cromosómicas y otras características de la enfermedad en pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas.

Desde el punto de vista pronóstico, se encontró una asociación significativa entre las características clínicas y biológicas de la enfermedad con la supervivencia global (SG) de los pacientes con CPCE, entre ellas cabe destacar, i) los estadios patológicos avanzados (pT3-pT4; $p = 0.001$), ii) márgenes quirúrgicos de resección positivos (R1; $p = 0.003$), recurrencia local ($p = 0.05$) y, iii) la presencia de metástasis (M1; $p = 0.05$). Por el contrario, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la SG de los pacientes con la edad, el género, el estado de los ganglios linfáticos, la invasión tumoral de la pleura visceral y el estadio según la AJCC (**Tabla 5**). Desde el punto de vista genético, la única región cromosómica asociada con un resultado significativamente adverso (**Tabla 6**) fueron las ganancias/amplificaciones de 7p12 ($p = 0.02$). Además, aunque no alcanzó la significación, las ganancias de 22q11 se detectaron frecuentemente en pacientes con pronóstico adverso ($p = 0.09$).

Tabla 5. Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas en la supervivencia global (SG) en 48 pacientes con carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE)

Variables	Nº de casos (%)	Media de SG, (meses)	P
Sexo			
Hombre	47 (98)	42	NS
Mujer	1 (2)	18	
Edad			
< 65	16 (33)	26	NS
≥ 65	32 (67)	42	
T- estadio del tumor primario			
pT1-T2	36 (75)	59	.001
pT3-T4	12 (25)	22	
Ganglios linfáticos			
pN0	35 (73)	42	NS
pN1	8 (17)	25	
pN2	5 (10)	39	
pN3	0 (0)	0	
Invasión pleural			
PL0	39	42	NS
PL1	6	23	
PL2	3	15	
Estadio según AJCC			
I	24	50	NS
II	14	26	
III	9	22	
IV	1	39	
Tipo de cirugía			
R0	45	48	.003
R1	3	10	
Recurrencia Local			
No	19	67	.05
Si	29	36	
Metástasis			
No	26	52	.05
Si	22	39	

Tabla 5. AJCC: American Joint Committee on Cancer (basado en la 8ª ed de la AJCC); NS: estadísticamente no significativo ($P > .05$); pT1: tumor ≤ 3 cm de diámetro máximo, rodeado por ejido pulmonar o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal al bronquio lobar (ej. no en el bronquio principal); pT2: tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm; pT3: tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm de diámetro máximo; o que invade directamente alguno de los siguientes: pleura parietal (PL3), pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal; o nódulo(s) tumoral(e)s separado(s) en el mismo lóbulo que el primario; pT4: tumor > 7 cm de diámetro mayor; o tumor de cualquier tamaño invadiendo uno o más de los siguientes: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral o Carina; o nódulo(s) tumoral(les) separado(s) en un lóbulo diferente, ipsilateral al del tumor primario; pN0: no metástasis en ganglios linfáticos regionales; pN1: metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales e intrapulmonares, incluyendo aquellos afectados por extensión directa; pN2: metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales; pN3:

metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales; PL0: tumor que no infiltra la capa elástica de la pleura visceral; PL1: invasión de la pleura visceral está presente cuando el tumor infiltra más allá de la capa elástica de la pleura visceral; PL2: extensión tumoral a la superficie de la pleura visceral; R0: ausencia microscópica de infiltración tumoral en los márgenes quirúrgicos; R1: presencia microscópica de infiltración tumoral en los márgenes quirúrgicos.

Tabla 6. Frecuencia de las distintas anomalías numéricas y estructurales identificadas para cada una de las regiones cromosómicas y cromosomas analizados en 48 pacientes con Carcinoma Pulmonar de Células Escamosas (CPCE) detectadas por FISH y su impacto en la supervivencia global (SG).

Regiones cromosómicas	Casos (%)	Media de SG (meses)	p
Cr. 5p15.2			
Pérdidas	7 (10)	81	NS
Normal	18 (38)	48	
Ganancias	23 (52)	42	
(Polisomías)	13 (56)	42	
Amplificación	10 (44)	42	
Cr. 5q31			
Pérdidas	31 (65)	31	NS
Normal	15 (31)	50	
Ganancias (polisomías)	2 (4)	36	
Cr. 7p12			
Pérdidas	35 (73)	24	.02
Normal	3 (6)	42	
Ganancias	10 (21)	36	
(Polisomías)	5 (50)	38	
Amplificación	5 (50)	32	
Cr. 7q31			
Pérdida	38 (79)	31	NS
Normal	2 (4)	49	
Ganancias (polisomías)	8 (17)	58	
Cr. 8q24			
Pérdida	10 (20)	25	NS
Normal	18 (38)	31	
Ganancias	20 (42)	42	
(Polisomías)	16 (80)	42	
Amplificación	4 (20)	42	
Cr. 9p21.1			
Pérdida	42 (87)	36	NS
Normal	5 (10)	36	
Ganancias (Polisomías)	1 (3)	42	
Cr. 13q14			
Pérdidas	34 (71)	49	NS
Normal	9 (19)	55	
Ganancias (Polisomías)	5 (10)	49	
Cr. 13q34			
Pérdidas	31 (65)	42	NS
Normal	12 (25)	55	
Ganancias (Polisomías)	5 (10)	49	
Cr. 22q11			
Pérdidas	15 (31)	74	.09
Normal	12 (25)	31	
Ganancias	21 (44)	26	
(Polisomías)	17 (80)	26	
Amplificación	4 (20)	14	

Tabla 6. NS:Estadísticamente no significativo ($P>.05$); SG: Supervivencia global.

Extendimos el estudio genético, en base a la única alteración cromosómica encontrada con influencia significativa en la supervivencia de la primera serie estudiada (*EGFR*, 7p12; n=48), a 108 pacientes con CPCE. En la **tabla 7** se muestran las características clínicas, histopatológicas y biológicas de la enfermedad de los 108 pacientes con CPCE de acuerdo con el número de copias del gen *EGFR* a nivel de célula individual (**Figura 18**). Como ilustra la **tabla 7**, los pacientes con amplificación de *EGFR* (n = 13; 12%), frecuentemente eran pacientes mayores (>65 años; $p = 0.07$), con tumores en estadio tumoral temprano (pT1-pT2; $p = 0.03$), localizados en el pulmón derecho (n = 10,77%; $p = 0.05$) con una SG extremadamente corta ($p \leq 0.01$).

La información relativa al hábito tabáquico estaba disponible únicamente en 49 pacientes de la serie global, de los cuales 46 (94%) estaban relacionados con el tabaquismo. Los 4 casos con amplificación de *EGFR* detectados en esta serie de pacientes se encontraron en el grupo de los fumadores activos.

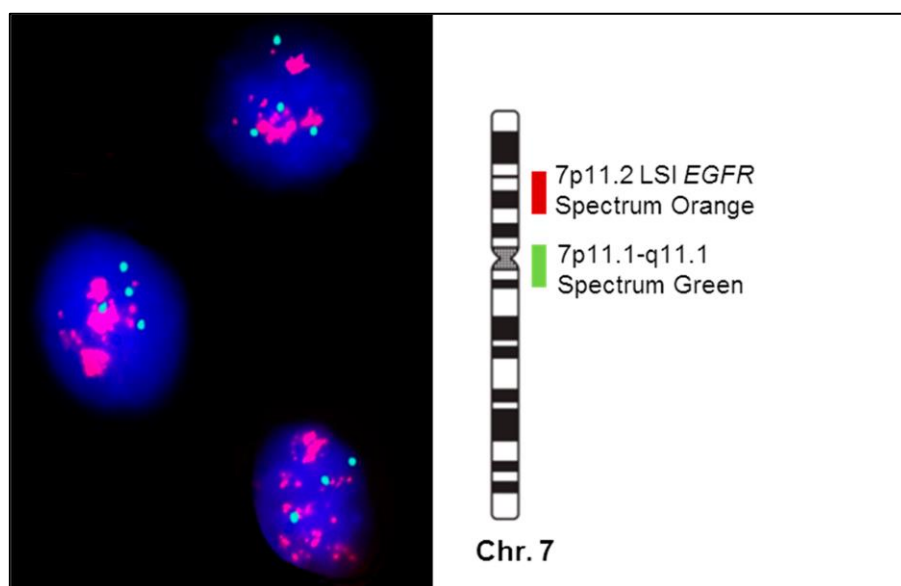


Figura 18: Núcleos en interfase con el gen *EGFR* amplificado detectado por técnicas FISH a partir de una biopsia de un paciente con CPCE. Las sondas empleadas para identificar el centrómero del cromosoma 7 está marcada verde (7p11) y el gen *EGFR* en rojo mostrando múltiples señales rojas individuales y formando grupos compactos de señales en forma de clusters (7p11.2).

Tabla 7. Características clínicas, histopatológicas y biológicas de la enfermedad en pacientes con Carcinoma Pulmonar de Células Escamosas (CPCE), de acuerdo con el número de copias del gen EGFR detectadas por técnica de FISH (n=108).

Características	No. Pacientes [n (%)] EGFR amplificado		P	Total de casos (n=108)
	Si (n=13)	No (n=95)		
Sexo				
Hombre	12 (92)	93 (97)	NS	105 (97)
Mujer	1 (8)	2 (3)		3 (3)
Edad (años)				
<65	2 (15)	35 (37)	.07	37 (34)
>65	11 (85)	60 (63)		71 (66)
Localización del tumor				
Lóbulo superior derecho	5 (38)	28 (30)	NS	33 (31)
Lóbulo medio	1 (8)	5 (5)		6 (5)
Lóbulo inferior derecho	4 (31)	15 (16)		19 (18)
Lóbulo superior izquierdo	2 (15)	20 (21)		22 (20)
Lóbulo inferior izquierdo	1 (8)	27 (28)		28 (26)
Lateralidad del tumor				
Derecho	10 (77)	48 (51)	.05	58(54)
Izquierdo	3 (33)	47 (49)		50(46)
T- estadio del tumor primario				
pT1-pT2	13 (100)	72 (76)	.03	85 (79)
pT3-pT4	0 (0)	23 (24)		23 (21)
Ganglios linfáticos				
pN0	10 (77)	66 (69)	NS	76 (70)
pN1	3 (23)	15 (16)		18 (17)
pN2	0 (0)	14 (15)		14 (13)
pN3	0 (0)	0(0)		0(0)
Invasión pleural				
pL0	12 (92)	74 (89)	NS	86 (80)
pL1	1 (8)	17 (18)		18 (17)
pL2	0 (0)	4 (4)		4 (3)
Estadio según AJCC				
I	7 (53)	45 (47)	NS	52 (48)
II	6 (47)	29 (30)		35 (32)
III	0 (0)	19 (20)		19 (18)
IV	0 (0)	2 (3)		2 (2)
Recurrencia local				
No	3 (33)	27 (35)	NS	30 (34)
Si	6 (76)	51 (65)		57 (66)
Metástasis				
No	3 (37)	39 (50)	NS	42 (49)
Si	5 (63)	39 (50)		44 (51)
Exitus				
No	2 (15)	14 (15)	NS	16 (15)
Si	11 (85)	78 (85)		89 (85)
SG (meses)	36 (1.2-82.6)	48 (32.7-63.6)	<.001	47 (26.3-58.2)

Tabla 7. AJCC: American Joint Committee on Cancer (basado en la 8ª ed de la AJCC); NS: estadísticamente no significativo ($P>.05$); pT1: tumor ≤ 3 cm de diámetro máximo, rodeado por

ejido pulmonar o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal al bronquio lobar (ej. no en el bronquio principal); pT2: tumor >3 cm pero \leq 5 cm; pT3: tumor >5 cm pero \leq 7 cm de diámetro máximo; o que invade directamente alguno de los siguientes: pleura parietal (PL3), pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), nervio frénico, pericardio parietal; o nódulo(s) tumorale(s) separado(s) en el mismo lóbulo que el primario; pT4: tumor >7 cm de diámetro mayor; o tumor de cualquier tamaño invadiendo uno o más de los siguientes: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral o Carina; o nódulo(s) tumoral(les) separado(s) en un lóbulo diferente, ipsilateral al del tumor primario; pN0: no metástasis en ganglios linfáticos regionales; pN1: metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales e intrapulmonares, incluyendo aquellos afectados por extensión directa; pN2: metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales; pN3: metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos o supraclaviculares ipsilaterales o contralaterales; PL0: tumor que no infiltra la capa elástica de la pleura visceral; PL1: invasión de la pleural visceral está presente cuando el tumor infiltra más allá de la capa elástica de la pleura visceral; PL2: extensión tumoral a la superficie de la pleura visceral.

De todas las características, clínicas, biológicas e histopatológicas de la enfermedad evaluadas en el momento del diagnóstico, mostraron una influencia adversa significativa en la SG en el análisis univariante las siguientes variables: edad >65 años ($p = 0.02$), afectación de ganglios linfáticos ($p = 0.005$), presencia de metástasis ($p = 0.01$) e invasión tumoral de la pleura visceral ($p = 0.04$) (**Figura 19**).

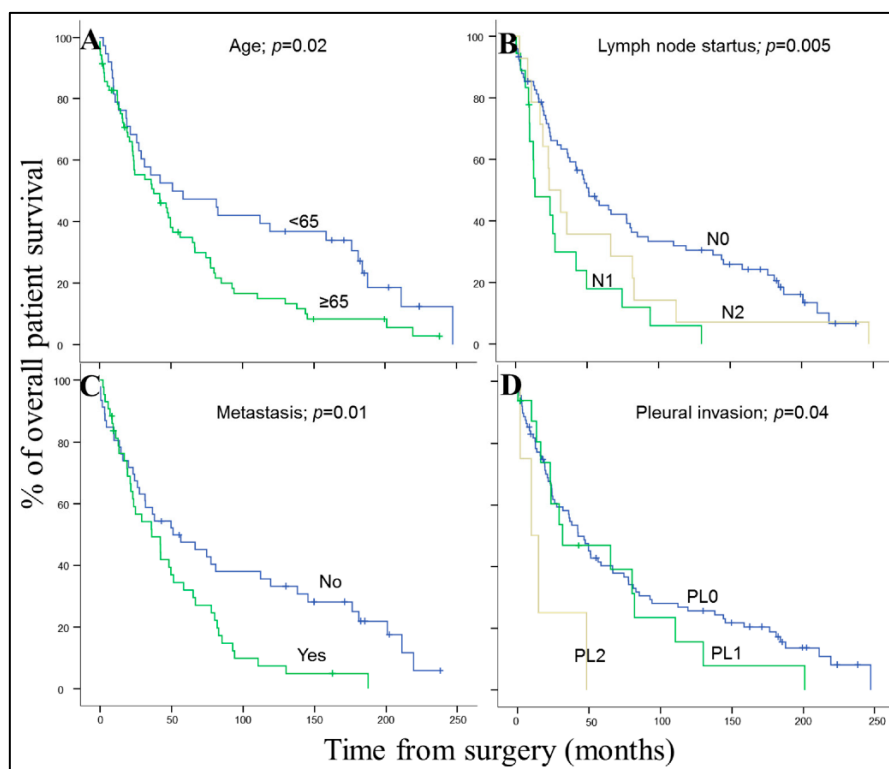


Figura 19. Características clínicas, histopatológicas y biológicas de los pacientes con CPCE, con impacto significativo en la supervivencia global en el análisis univariante: (A) edad, (B) estadio de los ganglios linfáticos, (C) presencia de metástasis a distancia y (D) invasión pleural. La información relativa a la supervivencia solo estaba disponible en 103 casos.

Desde el punto de vista genético, la amplificación del gen *EFGR* es la única anomalía genética detectada con impacto adverso en la SG en la serie global ($p = 0.02$) y exclusivamente en estadios tempranos (pT1-pT2; $p = 0.01$) (**Figura 20**).

El análisis multivariante de los factores pronósticos para la SG mostró que la combinación más relevante de variables independientes a la hora de predecir un comportamiento adverso fue la presencia de invasión tumoral de la pleura visceral y/o la amplificación del gen *EGFR* ($p < 0.001$).

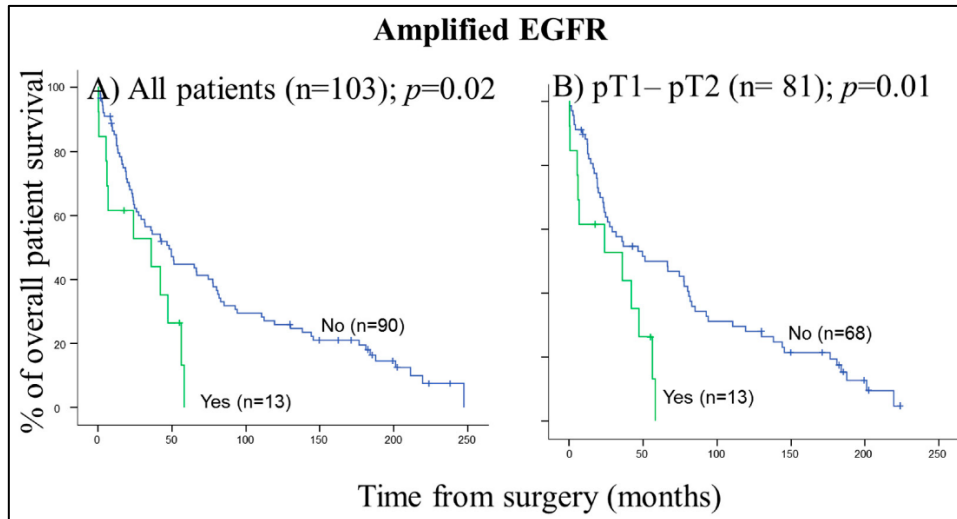


Figura 20. Amplificación de *EGFR* detectada en tumores primarios de pacientes con CPCE por técnicas de FISH, la cual muestra un impacto significativo en la supervivencia global en el análisis univariante: (A) todos los pacientes, (B) solo los pacientes diagnosticados en estadios tempranos: pT1-pT2. La información relativa a la supervivencia solo estaba disponible en 103 casos.

Basados en estas dos variables, desarrollamos un sistema de puntuación (score) con la intención de estratificar a los pacientes en tres grupos: i) riesgo bajo (ausencia de características adversas: score 0; n = 69), ii) riesgo intermedio (una característica adversa: score 1; n = 29) y, iii) alto riesgo (dos características adversas: score 2; n = 5). Estos tres grupos mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.001$) con unas tasas de SG a los 50 meses de 32%, 28% y 0%, respectivamente (**Figura 21**).

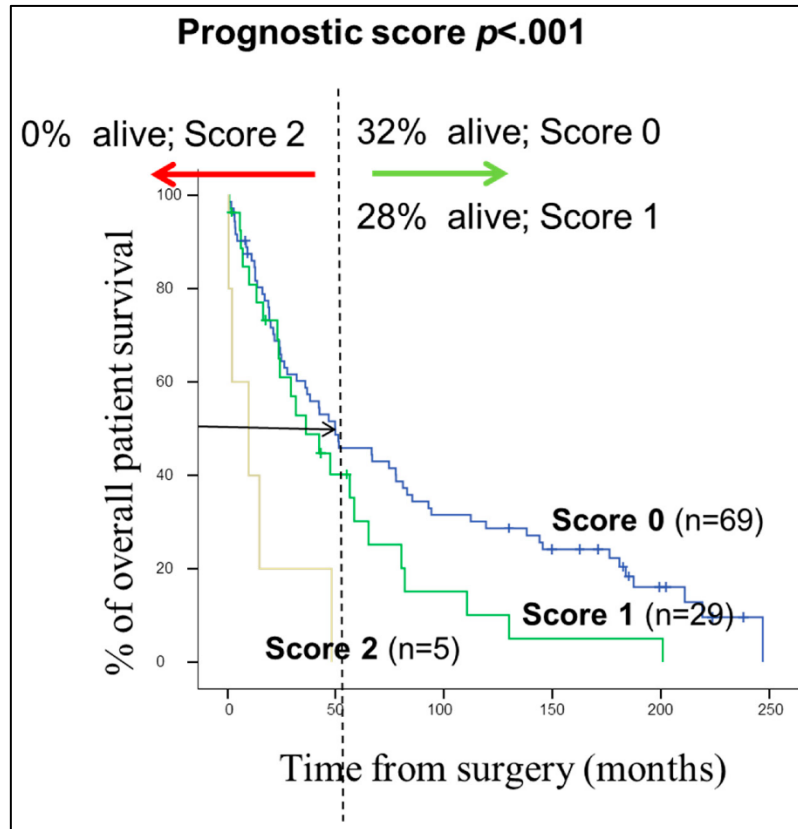


Figura 21. Propuesta de un score pronóstico para los pacientes con CPCE, basado en los dos factores pronósticos más relevantes encontrados en nuestro estudio: invasión pleural y estado del gen *EGFR*; $p < 0.001$. La información relativa a la supervivencia solo estaba disponible en 103 casos.

4.3 Relación entre la expresión proteica del gen *EGFR* y la variación en el número de copias.

Con el fin de identificar si las ganancias a nivel del gen *EGFR* conllevan a una ganancia de función o al menos se traduce en mayor cantidad de proteína, estudiamos a través de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) la expresión de EGFR en la serie global de pacientes. En este sentido, encontramos una asociación significativa entre la positividad para la expresión y las ganancias en el número de copias del gen ($p < 0.001$).

En 53 casos (49%), el estudio inmunohistoquímico para EGFR reveló tinción de membrana. De estos 53 casos, 41 (78%) mostraron diferentes intensidades de tinción que iban desde una tinción muy débil y focal por lo que fue considerada como negativa, otros casos mostraron tinción débil (+) y otro grupo de casos mostraron tinción moderada (++)

Estos 41 casos presentaron un número normal de copias de *EGFR* (69%) o bien una alta proporción de polisomías (31%) en el análisis de FISH, lo que podría explicar en parte esa expresión proteica débil (+) a moderada (++) en el estudio inmunohistoquímico, mientras que todos aquellos tumores con sobreexpresión proteica (+++) por IHQ (n=12; 22%) mostraron amplificación de *EGFR* por FISH (100%; **Figura 22**). Como dato curioso, sólo un caso que mostraba amplificación de *EGFR* en el análisis por FISH resultó negativo por IHQ. A diferencia de las alteraciones de *EGFR* a nivel del ADN (amplificación), la positividad IHQ para EGFR no mostró tener una influencia significativa en el pronóstico de la enfermedad ($p = 0.125$).

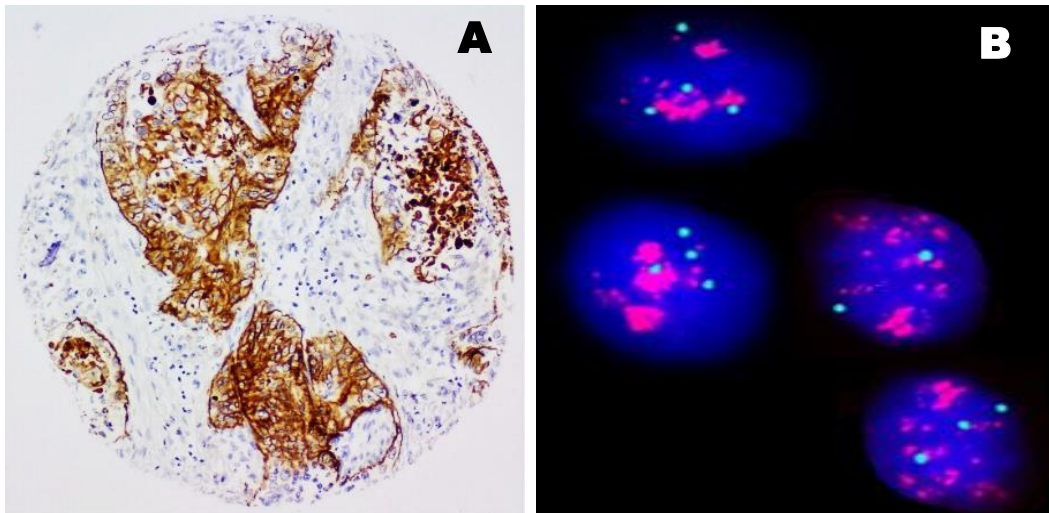


Figura 22. Imagen de una biopsia de un paciente con CPCE. Se observa positividad para EGFR (+++) por IHQ (Panel A) y amplificación del gen *EGFR* detectada por FISH (Panel B).

4.4 Perfil de expresión génica del tejido tumoral de pacientes con cáncer de pulmón tras inmunoterapia.

De los 10 pacientes analizados, 9 eran varones y 1 mujer, con una media de edad de 67 años. Cuatro casos (40%) fueron diagnosticados de CPCE, los otros seis casos (60%) correspondían al tipo histológico ADC. El rango de expresión de PD-L1 en porcentaje, analizado por inmunohistoquímica, iba desde 0% a 80%. En cuanto a la valoración de la respuesta a la inmunoterapia con Nivolumab, 6 de los 10 pacientes

mostraron progresión (PG), 1 paciente evolucionó con enfermedad estable (EE) y 3 pacientes presentaron una respuesta completa de la enfermedad (RC). De estos 3 pacientes que alcanzaron respuesta completa, 2 fueron diagnosticados de CPCE y 1 de ADC. Como dato interesante, el paciente ID4 (con tumor de tipo histológico CPCE), cuya muestra tumoral no mostraba ninguna expresión de PD-L1 (0%), resultó ser uno de los 3 pacientes con respuesta completa (RC) alcanzando una supervivencia global (SG) de 65 meses. La media de SG de los tres pacientes que presentaron RC fue de 73,66 meses; siendo considerablemente superior a la media de SG de los siete pacientes con progresión o estabilización de la enfermedad tras inmunoterapia con Nivolumab, que fue de 22,14 meses. En cuanto a los efectos no deseables del tratamiento con Nivolumab encontramos toxicidad en forma de Astenia en 2 pacientes y Artralgias en 1 paciente. Los 7 pacientes restantes no presentaron efectos secundarios a la toxicidad por el tratamiento. Las características clínico-patológicas de los pacientes con carcinoma de pulmón en estadio IV que recibieron inmunoterapia con Nivolumab se recogen en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Características clínico-biológicas y patológicas de 10 pacientes con carcinoma de pulmón en estadio IV tratados con Nivolumab. Los pacientes respondedores están identificados en color verde.

ID	Sexo	Edad (años)	% de expresión de PD-L1	Diagnóstico histológico	Respuesta a Nivolumab	SG	Toxicidad
1	H	74	1	ADC	PG	6	Asthenia
2	H	54	5	ADC	PG	37	No
3	H	67	30	CPCE	RC	82	No
4	H	68	0	CPCE	RC	65	Asthenia
5	H	73	40	ADC	RC	74	No
6	M	76	80	CPCE	PG	15	No
7	H	80	1	ADC	PG	25	Arthralgia
8	H	78	30	ADC	PG	20	No
9	H	45	50	ADC	PG	37	No
10	H	62	5	CPCE	EE	22	No

Tabla 8: ID: número de orden en el que se analizaron los casos, H: hombre, M, mujer, ADC: adenocarcinoma, CPCE: carcinoma pulmonar de células escamosas, PG: progresión, RC: respuesta completa (en color verde), EE: enfermedad estable, SG: supervivencia global (meses).

Para llevar a cabo este estudio, analizamos la expresión diferencial de un total de 760 genes involucrados en la respuesta a la terapia anti-PD-L1 utilizando la plataforma NanoString nCounter (Seattle, WA) en pacientes con CPCNP respondedores (n=3) vs. no-respondedores (n=7) tratados todos homogéneamente con nivolumab, como se muestra en la **figura 23**.

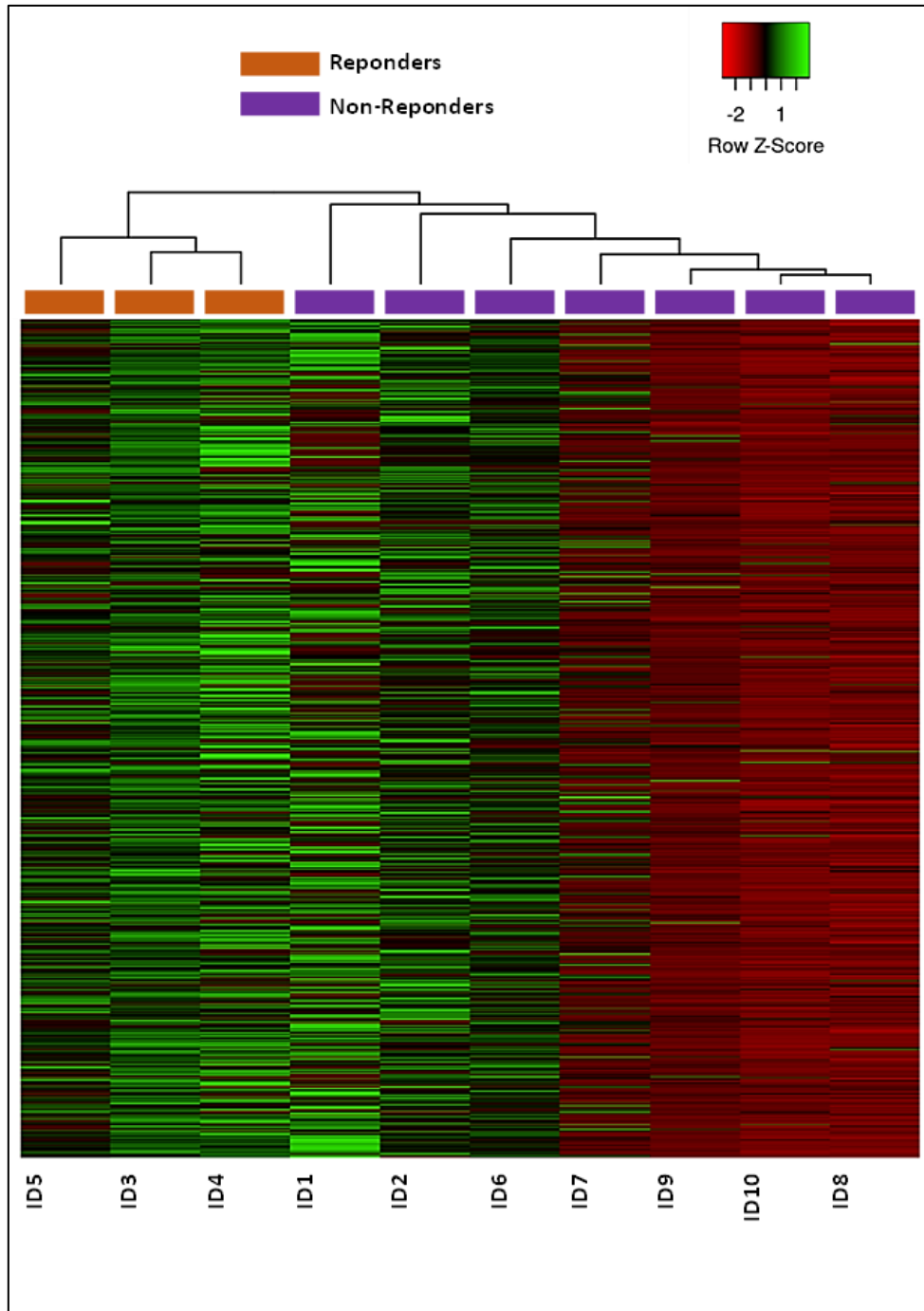


Figura 23: Perfil de expresión de 760 genes en pacientes con cáncer de pulmón avanzado asociado a la respuesta al tratamiento con nivolumab. En la primera fila están identificados, en color naranja (casos ID5, ID3 y ID4), los pacientes que mostraron respuesta a la inmunoterapia. En la misma fila, pero en color magenta, se identifican los casos que no mostraron respuesta a la inmunoterapia (ID1, ID2, ID6, ID7, ID9, ID10, ID8). Cada fila (horizontal) del Heatmap representa uno de los 760 genes que, en cada uno de los 10 casos (columnas verticales) puede estar sobreexpresado (en color verde del espectro) o infraexpresado (en color rojo del espectro).

En general, el perfil de expresión mostró que los pacientes respondedores contenían sistemáticamente los mismos transcritos desregulados que los observados en los no-respondedores. Sin embargo, se encontró que algunos transcritos estaban específicamente desregulados en los pacientes respondedores mientras que en los no-respondedores estos se expresaron en niveles normales, lo que refleja una mayor inestabilidad genómica los pacientes que consiguieron la remisión completa. Cabe destacar, que los pacientes respondedores mostraron niveles de expresión de *CXCL11*, *NT5E*, *KLRK1*, *CD3G*, *GZMA*, *IDO1*, *LCK*, *CXCL9*, *GPLY*, *ITGAL*, *HLA-DRB1*, *CXCR6*, *IFNG*, *CD8A*, *ITK*, *B2M*, *HLA-B* y *HLA-A* significativamente más altos que los no-respondedores ($p < .05$), como se muestra en la **tabla 9** y en la **figura 24**. Por el contrario, los genes *PNOG*, *CD19*, *TP73*, *ARG1*, *FCRL2* y *PTGER1* mostraron niveles de expresión significativamente más bajos que los no respondedores (**Tabla 9**).

Figura 24: Heatmap mostrando las diferencias de expresión de 24 genes entre pacientes respondedores y no-respondedores tratados con nivolumab.

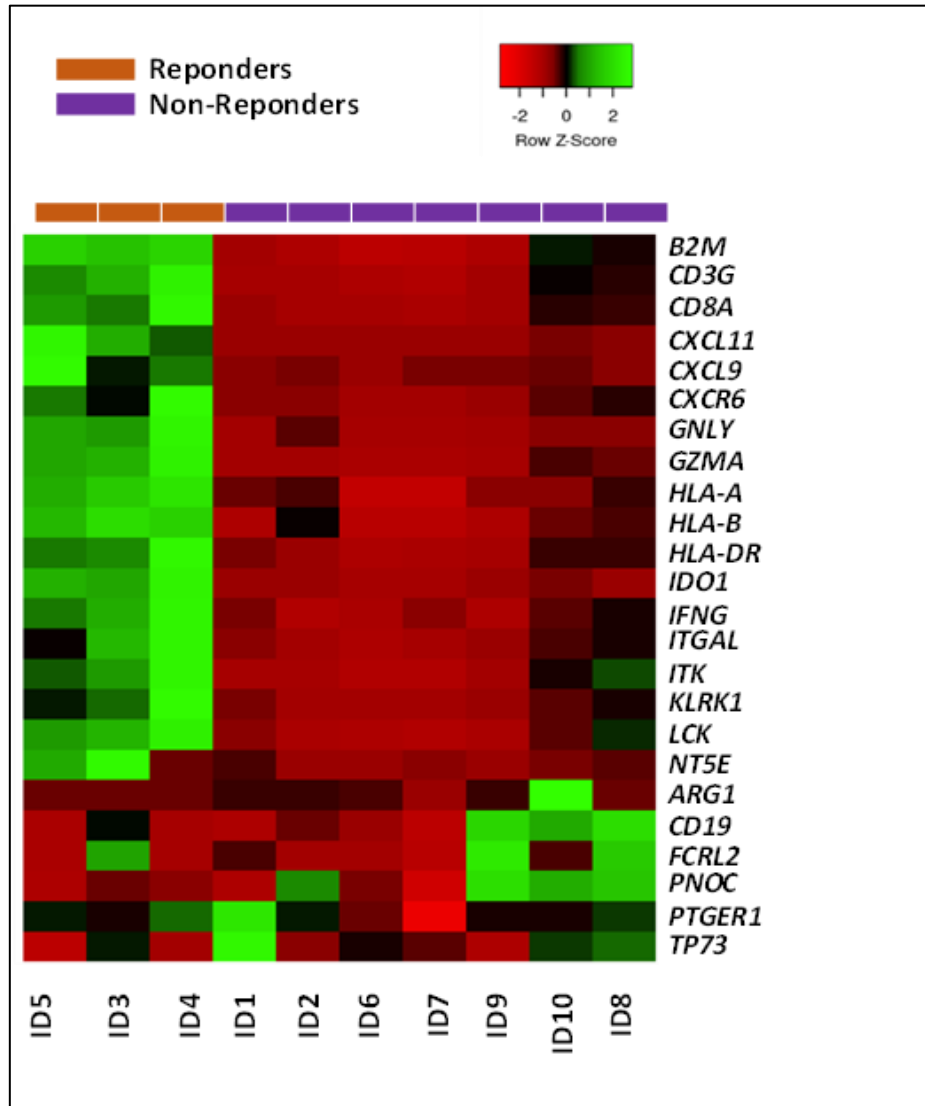


Figura 24. En la primera fila están identificados, en color naranja (casos ID5, ID3 y ID4), los pacientes que mostraron respuesta a la inmunoterapia. En la misma fila, pero en color magenta, se identifican los casos que no mostraron respuesta al tratamiento con inmunoterapia (ID1, ID2, ID6, ID7, ID9, ID10, ID8). Cada fila del Heatmap representa uno de los 24 genes que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes respondedores a la inmunoterapia con nivolumab y aquellos pacientes no respondedores. Cada columna del Heatmap corresponde a cada uno de los 10 casos analizados, mostrando diferentes niveles de expresión para cada gen. Las casillas en color verde del espectro indican sobreexpresión del gen, por el contrario, las casillas en color rojo del espectro indican infraexpresión del gen.

Tabla 9. Genes desregulados estadísticamente significativos en pacientes respondedores (n=3) vs, no-respondedores (n=7) tratados con nivolumab.

Gen	ID Gen [#]	Cambio de pliegue (Fold change) (vs. pacientes no respondedores)	Localización génica	P
<i>Transcritos sobreexpresados</i>				
<i>CXCL11</i>	NM_6373	5,2	4q21.1	0.007
<i>NT5E</i>	NM_4907	3,2	6q14.3	0.02
<i>KLRK1</i>	NM_22914	3,2	12p13.2	0.04
<i>CD3G</i>	NM_917	3,1	11q23.3	0.04
<i>GZMA</i>	NM_3001	2,9	5q11.2	0.01
<i>IDO1</i>	NM_3620	2,8	8p11.2	0.01
<i>LCK</i>	NM_3932	2,7	1p35.2	0.05
<i>CXCL9</i>	NM_4283	2,7	4q21.1	0,05
<i>GNLY</i>	NM_10578	2,6	2p11.2	0.03
<i>ITGAL</i>	NM_3628	2,5	16p11,2	0,05
<i>HLA-DRB1</i>	NM_3123	2	6p21.3	0,05
<i>CXCR6</i>	NM_10663	2,1	3p21.3	0.05
<i>IFNG</i>	NM_3458	2,1	12q15	0,05
<i>CD8A</i>	NM_925	2,1	2p11.2	0.05
<i>ITK</i>	NM_3702	1,9	5q33.3	0.05
<i>B2M</i>	NM_567	1,8	15q21-1	0.02
<i>HLA-B</i>	NM_3106	1,2	6p21.3	0.05
<i>HLA-A</i>	NM_3105	0,7	6p22.1	0.05
<i>Transcritos infraexpresados</i>				
<i>PNOG</i>	NM_5368	-4,5	8p21.1	0.01
<i>CD19</i>	NM_930	-4,3	16p11.2	0.04
<i>TP73</i>	NM_7161	-3,7	1p36.3	0.02
<i>ARG1</i>	NM_9439	-3,7	6q23.2	0.04
<i>FCRL2</i>	NM_79368	-3,6	1q23.1	0.03
<i>PTGER1</i>	NM_5731	-3,3	19p13.1	0.04

#Secuencia de referencia (RefSeq) del centro nacional de información biotecnológica (NCBI).

4.5 Caracterización funcional del perfil de expresión génica (GEP) en las muestras tumorales de los pacientes con cáncer de pulmón.

Tras el análisis de expresión de las muestras tumorales se llevó a cabo una búsqueda sobre las rutas de procesos biológicos que pudieran verse afectadas por la desregulación de los genes antes mencionados. Este estudio se realizó a partir de la fuente KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), en él se reveló la alteración de un total de 47 vías canónicas tal como se recoge en la **figura 25**. Entre las vías más

comúnmente alteradas en los tumores observamos un aumento de la expresión de genes implicados en la regulación de la respuesta inmune, activación de linfocitos T citotóxicos (CD8) y otras rutas asociadas a funciones inmunológicas como las vías de señalización de citoquinas e interleucinas (**figura 25**).

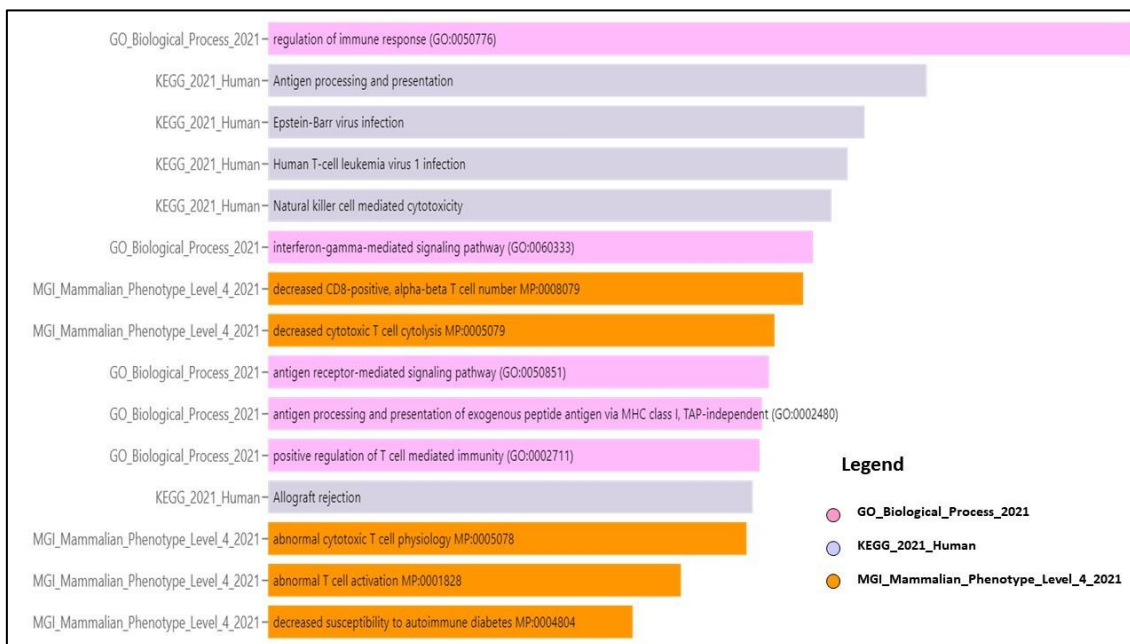


Figura 25: Vías canónicas más representativas implicadas en el cáncer de pulmón definidas por el análisis de expresión génica (GEP) de los transcritos desregulados de forma significativa.

Estos hallazgos fueron validados como biomarcadores predictivos en una serie de 254 pacientes con cáncer de pulmón avanzado tratados con nivolumab (161) (<https://www.rocplot.org/> n=254; 177 no-respondedores y 77 respondedores) mediante curvas ROC, mostrando los niveles de expresión de los genes ITK (AUC: 0.66), ITGAL (0.65), FCRL2 (0.63), NT5E (0.63), AGR1 (0.62), CD8A (0.61) y CD19 (0.60) como los mejores predictores de respuesta al nivolumab (0.57 a 0.66; $p < .001$), como se muestra en la **figura 26**.

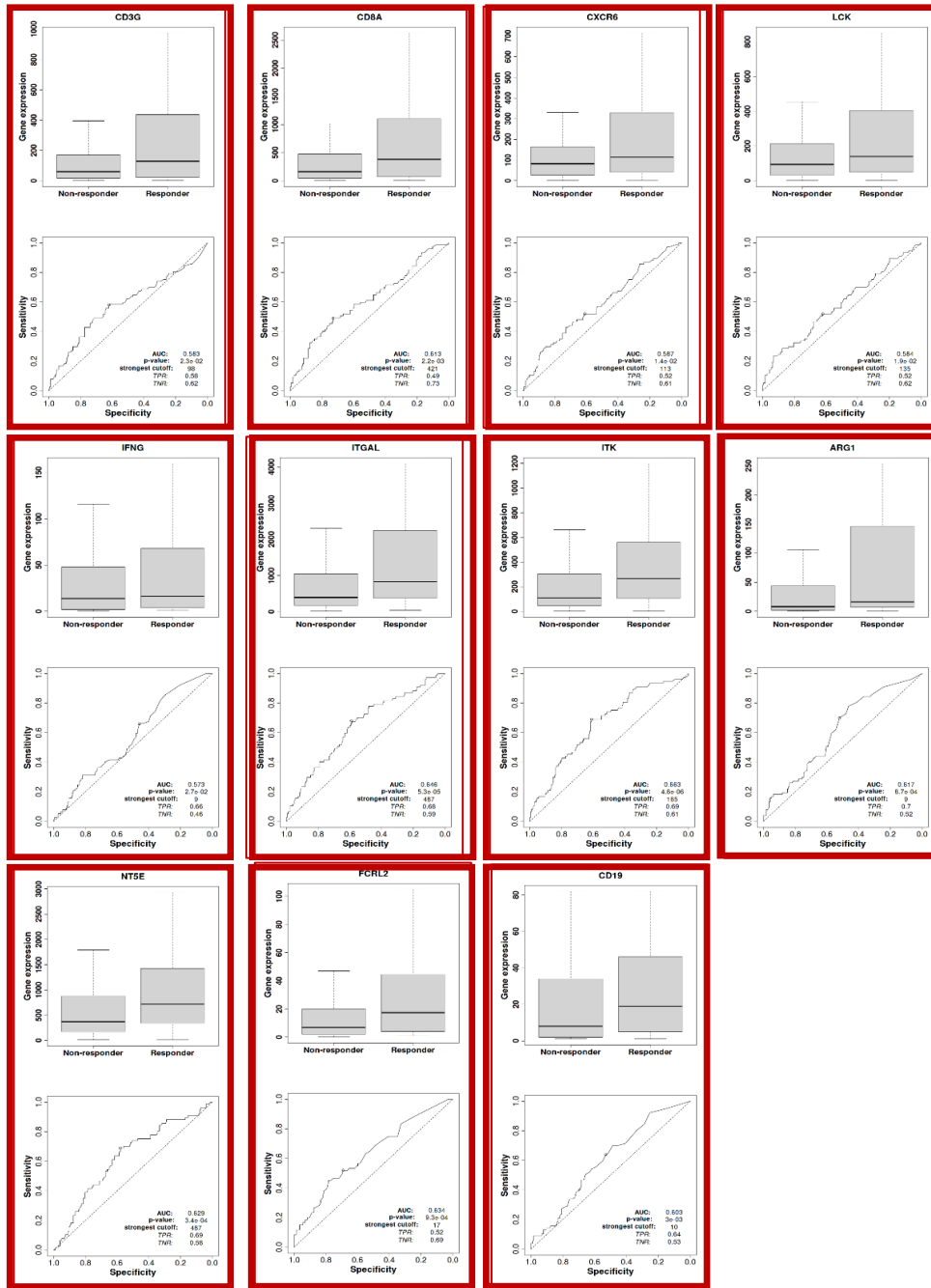


Figura 26. Curvas ROC obtenidas de las bases públicas <https://www.rocplot.org/> que contienen un total de 254 pacientes con cáncer de pulmón avanzado tratados con nivolumab (177 no-respondedores y 77 respondedores) previamente estudiada mediante técnicas de RNAseq.

Más aún, como se muestra en la **figura 27**, la expresión alterada de los genes *B2M*, *CD3G*, *CXCR6*, *NKG5*, *CTLA3*, *HLA-A*, *IFNG*, *ITGAL*, *ITK*, *LCK*, *CD73*, *HLA-DRB1* y *HLA-B*, mostraron un impacto pronóstico en la SG ($p < .001$) en una serie independiente de pacientes con CPCNP (162) en el análisis multivariante ($n = 2.166$ pacientes) en la base de datos pública: <https://kmpplot.com/analysis>.

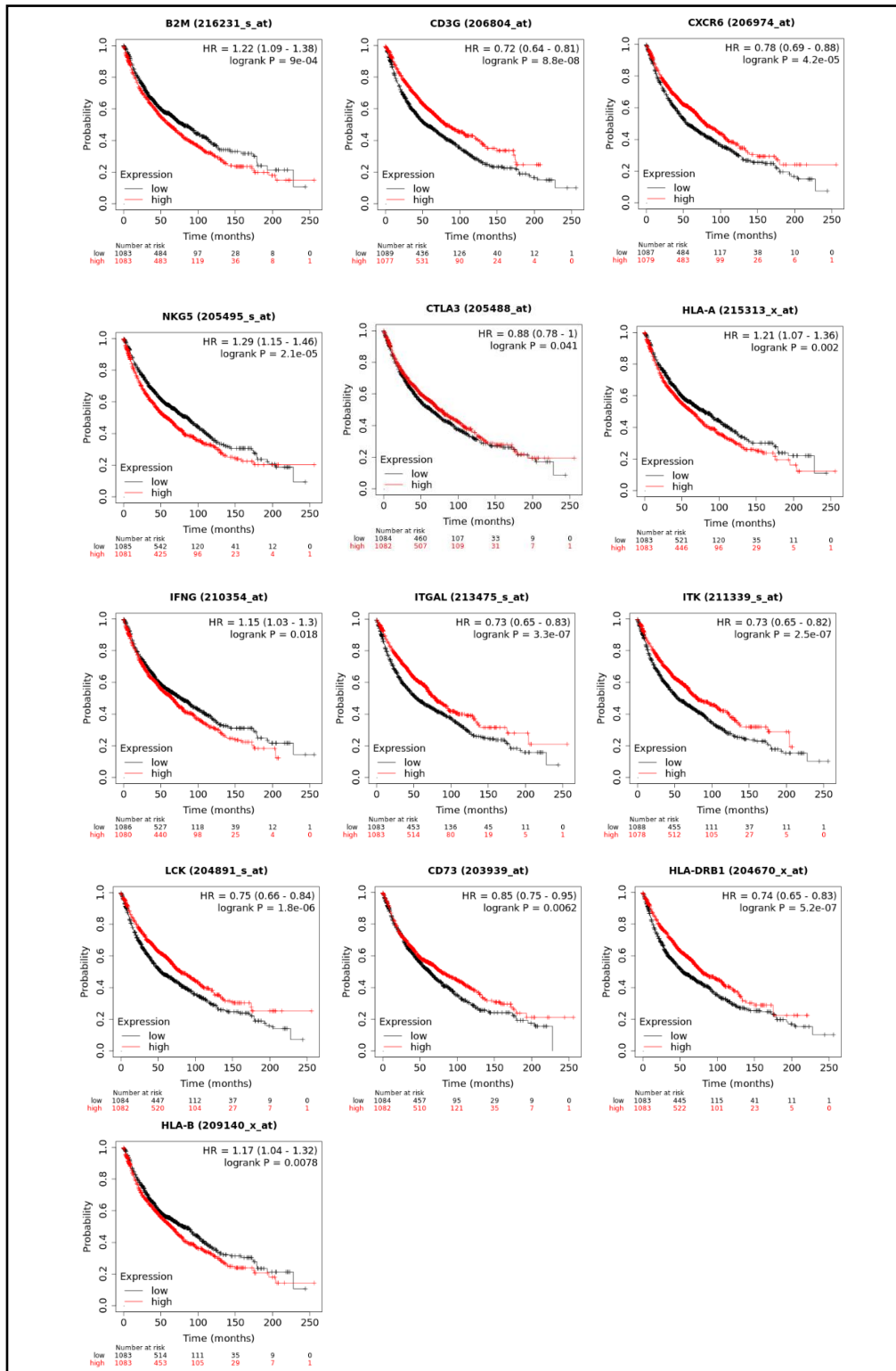


Figura 27: Análisis multivariante del impacto pronóstico del perfil de expresión de 2.166 pacientes con CPCNP, considerando los genes como variables continuas o dicotómicas para cada una de las supervivencias analizadas en la base de datos pública <https://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=lung>.

5. DISCUSIÓN

Las recientes investigaciones en el campo de la genética tumoral y el estudio de nuevos biomarcadores oncológicos ponen de manifiesto que el cáncer de pulmón es una neoplasia biológicamente muy heterogénea en cuanto a sus características moleculares, respuesta terapéutica y pronóstico de los pacientes, siendo el primer tipo de cáncer con una mayor tasa de mortalidad en occidente en ambos sexos (supervivencia a los 5 años de 33% en mujeres y 23% en varones), con tasas de supervivencia a 5 años de *65% en la enfermedad localizada; 37% en la enfermedad con afectación regional y 9% en la enfermedad con afectación a distancia*. La mayoría de las muertes son causadas por el diagnóstico tardío de la enfermedad (85% de los casos se realizan en estadios avanzados) o bien porque a menudo son refractarios a la terapia aplicada, hecho que subyace de las características genéticas del tumor.

Actualmente el sistema de estadiaje de neoplasias desarrollado por la *AJCC* (American Joint Committee on Cancer), es el estándar de clasificación y pronóstico más utilizado en los casos de cáncer de pulmón (CP). Este método se ha revisado en varias ocasiones a lo largo de los años con el objetivo de mejorar su rendimiento pronóstico y orientación terapéutica para los pacientes con CP. Sin embargo, y a pesar de este sistema clásico de estratificación de los pacientes, hay que tener en consideración que tumores histológicamente idénticos, del mismo estadio, pueden mostrar comportamientos clínicos completamente diferentes a lo largo del curso de la enfermedad, por lo que se hace necesario incluir nuevos biomarcadores que nos permitan identificar a los pacientes con un pronóstico adverso y un mayor riesgo de recaída y/o progresión. Sumado a este hecho, hay que tener en cuenta que la diseminación celular desde el tumor primario hasta la localización secundaria donde tiene lugar la metástasis, principal causa de mortalidad en este tipo de pacientes es un proceso complejo con múltiples pasos secuenciales y unidos

entre sí, en el que se activan genes que favorecen la supervivencia de una subpoblación de células metastásicas que ya existían en el tumor primario.

En la última década, se recopiló una gran cantidad de información sobre los factores pronósticos presentes en el CP. Gracias a estos avances, se han identificado algunos marcadores en el subtipo de adenocarcinoma (ADC) que deben ser estudiados en todos los pacientes en estadios avanzados debido a su gran capacidad para predecir la respuesta al tratamiento. En este sentido, la mutación en *KRAS* G12C, las mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y los reordenamientos del gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*), el gen de especies reactivas a oxígeno (*ROS*), el protooncogén *RET* receptor tyrosine kinase (*RET*) y el protooncogén *MET*, receptor tirosina quinasa (*MET*), son accionables a través de moléculas dirigidas a las alteraciones de estos genes inhibiendo su función. Sin embargo, para los tumores de histología escamosa, la inmunoterapia es ahora la nueva esperanza para algunos de estos pacientes. Las terapias dirigidas a bloquear la interacción entre PD-1 y PD-L1, como el nivolumab, han cambiado drásticamente el panorama del tratamiento para los tumores avanzados de histología escamosa. En la actualidad, el biomarcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia, el antígeno PD-L1, no proporciona una correlación precisa con la eficacia del tratamiento. Así, es habitual encontrarnos tumores con alta expresión de PD-L1 sin respuesta al tratamiento y, por el contrario, pacientes con tumores sin expresión del PD-L1 alcanzan respuestas completas tras tratamiento con nivolumab.

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo doctoral nos planteamos como objetivos iniciales determinar qué alteraciones cromosómicas y qué perfiles de expresión están presentes en los pacientes con CP avanzado que condicionan el pronóstico y el tratamiento de la enfermedad.

5.1 Valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas en el CPCE.

La presencia de anomalías genéticas en el diagnóstico de pacientes con CP constituye uno de los parámetros clínicos más relevantes a la hora de establecer el protocolo terapéutico más adecuado y predecir la evolución de la enfermedad en términos de supervivencia global (163). A pesar de los avances en el conocimiento que en la actualidad tenemos acerca de las alteraciones genéticas implicadas en el desarrollo y progresión en el grupo de ADC hoy por hoy sigue siendo muy limitada la información de la que disponemos acerca de las alteraciones genéticas involucradas en la histología escamosa, y dentro de ellas, de las que realmente determinan el tratamiento más adecuado en estos pacientes. Ante estos antecedentes, el primer objetivo de este trabajo doctoral se centró en determinar el valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas, de tipo numérico y estructural más frecuentemente detectadas en tumores de pulmón con histología escamosa, aplicando para ello la técnica de FISH a una larga serie de pacientes (n=108) diagnosticados de CPCE, con una media de seguimiento de 65 meses (mediana de 5,4 años).

Tras el análisis de 12 regiones específicas de 6 cromosomas diferentes mediante técnicas de FISH, observamos que todos los casos mostraban anomalías numéricas/estructurales en uno o más cromosomas, de acuerdo con lo descrito previamente en la literatura (164,165). Nuestros resultados muestran que la incidencia de pérdidas cromosómicas es mayor a la de las ganancias cromosómicas. Sin embargo, cabe destacar que los niveles más alto de amplificación genética se detectaron a nivel de las regiones 5p15.2, 7p12, 8q24 y 22q11. En este sentido, tenemos que destacar que varios de los genes potencialmente involucrados en la patogénesis del carcinoma de células escamosas pulmonar se localizan en estas cuatro regiones cromosómicas, incluyendo los genes *TERT* y *CLPTMIL* en la región cromosómica 5p15, el gen *EGFR* en la región cromosómica 7p12, el gen *MYC* en la región cromosómica 8q24 y los genes *CRKL*, *PRKMI* y *MAPK1* en la región cromosómica 22q11. Además, fue interesante observar que la amplificación de *EGFR* se encontró en forma de grupos de señales, formando *clusters*, exclusivamente en aquellos pacientes intervenidos en estadio temprano de su enfermedad (pT1-pT2), mientras que en pacientes con estadios avanzados (pT3-pT4) fueron más habituales las ganancias del cromosoma 7, en el contexto un cariotipo hiperdiploide en forma de polisomías de 7p12. De acuerdo con nuestros hallazgos

previamente descritos, *Guo, Y.* y colaboradores también observaron ganancias en 7p12 con una frecuencia significativamente mayor entre los pacientes con carcinoma de células escamosas de pulmón en estadios clínicos tempranos (II + IIIA vs. IIIB + IV) (166). En la misma línea, *Ondrej Fiala* y colaboradores, estudiaron 290 pacientes con CPCNP y reportaron que el 9% de los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad (IIIB o IV) mostraron amplificación de *EGFR* empleando el método de amplificación dependiente de ligando Multiplex (MLPA). Además, observaron que la amplificación de *EGFR* se encontró con mayor frecuencia en pacientes donde coexistía con la mutación de gen ($p < 0,001$). Sin embargo, en su estudio no se observó una correlación significativa entre la amplificación del gen *EGFR* y la supervivencia de los pacientes (167). Los mismos hallazgos encontrados en el presente estudio fueron similares a los encontrados por *Kang* y colaboradores, que encontraron la expresión de *EGFR* en todos los tipos histológicos de carcinoma pulmón, sin embargo, observaron que el tipo histológico de carcinoma de células escamosas mostraba mayores niveles de expresión que el tipo ADC y un alto número de copias del gen *EGFR* por célula. Además, identificaron que este perfil genómico se asocia a un pronóstico adverso en pacientes con CPCE (168). De acuerdo con estas y otras observaciones, distintos investigadores han encontrado previamente que la sobreexpresión de *EGFR* es habitual en el carcinoma no microcítico de pulmón y que se encuentra con mayor frecuencia en el carcinoma de células escamosas de pulmón (169). Estos resultados y nuestros hallazgos sugieren que los alto niveles de amplificación de *EGFR* dependen del tipo histológico del tumor, así como del estadio clínico de la enfermedad de aquellos pacientes que lo padecen.

En la literatura encontramos discrepancias a la hora de estudiar la incidencia de las alteraciones genéticas encontradas en el CPCE. Así, encontramos que el amplio rango entre las frecuencias de ganancias /amplificaciones del gen *EGFR* detectadas en los pacientes con CPCE, oscilando entre el 4% al 82% de los casos (169,170). Estas discrepancias pueden ser debidas al bajo número de casos analizados, a la procedencia de las muestras analizadas y la variabilidad en la metodología utilizada para la detección de alteraciones genéticas específicas (171-174). En este sentido, algunos enfoques moleculares como las matrices de hibridación genómica comparativa (aCGH), o las matrices de polimorfismos de nucleótido simple (aSNPs), tienen varias limitaciones en la detección de pérdidas o ganancias en material genético (174,175) asociadas al

componente tumoral de la muestra. Al emplear estas metodologías, no obtenemos información detallada sobre la heterogeneidad clonal de los tumores y la diversidad genética dentro de una misma muestra tumoral, particularmente cuando los clones de células tumorales están presentes en frecuencias relativamente bajas. Tales dificultades se podrían resolver utilizando técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH), con una adecuada combinación de sondas para obtener información detallada acerca de la heterogeneidad tumoral a nivel de células tumorales individuales. Varios autores señalan que las técnicas de FISH pueden ser de gran utilidad diagnóstica en casos morfológicamente difíciles y en aquellos casos donde el material tumoral es escaso (176).

Aunque en la era actual, la investigación oncológica aboga por técnicas moleculares cada vez más precisas y sofisticadas (como la secuenciación de nueva generación y la PCR digital), que nos permitan analizar variaciones en el número de copias (CNVs), mutaciones y reordenamientos cromosómicos (fusiones) de forma simultánea de miles de genes e incluso de todo el genoma en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, como ya hemos señalado, estas técnicas solo se encuentran en grandes hospitales y no están al alcance de todos los pacientes. No obstante, las técnicas de FISH nos permiten realizar los estudios monogénicos de aquellos genes accionables con terapias dirigidas tales como los reordenamientos en *ALK*, *ROS1*, *RET* y *NTRK*, así como las amplificaciones de *MET* (177).

Desde el punto de vista clínico, la amplificación del gen *EGFR* ha sido relacionada con un pronóstico clínico adverso en pacientes con carcinoma oral de célula escamosa, entre otros (178). Así, Jiang, D. y colaboradores encontraron que la amplificación del gen *EGFR* y la sobreexpresión inmunohistoquímica de EGFR en carcinoma de células escamosas esofágico, estaban relacionadas significativamente con la presencia de ganglios metastásicos ($p = 0.04$) (179). Los resultados en el análisis multivariante obtenidos por Lida, K. y colaboradores mostraron que la amplificación de *EGFR* es un factor pronóstico independiente para la SG ($p = 0.01$) (180). Huei-Tzu Chien y colaboradores asociaron el número de copias del gen *EGFR* en el carcinoma de células escamosas oral con el estadio clínico, la diferenciación tumoral, la metástasis ganglionar y a un efecto negativo en la progresión de la enfermedad (181).

En un reciente estudio llevado a cabo por *Hainan Yang* y colaboradores, se describe que la amplificación de *EGFR* constituye un mecanismo de resistencia en los pacientes con metástasis leptomeníngea (ML) de CPCNP. En ese estudio se analizaron 53 pacientes con ML de CPCNP con (todos ellos) mutaciones de *EGFR* tratados con inhibidores de tirosina quinasa de *EGFR* (EGFR-TKIs). Se analizaron muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR), de cada paciente mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS), para detectar alteraciones somáticas, con un panel de 168 genes relacionados con cáncer. La tasa de amplificación de *EGFR* fue mucho mayor en el momento de la progresión leptomeníngea que en el diagnóstico inicial ($p < 0,01$). El estado funcional de Karnofsky fue peor ($p = 0,02$) y la presión del LCR fue mayor ($p = 0,006$) en los pacientes con amplificación de *EGFR* que en los que no la tenían. El análisis multivariante mostró que la mediana de SG fue significativamente más corta en pacientes con amplificación de *EGFR* que en aquellos que no la tenían, convirtiéndose en un factor pronóstico independiente para una SG (8,3 frente a 15 meses; $p = 0,017$) (182). Estos hallazgos apoyan nuestra teoría de que la amplificación del gen *EGFR* en pacientes con CPCE confiere un peor pronóstico y afecta negativamente la supervivencia de estos pacientes.

De acuerdo con nuestros resultados, se sabe que el diagnóstico del carcinoma de células escamosas en pacientes de edad avanzada (mayores de 80 años), presentan un peor pronóstico comparado con aquellos pacientes que se diagnostican con <50 años (183). *Faruk Tas* y colaboradores, demostraron que la edad es uno de los mayores factores pronósticos que afectan la supervivencia en los pacientes con cáncer de pulmón y demostraron que el tiempo medio de supervivencia de los pacientes de edad avanzada fue significativamente menor que en los pacientes jóvenes tanto en el análisis univariante ($p = 0,009$) como en el multivariante ($p = 0,023$) (184). Del mismo modo, *Sealy* y colaboradores informaron que los pacientes de edad avanzada con CPCNP frecuentemente muestran recurrencia local de la enfermedad mientras que en los pacientes jóvenes la diseminación tumoral a distancia fue más frecuente (185). En la misma línea, *Bozhok* y colaboradores refieren que, en enfermedad no resecable en estadio avanzado, una edad más temprana podría ser una característica de mejor pronóstico, por el contrario, los riesgos inherentes a la comorbilidad de los pacientes de mayor edad, podría detener un mayor impacto en la mortalidad (186).

En nuestro trabajo, la mayoría de los pacientes (77%) con CPCE con amplificación de *EGFR*, presentaron el tumor en el pulmón derecho. En este sentido, Mc *William* y colaboradores observaron que la lateralidad del CPCE podría estar relacionada con diferencias en el pronóstico de la enfermedad, encontrando en el análisis multivariante que los pacientes con tumores localizados en el pulmón derecho tienen una menor SG que aquellos pacientes con tumores localizados en el pulmón izquierdo ($p < 0.01$, 15 vs. 18 meses; respectivamente) (187). Del mismo modo, *Farrugia* y colaboradores, encontraron que aquellos pacientes con CPCNP localizado en el pulmón derecho que recibieron β -bloqueantes, mostraron una SG significativamente peor (HR = 1.58, 95% CI 1.11-2.25, $p = 0.01$), que aquellos pacientes con tumores localizados en el pulmón izquierda (HR= 0.73, 95% CI 0.50-1.08, $p = 0.11$) (188). Otros autores, sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la lateralidad del tumor primario con respecto a la SG de los pacientes con CPCNP que recibieron radioterapia con intención curativa (189).

Varios estudios han demostrado que el número de copias del gen *EGFR* o las amplificaciones detectadas mediante FISH podrían ser un buen biomarcador para predecir respuesta al tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (*EGFR*-TKIs) en pacientes con CPCE en estadio avanzado (190-192) y en pacientes con el tipo histológico de ADC. Así, en el estudio llevado a cabo por *Shang L.* y colaboradores (193), observaron que pacientes con la amplificación de *EGFR* y mutaciones activadoras del gen sometidos a tratamientos con *EGFR*-TKIs mostraron una supervivencia libre de progresión superior que aquellos pacientes con solo la mutación activadora (16.3 vs. 9.1 meses, $p=0.004$). Estos resultados les permitieron concluir, que la amplificación de *EGFR* junto con las mutaciones activadoras podrían ser un buen predictor de respuesta a terapias con *EGFR*-TKIs. En un ensayo clínico en fase III doble-ciego, donde se compara la eficacia de erlotinib vs. erlotinib + bevacizumab (194) en pacientes con CPCNP en estadio avanzado tras el fracaso con quimioterapia estándar en primera línea, sugieren que cuando coexisten ganancias en el número de copias de *EGFR* detectadas por FISH, sobreexpresión y la mutación activadora del gen *EGFR* los pacientes muestran un mayor beneficio a la terapia dirigida a *EGFR*- TKIs. En la misma línea, dos ensayos clínicos en fase III cuyos resultados fueron publicados recientemente, compararon la eficacia del Erlotinib (estudio fase III BR.21) y Gefitinib (fase III, Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer (ISEL))

vs. placebo en segunda y/o tercera línea en pacientes aleatorios con CPCE en estadio avanzado. Ambos estudios mostraron mayor beneficio con terapia *EGFR-KTIs* el subgrupo de pacientes con altos niveles del número de copias del gen *EGFR* (195,196). *Zhang* y colaboradores realizaron un metaanálisis que incluía 17 estudios con un total de 2.047 pacientes y analizaron la relación entre el número de copias del gen *EGFR* y la respuesta al tratamiento con *EGFR-KTI* en pacientes con CPCE en estadio avanzado. En este estudio se puso de manifiesto que pacientes con altos niveles de amplificación de *EGFR* tratados con *EGFR-TKIs*, mostraron un incremento significativo en la SG y la supervivencia libre de enfermedad (197). *Frances A Shepherd* y colaboradores analizaron muestras de 731 pacientes con CPCNP para evaluar los beneficios del erlotinib en pacientes con sobreexpresión de EGFR detectada por IHQ (>10% de células tumorales teñidas con cualquier grado de intensidad para anticuerpo EGFR), observando que los pacientes con sobreexpresión de EGFR mejoran la supervivencia y disminuyen los síntomas, en comparación con el grupo de pacientes que recibieron placebo (198). Por el contrario, la investigación llevada a cabo por *Ming-Sound Tsao* y colaboradores, encontraron que la supervivencia de los pacientes con CPCNP tras tratamiento con erlotinib, no estaba influenciada por el estado de expresión de EGFR, ni por la variación en el número de copias de EGFR o la mutación de EGFR. No obstante, cabe destacar que, en su análisis univariante, la supervivencia fue mayor en el grupo de pacientes con un elevado número de copias de *EGFR* tratados con erlotinib vs. el grupo placebo (P= 0.008) (199). De manera similar, se han llevado a cabo estudios en los que se emplearon terapias anti-EGFR en pacientes con cancer gástrico y amplificación de *EGFR* o que mostraban positividad de EGFR por IHQ, tras la resección quirúrgica del tumor primario (200). Estos estudios muestran que la positividad de EGFR es un factor pronóstico favorable independiente, especialmente en pacientes en estadio III de la enfermedad. En conclusión, nuestros propios resultados y los de los trabajos previamente descritos, indican que la amplificación de *EGFR* confiere un mal pronóstico a los pacientes con CPCE en estadios precoces (pT1-pT2) que podría ser revertido a través de inhibidores de la tirosín quinasa de EGFR. Para ello, consideramos que es necesario el desarrollo de más ensayos clínicos que arrojen luz en este campo de investigación.

5.2 Valor pronóstico de las características clínicas, histopatológicas y evolutivas del CPCE.

Además de las características genéticas del tumor, también encontramos una relación entre la invasión tumoral de la pleura visceral, detectada en el 20% de los casos, y el pronóstico de la enfermedad, como en observaciones previamente descritas en la literatura.

De acuerdo con la actual clasificación TNM (8ª edición), la presencia de invasión tumoral de la pleura visceral por tumores ≤ 3 cm, incrementa la categoría T, de pT1 a pT2a. Este cambio está basado en los estudios que han demostrado que los tumores ≤ 3 cm que penetran más allá de la capa elástica de la pleura visceral se comportan de la misma manera que los tumores de tamaño similar que se extienden a la superficie de la pleura visceral (201,202). Para establecer que un tumor invade la pleura visceral, las células tumorales deben haber cruzado la capa elástica más gruesa de la pleura visceral, que suele ser la capa elástica más externa y cercana a la superficie revestida de mesotelio pleural visceral. Por el contrario, la infiltración del tumor a través de la capa elástica interna no se clasifica como invasión de la pleura visceral (203). Las capas elásticas pleurales pueden ser difíciles de apreciar en las tinciones de hematoxilina-eosina. Las técnicas histoquímicas para tinción de fibras elásticas pueden facilitar la evaluación de invasión pleural (201-203).

Resultados similares a los aquí encontrados fueron descritos previamente por Toshihiro Osaki y colaboradores (204), quienes analizaron retrospectivamente un total de 474 pacientes diagnosticado de CPCNP en estadios tempranos (pT1-pT2) con el objetivo de evaluar la influencia del grado de invasión de la pleura visceral (PL0 vs. PL1-2) en el pronóstico de la enfermedad, encontrando diferencias significativas en las tasas de supervivencia a 5 años según el grado de afectación de la pleura visceral, en el análisis multivariante. En la misma línea, Shimizu y colaboradores (205), identificaron invasión tumoral de la pleura visceral en 31 de los 138 pacientes tras resección quirúrgica del tumor primario (22% de los casos), indicando que la invasión tumoral de la pleura visceral es un factor predictivo independiente de peor pronóstico, con o sin tener en cuenta la afectación de ganglios linfáticos. Las implicaciones pronósticas de la invasión tumoral de la pleura visceral en la pieza de resección quirúrgica están bien definidas. En el

metaanálisis desarrollado por *Ting Wang* y colaboradores (206) se investigó el papel pronóstico de la invasión pleural en pacientes con resección completa del tumor, encontrando que los pacientes con PL1 y PL2 mostraban menor SG que aquellos pacientes con PL0. Además, en este estudio los pacientes con PL2 mostraron incluso menor SG que los pacientes con PL1. En otro metaanálisis que incluía 22 estudios, llevado a cabo por He Huang y colaboradores (207), encontraron que, la invasión de la pleura visceral se asoció a fallecimientos precoces (HR=1.427; $p \leq 0.001$) y a recurrencia (HR=1.6; $p \leq 0.001$) en todos los pacientes en estadio I. En los análisis por subgrupos de acuerdo con el tamaño del tumor primario, la invasión tumoral de la pleura visceral se asoció con la muerte del paciente en cada uno de los subgrupos y con la recurrencia en el subgrupo tumoral de <3 cm. Los resultados de este metaanálisis concluyen que la invasión pleural visceral es un factor de mal pronóstico independiente del tamaño del tumor primario en pacientes con CPCNP en estadio I. En concordancia con nuestros hallazgos en este metaanálisis también se demostró que la invasión tumoral de la pleura visceral tiene un impacto adverso en el pronóstico de los pacientes con CPCE tras la resección quirúrgica del tumor en dependencia del grado de invasión pleural.

En el presente estudio, el análisis multivariante de los todos factores pronósticos asociados a la SG mostró como valor independiente dos variables: altos niveles de amplificación de *EGFR* detectados por FISH y la invasión tumoral de la pleura visceral (PL1 o PL2). La coexistencia de ambas características adversas se asoció con una importante reducción en la SG de los pacientes, a diferencia de los casos en los mostraron ninguna de estas características adversas (SG a 4 años del 0% vs. 32%; respectivamente). Aunque se han reportado varios estudios que relacionan las diferentes anomalías cromosómicas y el pronóstico del CPCE (208), nuestro trabajo es el primero en el cual se describe el valor pronóstico independiente de la amplificación del gen *EGFR* limitado a los pacientes en estadios precoces y la invasión tumoral de la pleura visceral, en la serie global (209).

Finalmente, la alta frecuencia de varones en nuestra serie es llamativo. La incidencia de los tumores de células escamosas de pulmón es menor entre las mujeres (10%) que en hombres (55%) (210). Sin embargo, este fenómeno está fuertemente relacionado con el hábito tabáquico independientemente del género del paciente. Sin

embargo, además del tabaco, se cree que otros factores genéticos y la susceptibilidad biológica entre géneros puede explicar esta disparidad (211).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el pronóstico del CPCE estaría directamente relacionado con el perfil genético de las células tumorales al diagnóstico, al asociarse la presencia de determinadas alteraciones cromosómicas, como la amplificación de *EGFR*, con la SG en estadios precoces de la enfermedad. Combinar este parámetro con la presencia de invasión tumoral de la pleura visceral, nos permitió estratificar a los pacientes en tres grupos con comportamientos clínicos bien diferenciados al diagnóstico de la enfermedad como se expresa a continuación y en la **Figura 21**:

GRUPO 1. riesgo bajo (ausencia de amplificación de EGFR y de invasión tumoral de la pleura visceral: score 0).

GRUPO 2. riesgo intermedio (una característica adversa, ya sea la amplificación de EGFR o la invasión tumoral de la pleura visceral: score 1).

GRUPO 3. alto riesgo (presencia de amplificación de EGFR y de invasión tumoral de la pleura visceral: score 2).

5.3 Análisis del perfil de expresión génica (GEP) y su caracterización funcional.

Los inhibidores de puntos de control inmunitarios (PCI) dirigidos a PD-1, tales como el nivolumab, han mejorado notablemente el panorama del tratamiento del carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPCNP) avanzado. Aunque los pacientes con terapia de PCI pueden lograr una supervivencia global (SG) a largo plazo, los mecanismos subyacentes a la resistencia y/o sensibilidad frente al bloqueo del complejo PD-1 / PD-L1 actualmente no se conocen bien. Por ello, una vez conocido los factores pronósticos en la histología escamosa, nos propusimos definir el perfil de expresión del tejido tumoral, con un doble objetivo, conocer las proteínas involucradas en la tumorigénesis y los mecanismos involucrados a la resistencia y/o sensibilidad frente al fármaco, con el fin de encontrar factores predictivos capaces de seleccionar pacientes que se pueden beneficiar de la inmunoterapia. En este sentido estudiamos la expresión diferencial de 760 genes involucrados en la compleja interacción entre el tumor, el microambiente y la respuesta

inmunitaria en paciente con CPCNP (6 pacientes con histología ADC y 4, Escamosos), lo que podría permitir conocer los mecanismos de evasión inmunitaria.

La quimioterapia asociada a inmunoterapia en neoadyuvancia en el CPCNP ha mejorado las respuestas patológicas y las tasas de supervivencia en comparación con quimioterapia sola, lo que llevó a la agencia de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) a aprobar Nivolumab junto con la quimioterapia para el tratamiento de los pacientes con CPCNP reseccable en estadio IB-III A (AJCC 7.^a edición), que no presentaban alteraciones de *ALK* y *EGFR* (212). Desafortunadamente, un alto número de pacientes que no responden completamente a esta terapia, desarrollan una progresión temprana de la enfermedad. Hasta el momento, no es posible predecir con exactitud estos eventos por la falta de conocimiento de los mecanismos que subyacen en el proceso biológico de la enfermedad en relación con los mecanismos de respuesta y resistencia a dicha terapia (213). Uno de los biomarcadores de mayor relevancia para predecir los beneficios de la inmunoterapia es la expresión de PD-L1 o ligando 1 de muerte programada; una proteína de superficie cuyos niveles se deben considerar a la hora de abordar la enfermedad e implementar la estrategia terapéutica. En concreto, se ha encontrado que los niveles de expresión del PD-L1 se han relacionado con una mayor tasa de respuesta y una mayor eficacia de la inmunoterapia. Por ello, la identificación del nivel de expresión de PD-L1 como biomarcador predictivo en el momento del diagnóstico se ha convertido en una herramienta útil para orientar la selección de pacientes potencialmente respondedores a la inmunoterapia (214,215). Así, las principales guías de práctica clínica establecen que una mayor expresión de PD-L1 se asocia a una mayor respuesta a la inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1, recomendando utilizar los inhibidores PD-1/PD-L1 en primera línea cuando la expresión es $\geq 50\%$. Sin embargo, el significado clínico de respuesta con expresiones de PD-L1 $\geq 50\%$ todavía es incierta. De hecho, en el presente estudio, los 3 pacientes analizados con respuesta patológica completa tras tratamiento con nivolumab mostraron expresión de PD-L1 $\leq 40\%$ (0%, 30% y 40% respectivamente). No obstante, en segunda línea también se han observado beneficios con la inmunoterapia combinada con la quimioterapia cuando la expresión de PD-L1 es $\geq 1\%$. (216-219). Desafortunadamente, existe un subgrupo de pacientes que no se beneficia de la inmunoterapia a pesar de tener una expresión positiva de PD-L1 y, por el contrario, otros pacientes que muestran expresión de PD-L1 responden adecuadamente a la

inmunoterapia, como ocurrió en uno de los pacientes de nuestra serie. En nuestra serie analizada (n=10) encontramos un paciente con respuesta patológica completa tras tratamiento con Nivolumab y que en estudio inmunohistoquímico presentaba ausencia de expresión de PD-L1 (CPS=0). En este sentido, la investigación llevada a cabo por *Provencio M*, y colaboradores, (220), encontró que la tinción con PD-L1 no era un predictor de supervivencia a largo plazo. Se han obtenido resultados similares en el entorno metastásico donde PD-L1 no ha demostrado ser predictivo a la quimioterapia combinada con la inmunoterapia (221). Concretamente, el ensayo KEYNOTE-189 demostró que la adición de pembrolizumab a la quimioterapia, como tratamiento de primera línea, mejora significativamente tanto la supervivencia libre de progresión (SLP) como la SG en pacientes con CPCNP con enfermedad metastásica, independientemente del estado de PD-L1 (222). Del mismo modo, *Rothschild* y colaboradores (223) no encontró una asociación significativa entre los niveles de expresión de PD-L1 y la respuesta patológica o la reducción del estadio ganglionar en pacientes con CPCNP tratados con quimioterapia neoadyuvante seguida de durvalumab.

La evaluación del nivel de expresión de PD-L1 en el tejido tumoral puede realizarse usando diferentes anticuerpos monoclonales desarrollados sobre plataformas automatizadas de inmunohistoquímica. Las discrepancias de los porcentajes de células tumorales que nos puedan predecir la respuesta a la inmunoterapia pueden ser explicados, al menos en parte, por la diversidad de las clonas utilizadas para la evaluación de la expresión de PD-L1 (SP142, 28,8, 22C3, SP263, y 73-10). *Tsao MS* y colaboradores, diseñó un método para estandarizar los resultados del estudio inmunohistoquímico de PD-L1, proporcionando información sobre la comparabilidad clínica y analítica de los cinco anticuerpos monoclonales descritos. El estudio reveló que tres de las cinco pruebas para evaluar la expresión de PD-L1 tenían una elevada concordancia (22C3, 28-8, y SP263), mientras que el anticuerpo SP142 tuvo menor marcación en las células tumorales y el 73-10 demostró una alta sensibilidad con baja especificidad (224).

A pesar de las limitaciones vinculadas con el uso regular de la expresión de PD-L1, este biomarcador continúa siendo el estándar para seleccionar los candidatos a recibir monoterapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI). Por ello, la búsqueda e implementación de biomarcadores para predecir con mayor precisión la respuesta a la inmunoterapia es un reto actual de la mayoría de los grupos de investigación

(225). Los biomarcadores relacionados con las células tumorales de interés para la inmunoterapia incluyen la expresión de PD-L1, la carga mutacional (Tumor Mutational Burden por sus siglas en inglés TMB) (226,227), la vía de reparación del ADN, la deficiencia de recombinación homóloga y mutaciones genéticas específicas (por ejemplo, en *KRAS* y *STK11*). Todos ellos pueden estar relacionados con la eficacia de la inmunoterapia preoperatoria (228). Sin embargo, los dos que han sido explorados con mayor avidez son la expresión de PD-L1 y TMB. La TMB representa el número total mutaciones somáticas que son identificadas por megabase (Mb) del área que codifica el genoma tumoral. Por el momento, la TMB no se ha visto relacionada con la supervivencia global (SG) en pacientes con CPCNP. De hecho, aún existen dudas respecto de cuál es la mejor técnica para evaluar la TMB, secuenciación completa del exoma vs. secuenciación de paneles específicos de genes involucrados en la enfermedad, evento que desencadenó limitaciones para la estandarización de la prueba a partir de diversos paneles genéticos. De igual forma, no existe un punto de corte estandarizado entre diferentes neoplasias. Estas dificultades han limitado la introducción de la TMB como biomarcador útil para seleccionar y estratificar a los pacientes candidatos a recibir ICI en monoterapia o en combinación con quimioterapia en segunda línea (229).

El desarrollo de biomarcadores para la inmunoterapia es un desafío mucho mayor que el desarrollo de biomarcadores para los tratamientos dirigidos a dianas. En este último caso, la búsqueda de biomarcadores se centra en las características específicas de las células tumorales y de mutaciones específicas que ocurren en ellas. En el caso de la inmunoterapia, además de las alteraciones de las células tumorales, están implicados otros factores, tan relevantes o más, como las características del microambiente tumoral y la respuesta inmunitaria del huésped. Así, en la investigación realizada por *Casarrubios M.* y colaboradores, los tumores con respuesta patológica completa tenían un infiltrado inmunitario preestablecido más fuerte (niveles más altos de macrófagos IFNG, GZMB, NKG7 y M1) que los tumores en progresión o sin respuesta. Merece destacar, que en este estudio también se observó, mayor expresión de varios genes, incluidos *AKT1*, *BST2*, *OAS3* o *CD8B*; mientras que mayores proporciones de células dendríticas y neutrófilos en muestras quirúrgicas de los pacientes no-repondedores, se asociaron con recaídas tras la cirugía. Además, se ha observado que altos niveles de carga mutacional del tumor y PD-L1 previos al tratamiento influyen en el panorama inmunitario posterior al

tratamiento con la regulación a la baja de los marcadores de proliferación y las moléculas de señalización del interferón tipo I en las muestras quirúrgicas (230).

Tras llevar a cabo los experimentos de expresión y analizar los resultados obtenidos a partir de ellos, se identificó una desregulación de 24 de los 760 genes incluidos en el array de expresión (*CXCL11*, *NT5E*, *KLRK1*, *CD3G*, *GZMA*, *IDO1*, *LCK*, *CXCL9*, *GNLY*, *ITGAL*, *HLA-DRB1*, *CXCR6*, *IFNG*, *CD8A*, *ITK*, *B2M*, *HLA-B*, *HLA-A*, *PNOC*, *CD19*, *TP73*, *ARG1*, *FCRL2* y *PTGER1*) que permitían discriminar pacientes respondedores frente a los no-respondedores tratados con inmunoterapia. En este sentido, la expresión anómala de algunos de estos genes ha sido reportada previamente en la literatura como predictores de respuesta a la inmunoterapia en diferentes tipos de neoplasias, especialmente de histología escamosa. Recientemente, un estudio (COLIBRI; fase II) demostró la aceptabilidad y la seguridad de un doble bloqueo del punto de control inmunitario con nivolumab combinado con ipilimumab en el entorno neoadyuvante, seguida de nivolumab en monoterapia como mantenimiento tras la quimiorradiación en pacientes con carcinoma de células escamosas de cuello uterino localmente avanzado. Interesantemente, encuentran una firma genómica en el análisis multivariante a la hora de predecir la respuesta al tratamiento con una alta homología a la que hemos encontrado en el presente estudio (expresión desregulada de *CCL19*, *CCR2*, *CCR4*, *CCR5*, *CD27*, *CD40LG*, *CD8A*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL13*, *CXCL9*, *CXCR6*, *FASLG*, *FGL2*, *GZMA*, *GZMH*, *IDO1*, *IFNG*, *IRF8*, *LAG3*, *LYZ*, *MS4A1*, *PDCD1*, *TBX21*, *TLR7* y *TLR8*). Del mismo modo, Ayers y colabores analizaron los perfiles de expresión génica, usando ARN de muestras basales de tumores de pacientes con distintas histologías, tratados con pembrolizumab. Identificaron una firma de 18 genes, asociados con la producción de IFN- γ y la activación de linfocitos T, que se correlacionan con el beneficio clínico del paciente (231). Experimentalmente, se ha demostrado que las células neoplásicas deficientes en *CXCL9* o *CXCL10* son más tumorigénicas y muestran un importante papel en la infiltración de células T después del bloqueo de PD-L1 (232). Específicamente, pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia han mostrado tener mejores tasas de supervivencia cuando el tumor expresa *CXCL9* y/o *CXCL10* (233). En este sentido, nuestros resultados respaldan la idea de que la expresión anómala de *CXCL9* y *CXCL10* podrían ser buenos predictores en la respuesta al tratamiento con inmunoterapia en pacientes con CPCE.

Aún más, varios de estos biomarcadores han demostrado ser útiles para predecir el mal pronóstico que le confiere al paciente que podría ser revertido a través de tratamientos basados en la ICI. En este sentido, el estudio realizado por *Lee KS.* y colaboradores, (234) mostraron que las quimiocinas inducibles por IFN- γ son marcadores pronósticos útiles en pacientes con CPCNP. En particular, encontraron que la expresión alterada de los genes *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* e *IFN- γ* se comportaron como factores pronósticos para SG, en el análisis univariante, mientras que solo la sobreexpresión de *CXCL9* y *CXCL11* mostraron influencia significativa en la SG como factores pronósticos independientes. El gen *CXCL11* codifica el ligando de quimiocinas CXC conocido como quimioatrayente de células T inducible por IFN- α . Esta proteína media el reclutamiento de células T, Natural Killer (NK) y monocitos/macrófagos a través de receptores acoplados a proteína G, *CXCR3*, *CXCL9* y *CXCL10* (235). La señalización a través de este eje ligando-receptor está implicado en varias actividades fisiológicas, incluido la migración, diferenciación y la activación de células inmunitarias (236). En un reciente trabajo en el que realizaron un análisis funcional de *CXCL11* se mostró que la alta expresión de esta proteína está significativamente asociada con las vías inmunorrelevantes y por ello, sugieren que la expresión de *CXCL11* se podría comportar tanto como un marcador de pronóstico como de respuesta al tratamiento con inmunoterapia en todos los tipos de neoplasias (237).

La participación de quimiocinas y sus receptores en la progresión del cáncer y especialmente en el melanoma es importante, compleja y dinámica, y depende tanto de características de las células tumorales como de aquellas otras presentes en el microambiente tumoral del huésped. Estas interacciones celulares y moleculares determinan si predomina un efecto potenciador que favorezca la progresión tumoral, o un efecto antitumoral, que permita la regresión o al menos la estabilización del melanoma. En este sentido, el microambiente tumoral del melanoma maligno incrementa la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la capacidad metastatizante a través de la sobreexpresión de la vía *CXCR6* (238). De la misma forma, se ha observado que *CXCL16* promueve el crecimiento celular de células tumorales que expresan *CXCR6* en cáncer de próstata (239). También se ha visto que esta pareja tiene un efecto protumoral en este tipo de cáncer promoviendo la migración y proliferación de leucocitos asociados al tumor. El gen *CXCR6* codifica para un receptor de la superficie celular que se expresa en las células T de memoria y cuyo único ligando es *CXCL16*, que puede coexistir como una forma

anclada en la membrana o soluble, actuando como un quimioatrayente. En otras neoplasias como cáncer de cabeza y cuello, pulmón y mama, los pacientes que presentan niveles altos de *CXCR6* tiene mayor probabilidad de supervivencia (240) tras tratamientos inmunoterápicos. Interesantemente, *CXCR6* es uno de los 18 genes que fueron desarrollados y validados como biomarcador clínico para predecir la respuesta a la terapia anti-PD-1 en varios tipos de cáncer (241).

Otros marcadores de linfocitos T detectados en nuestro estudio como potenciales biomarcadores tanto asociados al pronóstico como a la respuesta a ICI fueron CD3G y CD8A. El gen CD3G codifica para la cadena gamma de la glicoproteína CD3 que se encuentra en la superficie de los linfocitos T. El complejo de proteínas CD3 (gamma, delta, épsilon y zeta) se asocia en la superficie de las células T con el receptor de antígeno de células T (TCR) y es necesario para la señalización de la célula T. De forma similar, el gen CD8A codifica la cadena alfa del complejo CD8 situada en la superficie de los linfocitos T. Al igual que CD3G, el complejo CD8 se asocia con el receptor de antígeno de células T (TCR) y contribuye a la señalización y activación de las células T, así como en la respuesta inmunitaria. De hecho, el complejo CD8 ayuda a reconocer y matar las células infectadas con virus y a las células tumorales. Estudios previos han asociado una expresión aberrante de estos genes con la SG y respuesta a los ICI en diferentes neoplasias. Así, análisis *in silico*, realizados en el carcinoma escamosa de cérvix uterino han sugerido que una elevada expresión de CD3G podría ser un nuevo biomarcador para la inmunoterapia (242). En un trabajo recientemente publicado, se concluye que CD8A puede ser un indicador útil para predecir supervivencia y respuesta a la inmunoterapia en cáncer de vejiga. En este trabajo analizan muestras procedentes de pacientes con cáncer avanzado de vejiga tratados con inmunoterapia y observan que los niveles bajos de expresión de CD8A se asocian con resistencia a la inmunoterapia. Sin embargo, la expresión de CD8A elevada se relaciona con una alta carga mutacional tumoral, con los genes involucrados en el punto de control inmunitario y con la presencia de varios tipos de células inmunitarias infiltrantes de tumores, por lo que se le atribuye la capacidad de predecir una respuesta exitosa a la inmunoterapia (243).

En la firma genómica de 24 genes con relevancia pronóstica que proponemos en este trabajo (**Tabla 9 y Figura 24**), encontramos altos niveles de expresión de *GZMA* y *HLA-A*. El gen *GZMA* codifica para la Granzima A que es una triptasa que escinde las proteínas

después de los residuos básicos de arginina o lisina y que está presente en los gránulos de linfocitos T citotóxico (244). En las células dianas de los linfocitos T citotóxico, granzima A activa las vías de muerte celular programada independientes de caspasa que son únicas y paralelas a las de Granzima B (245). En un estudio realizado en melanoma en el que caracterizaron el microambiente inmunitario en pacientes antes y después del tratamiento con nivolumab, encontraron que los pacientes con altos niveles de expresión de PD-L1, PD-L2, GZMA y HLA-A presentaron una alta tasa de respuestas tras tratamiento inmunoterápico con nivolumab (246).

Finalmente, merece destacar que investigadores del grupo de investigación en Genes y Cáncer del Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (IDIBELL, Barcelona, España), han identificado mutaciones asociadas a una pérdida de función en una serie de genes que codifican para proteínas del complejo de histocompatibilidad HLA-I, involucrado en la respuesta inmunológica y que puede condicionar la respuesta de los pacientes de carcinoma pulmonar a los nuevos tratamientos con inmunoterapia. En el trabajo recientemente publicado en *Clinical Cancer Research*, describieron que los altos niveles de expresión de B2M, como consecuencia de mutaciones presentes en un 6-8%, así como los altos niveles de otras proteínas o moléculas relacionadas con el funcionamiento del complejo HLA-I en los pacientes sometidos a inmunoterapia, condicionaba una respuesta superior a la terapia que en aquellos con deficiencias en estas proteínas (247), hallazgo encontrado tanto en nuestro estudio experimental como en la validación en la serie independiente. Cabe destacar, que el estado mutacional del gen *B2M* se podría detectar en la sangre periférica de los pacientes y nos podría permitir la monitorización de pacientes con CPCE tratados con ICI. *Yu Zhao* y colaboradores, descubrieron que los niveles de B2M previos al tratamiento son más altos en pacientes con una respuesta completa que en aquellos con un respuesta parcial o enfermedad progresiva. Además, observaron que los niveles de ARNm de PD-L1 no fueron comparables entre los tres grupos, lo que implica que los niveles de B2M, pero no los niveles de ARNm de PD-L1, son mejores predictores en la inmunoterapia basada en PD-1. Desde el punto de vista funcional, demostraron que el silenciamiento de B2M en tumores en ratones MC38 sensibles condujo a la resistencia a la inhibición de PD-1 y también disminuyó los efectos terapéuticos de la inmunoterapia (248).

En este estudio, analizamos la expresión de 760 genes relacionados con procesos inmunológicos sobre muestras del tejido tumoral donde realizamos el diagnóstico de la enfermedad. En este sentido, caracterizamos el perfil de expresión génica de muestras tumorales con el fin de identificar nuevos biomarcadores y los mecanismos que subyacen a las respuestas tumorales a la inmunoterapia adyuvante tras la resección quirúrgica del tumor. Nuestros resultados refuerzan las diferencias entre las respuestas patológicas completas y tumores refractarios, describiendo posibles mecanismos inmunes de respuesta y abriendo la posibilidad de personalizar la terapia de los regímenes basados en inmunoterapia en el contexto adyuvante del cancer de pulmón, tanto en pacientes con histología escamosa como de tipo ADC.

6. CONCLUSIONES

6.1 En relación con la incidencia y el valor pronóstico de las alteraciones cromosómicas presentes en el carcinoma pulmonar de células escamosas (CPCE):

1. El CPCE muestra un perfil citogenético específico, caracterizado por presentar pérdidas a nivel de las regiones cromosómicas 9p21 y 7q31, así como altos niveles de amplificación en las regiones 5p15.2, 7p12, 8q24 y 22q11, donde interesantemente se ubican genes involucrados en la génesis y/o progresión de la enfermedad, tales como *CDKN2A*, *EGFR* y *CMYC*.

2. La amplificación del gen *EGFR* en pacientes con CPCE es la única anomalía genética detectada con impacto adverso en la supervivencia global (SG) en la serie global y exclusivamente en estadios tempranos de la enfermedad, pudiendo potencialmente contribuir a una mejor estratificación pronóstica de los pacientes desde el momento del diagnóstico y a la toma de decisiones terapéuticas.

6.2 En relación con el valor pronóstico de las características clínicas, histopatológicas y evolutivas del CPCE:

1. De todas las características, clínicas, biológicas e histopatológicas evaluadas en el momento del diagnóstico de la enfermedad, la edad (>65 años), la afectación de ganglios linfáticos, la presencia de procesos metastásicos y la invasión tumoral de la pleura visceral, fueron las que mostraron una influencia adversa significativa reflejada en la SG.

2. De los factores pronósticos estudiados para la SG, encontramos que la combinación más relevante de variables independientes a la hora de predecir el comportamiento adverso de la enfermedad fue la presencia de invasión tumoral de la pleura visceral y/o la amplificación del gen *EGFR*. En base a estas dos

variables estratificamos a los pacientes con CPCE en tres grupo con diferente SG: GRUPO 1. riesgo bajo (ausencia de amplificación de EGFR y de invasión tumoral de la pleura visceral: score 0); GRUPO 2. riesgo intermedio (una característica adversa, ya sea la amplificación de EGFR o la invasión tumoral de la pleura visceral: score 1) y GRUPO 3. alto riesgo (presencia de amplificación de EGFR y de invasión tumoral de la pleura visceral: score 2).

6.3 En relación con el análisis del perfil de expresión génica (GEP) y su caracterización funcional:

1. Los estudios de expresión a través de la plataforma Nanostring nos han permitido identificar una firma genómica de 24 genes en muestras de tumores primarios de pacientes con CPCNP que nos permite discriminar, de forma clara y precisa pacientes respondedores frente a no-respondedores, independientemente de los niveles de expresión de PD-L1, tras tratamiento con nivolumab. La detección de la expresión de estos genes en el momento del diagnóstico se plantea como una herramienta útil para el manejo clínico de pacientes tras inmunoterapia; con especial énfasis en el estudio de la firma genómica de *ITK*, *ITGAL*, *FCRL2*, *NT5E*, *AGR1*, *CD8A* y *CD19* cuya expresión fue validada en una larga serie independiente de pacientes con CPCE tratados con nivolumab.

2. El análisis de 2.166 pacientes *in silico* nos permitió identificar 13 de los 24 genes (*B2M*, *CD3G*, *CXCR6*, *NKG5*, *CTLA3*, *HLA-A*, *IFNG*, *ITGAL*, *ITK*, *LCK*, *CD73*, *HLA-DRB1* y *HLA-B*), con un fuerte impacto en el pronóstico de la enfermedad, alta tasa de recaídas y SG extremadamente cortas.

3. Nuestros hallazgos amplían el conocimiento de los procesos biológicos que subyacen en la interacción molecular de los puntos de control inmunitario que nos podría ayudar, mediante el estudio de esta firma genómica, a identificar aquellos pacientes con un beneficio real con terapia de inhibición del punto de control inmunitario anti-PD-1.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Youlden, D.R.; Cramb, S.; Baade, P. The International Epidemiology of Lung Cancer: Geographical Distribution and Secular Trends. *J. Thorac. Oncol.* 2008, 3, 819–831.
2. Perez-Moreno P, Brambilla E, Thomas R, Soria JC. Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res.* 2012 May 01;18(9):2443-51.
3. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers [published correction appears in *Nature*. 2012 Nov 8;491(7423):288. Rogers, Kristen [corrected to Rodgers, Kristen]]. *Nature*. 2012;489(7417):519-525.
4. Sabbula BR, Gasalberti DP, Anjum F. Squamous Cell Lung Cancer. [Updated 2022 Nov 5]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564510/>.
5. Teixeira VH, Pipinikas CP, Pennycuick A, et al. Deciphering the genomic, epigenomic, and transcriptomic landscapes of pre-invasive lung cancer lesions. *Nat Med.* 2019;25(3):517-525. doi:10.1038/s41591-018-0323-0.
6. Alduais Y, Zhang H, Fan F, Chen J, Chen B. Non-small cell lung cancer (NSCLC): A review of risk factors, diagnosis, and treatment. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102(8):e32899. doi:10.1097/MD.00000000000032899.
7. Dotto GP, Rustgi AK. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. *Cancer Cell.* 2016;29(5):622-637.
8. Otlu B, Díaz-Gay M, Vermes I, et al. Topography of mutational signatures in human cancer [published online ahead of print, 2023 Aug 3]. *Cell Rep.* 2023;42(8):112930. doi:10.1016/j.celrep.2023.112930.
9. Lee HY, Lee SH, Won JK, et al. Analysis of Fifty Hotspot Mutations of Lung Squamous Cell Carcinoma in Never-smokers. *J Korean Med Sci.* 2017;32(3):415-420.

10. Sands JM, Nguyen T, Shivdasani P, et al. Next-generation sequencing informs diagnosis and identifies unexpected therapeutic targets in lung squamous cell carcinomas. *Lung Cancer*. 2020;140:35-41.
11. Watanabe J, Togo S, Sumiyoshi I, et al. Clinical features of squamous cell lung cancer with anaplastic lymphoma kinase (ALK)-rearrangement: a retrospective analysis and review. *Oncotarget*. 2018;9(35):24000-24013.
12. Wang H, Sun L, Sang Y, et al. A study of ALK-positive pulmonary squamous-cell carcinoma: From diagnostic methodologies to clinical efficacy. *Lung Cancer*. 2019;130:135-142.
13. Bishop JA, Ogawa T, Chang X, et al. HPV analysis in distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(1):142-148.
14. Osorio JC, Candia-Escobar F, Corvalán AH, Calaf GM, Aguayo F. High-Risk Human Papillomavirus Infection in Lung Cancer: Mechanisms and Perspectives. *Biology (Basel)*. 2022;11(12):1691. Published 2022 Nov 23. doi:10.3390/biology11121691.
15. van Boerdonk RA, Daniels JM, Bloemena E, et al. High-risk human papillomavirus-positive lung cancer: molecular evidence for a pattern of pulmonary metastasis. *J Thorac Oncol*. 2013;8(6):711-718.
16. Yanagawa N, Wang A, Kohler D, et al. Human papilloma virus genome is rare in North American non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer*. 2013;79(3):215-220.
17. Dotto GP, Rustgi AK. Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. *Cancer Cell*. 2016;29(5):622-637.
18. Kim BR, Van de Laar E, Cabanero M, et al. SOX2 and PI3K Cooperate to Induce and Stabilize a Squamous-Committed Stem Cell Injury State during Lung Squamous Cell Carcinoma Pathogenesis. *PLoS Biol*. 2016;14(11):e1002581. Published 2016 Nov 23.
19. Chang JT, Lee YM, Huang RS. The impact of the Cancer Genome Atlas on lung cancer. *Transl Res*. 2015;166(6):568-585. doi:10.1016/j.trsl.2015.08.001.
20. Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, et al. SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet*. 2009;41(11):1238-1242.

21. Tonon G, Wong KK, Maulik G, et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(27):9625-9630.
22. Hirsch FR, Bunn PA Jr. Progress in research on screening and genetics in lung cancer. *Lancet Respir Med*. 2014;2(1):19-21.
23. Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP); Network Genomic Medicine (NGM). A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med*. 2013;5(209):209ra153.
24. Jiang B, Hu L, Dong D, et al. TP53 or CDKN2A/B covariation in ALK/RET/ROS1-rearranged NSCLC is associated with a high TMB, tumor immunosuppressive microenvironment and poor prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149(12):10041-10052. doi:10.1007/s00432-023-04924-7.
25. Kim Y, Hammerman PS, Kim J, et al. Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients. *J Clin Oncol*. 2014;32(2):121-128.
26. Wilkerson MD, Yin X, Hoadley KA, et al. Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important, and correspond to normal cell types. *Clin Cancer Res*. 2010;16(19):4864-4875.
27. Liu XY, Liu FY, Wang Z, Chen G. Management and surgical resection for tumors of the trachea and carina: experience with 32 patients. *World J Surg*. 2009;33(12):2593-2598. doi:10.1007/s00268-009-0258-1.
28. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol*. 2015;10(9):1243-1260.
29. Latimer KM. Lung Cancer: Clinical Presentation and Diagnosis. *FP Essent*. 2018;464:23-26.
30. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, et al., editores. Clasificación de la OMS de tumores de pulmón, pleura, timo y corazón. Lyon (Francia): Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer; 2015. (Serie de clasificación de tumores de la OMS, 4.^a ed.; vol. 7). <https://publications.iarc.fr/17>.
31. (hipercal) Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest*. 2003;123(1 Suppl):97S-104S.

32. Ruilong Z, Daohai X, Li G, Xiaohong W, Chunjie W, Lei T. Diagnostic value of 18F-FDG- PET/CT for the evaluation of solitary pulmonary nodules: a systematic review and meta-analysis. *Nucl Med Commun* 2017;38:67-75.
33. Boellaard R. Standards for PET Image Acquisition and Quantitative Data Analysis. *J Nucl Med* 2009; 50: 11S-20S.
34. Al-Ameria A, Malhotrab P, Thygesenc H, Plantd PK, Vaidyanathane S, Karthik S, et al. Risk of malignancy in pulmonary nodules: A validation study of four prediction models. *Lung Cancer* 2015; 89: 27-30.
35. Li ZZ, Huang YL, Song HJ, Wang YJ, Huang Y. the value of 18f-fdg-pet/ct in the diagnosis of solitary pulmonary nodules: a meta-analysis. *medicine (baltimore)* 2018; 97: e0130.
36. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. International Agency for Research on Cancer; 5th ed, 2021.
37. World Health Organization. Histological Typing of Lung and Pleural Tumors, 3rd ed. Springer Verlag, Germany, 1999; 45-50.
38. Li X, Wu D, Liu H, Chen J. Pulmonary sarcomatoid carcinoma: progress, treatment and expectations. *Ther Adv Med Oncol.* 2020;12:1758835920950207. Published 2020 Aug 25.
39. Nappi O, Swanson PE, Wick MR. Pseudovascular adenoid squamous cell carcinoma of the lung: clinicopathologic study of three cases and comparison with true pleuropulmonary angiosarcoma. *Hum Pathol.* 1994;25(4):373-378.
40. Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging. *J Am Acad Dermatol.* 2018;78(2):237-247.
41. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407.
42. Rossi G, Pelosi G, Barbareschi M, Graziano P, Cavazza A, Papotti M. Subtyping non-small cell lung cancer: relevant issues and operative recommendations for the best pathology practice. *Int J Surg Pathol.* 2013;21(4):326-336.
43. Pelosi G, Rossi G, Cavazza A, et al. Δ Np63 (p40) distribution inside lung cancer: a driver biomarker approach to tumor characterization. *Int J Surg Pathol.* 2013;21(3):229-239.

44. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2019;14(3):377-407.
45. (TNM y UICC) Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. TNM classification of malignant tumours. 8th ed. Oxford (UK): Wiley-Blackwell; 2017. UICC [Internet]. Geneva (Switzerland): Union for International Cancer Control; 2020. TNM Publications and Resources – Errata; updated 2020 Oct 6. Available from: <https://www.uicc.org/resources/tnm/publications-resources>. © 2017 UICC.
46. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*. 2017;151(1):193-203.
47. Sousa V, Santo JE, Silva M, Cabral T, Alarcão AM, Gomes A, et al. EGFR/erB-1, HER2/erB-2, CK7, LP34, Ki67 and P53 expression in preneoplastic lesions of bronchial epithelium: an immunohistochemical and genetic study. *Virchows Arch*. 2011 May;458(5):571–81.
48. Lee JJ, Liu D, Lee JS, Kurie JM, Khuri FR, Ibarguen H, et al. Long-Term Impact of Smoking on Lung Epithelial Proliferation in Current and Former Smokers. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2001 Jul 18;93(14):1081–8.
49. Massion PP, Taflan PM, Shyr Y, Rahman SMJ, Yildiz P, Shakthour B, et al. Early Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Lung Cancer Progression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Nov 15;170(10):1088–94.
50. Kohno H, Hiroshima K, Toyozaki T, Fujisawa T, Ohwada H. p53 Mutation and allelic loss of chromosome 3p, 9p of preneoplastic lesions in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 1999 Jan 15;85(2):341–7.
51. Boyle JO, Lonardo F, Chang JH, Klimstra D, Rusch V, Dmitrovsky E. Multiple high-grade bronchial dysplasia and squamous cell carcinoma: concordant and discordant mutations. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2001 Feb;7(2):259–66.
52. Lamy A, Sesboüé R, Bourguignon J, Dautréaux B, Métayer J, Frébourg T, et al. Aberrant methylation of the CDKN2a/p16 INK4a gene promoter region in preinvasive bronchial lesions: A prospective study in high-risk patients without invasive cancer.: CDKN2A Methylation in Premalignant Bronchi. *Int J Cancer*. 2002 Jul 10;100(2):189–93.

53. Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Lantuejoul S, Veyrenc S, Brambilla C. Alterations of Rb pathway (Rb-p16INK4-cyclin D1) in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1999 Feb;5(2):243–50.
54. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, et al. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5032–7.
55. Fontanini G, Calcinai A, Boldrini L, et al. Modulation of neoangiogenesis in bronchial preneoplastic lesions. *Oncol Rep.* 1999;6(4):813-817.
56. Merrick DT, Haney J, Petrunich S, Sugita M, Miller YE, Keith RL, et al. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its receptors in bronchial dysplasia demonstrated by quantitative RT-PCR analysis. *Lung Cancer.* 2005 Apr;48(1):31–45.
57. Mascaux C. COX-2 expression during early lung squamous cell carcinoma oncogenesis. *Eur Respir J.* 2005 Aug 1;26(2):198–203.
58. Cavarga I, Kocan P, Boor A, Belak J, Zak V, Kluchova Z, et al. Immunohistochemical markers of proliferation and vascularisation in preneoplastic bronchial lesions and invasive non-small cell lung cancer. *Neoplasma.* 2009;56(5):414–21.
59. Galateausalle F, Luna R, Horiba K, Sheppard M, Hayashi T, Fleming M, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in bronchial squamous preinvasive lesions. *Hum Pathol.* 2000 Mar;31(3):296–305.
60. Santos Romeo M, Sokolova IA, Morrison LE, Zeng C, Barón AE, Hirsch FR, et al. Chromosomal Abnormalities in Non-Small Cell Lung Carcinomas and in Bronchial Epithelia of High-Risk Smokers Detected by Multi-Target Interphase Fluorescence in Situ Hybridization. *J Mol Diagn.* 2003 May;5(2):103–12.
61. Hilbe W, Auberger J, Dirnhofer S, Schmid T, Erdel M, Duba HC. High rate of molecular alteration in histologically tumour-free bronchial epithelium of NSCLC patients detected by multicolour fluorescence in situ hybridisation. *Oncol Rep.* 2006;15(5):1233-1240.
62. Kang JU, Koo SH, Kwon KC, et al. High frequency of genetic alterations in non-small cell lung cancer detected by multi-target fluorescence in situ hybridization. *J Korean Med Sci.* 2007;22 Suppl(Suppl):S47-S51. doi:10.3346/jkms.2007.22.S.S47.

63. Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett.* 2006;239(1):1-9. doi:10.1016/j.canlet.2005.06.030.
64. Jamal-Hanjani M, Wilson GA, McGranahan N, et al. Tracking the Evolution of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;376(22):2109-2121. doi:10.1056/NEJMoa1616288.
65. Lv X, Mao Z, Sun X, Liu B. Intratumoral Heterogeneity in Lung Cancer. *Cancers (Basel).* 2023;15(10):2709. Published 2023 May 11. doi:10.3390/cancers15102709.
66. Altorki, N. K. et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 19,9–31 (2019).
67. Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, Heuckmann JM, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Science Translational Medicine.* 2010;2(62):62-93.
68. Guagnano V, Kauffmann A, Wöhrle S, Stamm C, Ito M, Barys L, et al. FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discovery.* 2012;2(12):1118-1133.
69. Ricordel C, Lespagnol A, Llamas-Gutierrez F, de Tayrac M, Kerjouan M, Fievet A, et al. Mutational landscape of DDR2 gene in lung squamous cell carcinoma using next-generation sequencing. *Clinical Lung Cancer.* 2018;19(2):163-169 e4.
70. Lee W, Jiang Z, Liu J, Haverty PM, Guan Y, Stinson J, et al. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature.* 2010 May;465(7297):473–7.
71. Govindan R, Ding L, Griffith M, Subramanian J, Dees ND, Kanchi KL, et al. Genomic Landscape of Non-Small Cell Lung Cancer in Smokers and Never-Smokers. *Cell.* 2012 Sep;150(6):1121–34.
72. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, Hernandez B, Pugh TJ, Hodis E, et al. Mapping the Hallmarks of Lung Adenocarcinoma with Massively Parallel Sequencing. *Cell.* 2012 Sep;150(6):1107–20.
73. Clinical Lung Cancer Genome Project (CLCGP); Network Genomic Medicine (NGM). A genomics-based classification of human lung tumors. *Sci Transl Med.* 2013;5(209):209ra153.

74. Liu L, Liu J, Shao D, Deng Q, Tang H, Liu Z, et al. Comprehensive genomic profiling of lung cancer using a validated panel to explore therapeutic targets in East Asian patients. *Cancer Sci.* 2017 Dec;108(12):2487–94.
75. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The Mutational Landscape of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Science.* 2011 Aug 26;333(6046):1157–60.
76. Heist RS, Sequist LV, Engelman JA. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol.* 2012;7(5):924-933.
77. Kim Y, Hammerman PS, Kim J, Yoon J ae, Lee Y, Sun JM, et al. Integrative and Comparative Genomic Analysis of Lung Squamous Cell Carcinomas in East Asian Patients. *J Clin Oncol.* 2014 Jan 10;32(2):121–8.
78. Paik PK, Hasanovic A, Wang L, Rekhtman N, Ladanyi M, Kris MG. Multiplex testing for driver mutations in squamous cell carcinomas of the lung. *J Clin Oncol.* 2012 May 20;30(15_suppl):7505–7505.
79. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 2012, 489, 519–525.
80. Larsen JE, Minna JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med.* 2011 Dec;32(4):703-40.
81. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(2):116-129.
82. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015;4(3):215-266.
83. Zhang Z, Stiegler AL, Boggon TJ, Kobayashi S, Halmos B. EGFR-mutated lung cancer: a paradigm of molecular oncology. *Oncotarget.* 2010;1(7):497-514.
84. López-Malpartida AV, Ludeña MD, Varela G, García Pichel J. Differential ErbB receptor expression and intracellular signaling activity in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Lung Cancer.* 2009;65(1):25-33.
85. Jimeno A, Hidalgo M. Pharmacogenomics of epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1766(2):217-229.
86. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):505-516.

87. Sibilila M, Steinbach JP, Stingl L, Aguzzi A, Wagner EF. A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor. *EMBO J.* 1998;17(3):719-731.
88. de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P, Baak JP. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. I: An inventory in search of autocrine and paracrine loops. *J Pathol.* 1998;184(1):44-52.
89. Wells A. Tumor invasion: role of growth factor-induced cell motility. *Adv Cancer Res.* 2000; 78:31-101.
90. Gibson EM, Henson ES, Haney N, Villanueva J, Gibson SB. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release. *Cancer Res.* 2002;62(2):488-496.
91. Heist RS, Sequist LV, Engelman JA. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol.* 2012;7(5):924-933.
92. Imyanitov EN, Demidova IA, Gordiev MG, et al. Distribution of EGFR Mutations in 10,607 Russian Patients with Lung Cancer. *Mol Diagn Ther.* 2016;20(4):401-406.
93. Arafeh R, Samuels Y. PIK3CA in cancer: The past 30 years. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:36-49.
94. Murugan AK, Munirajan AK, Tsuchida N. Genetic deregulation of the PIK3CA oncogene in oral cancer. *Cancer Lett.* 2013;338(2):193-203.
95. Zhao L, Vogt PK. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene.* 2008;27(41):5486-5496.
96. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(2):140-156.
97. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 2010;141(7):1117-1134.
98. Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell.* 2018;173(2):321-337.e10.
99. Burris HA 3rd. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(4):829-842.
100. Sharpless NE. INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus. *Mutat Res.* 2005;576(1-2):22-38.

101. Zhao R, Choi BY, Lee MH, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer. *EBioMedicine*. 2016;8:30-39.
102. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995;81(3):323-330.
103. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366(6456):704-707.
104. Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999;18(45):6145-6157.
105. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(10):795-803.
106. Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362(6423):841-844.
107. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2335-2342.
108. Sandler AB, Schiller JH, Gray R, et al. Retrospective evaluation of the clinical and radiographic risk factors associated with severe pulmonary hemorrhage in first-line advanced, unresectable non-small-cell lung cancer treated with Carboplatin and Paclitaxel plus bevacizumab [published correction appears in *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3410]. *J Clin Oncol*. 2009;27(9):1405-1412.
109. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(11):2184-2191.
110. Larkins E, Scepura B, Blumenthal GM, et al. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Ramucirumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Following Disease Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *Oncologist*. 2015;20(11):1320-1325.

111. Farrell B, Breeze AL. Structure, activation and dysregulation of fibroblast growth factor receptor kinases: perspectives for clinical targeting. *Biochem Soc Trans.* 2018;46(6):1753-1770.
112. Dai S, Zhou Z, Chen Z, Xu G, Chen Y. Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs): Structures and Small Molecule Inhibitors. *Cells.* 2019;8(6):614. Published 2019 Jun 18.
113. Wiedemann M, Trueb B. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics.* 2000;69(2):275-279.
114. Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC. Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov.* 2013;3(3):264-279.
115. Fiala O, Pesek M, Finek J, Benesova L, Bortlicek Z, Minarik M. Gene mutations in squamous cell NSCLC: insignificance of EGFR, KRAS and PIK3CA mutations in prediction of EGFR-TKI treatment efficacy. *Anticancer Res.* 2013;33(4):1705-1711.
116. Schubert M, Klinger B, Klünemann M, et al. Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression. *Nat Commun.* 2018;9(1):20. Published 2018 Jan 2.
117. Huang C, Chen L, Savage SR, et al. Proteogenomic insights into the biology and treatment of HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Cell.* 2021;39(3):361-379.e16.
118. Yamamoto M, Kensler TW, Motohashi H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev.* 2018;98(3):1169-1203.
119. Cloer EW, Goldfarb D, Schrank TP, Weissman BE, Major MB. NRF2 Activation in Cancer: From DNA to Protein. *Cancer Res.* 2019;79(5):889-898.
120. Pillai R, Hayashi M, Zavitsanou AM, Papagiannakopoulos T. NRF2: KEAPing Tumors Protected. *Cancer Discov.* 2022;12(3):625-643.
121. Imielinski M, Berger AH, Hammerman PS, et al. Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell.* 2012;150(6):1107-1120.
122. Binkley MS, Jeon YJ, Nesselbush M, et al. KEAP1/NFE2L2 Mutations Predict Lung Cancer Radiation Resistance That Can Be Targeted by Glutaminase Inhibition. *Cancer Discov.* 2020;10(12):1826-1841.

123. Solis LM, Behrens C, Dong W, et al. Nrf2 and Keap1 abnormalities in non-small cell lung carcinoma and association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res.* 2010;16(14):3743-3753.
124. Isla D, Lozano MD, Paz-Ares L, et al. New update to the guidelines on testing predictive biomarkers in non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology [published online ahead of print, 2022 Dec 26] [published correction appears in *Clin Transl Oncol.* 2023 Feb 8;]. *Clin Transl Oncol.* 2022;10.1007/s12094-022-03046-9.
125. Johnson DB, Rieth MJ, Horn L. Immune checkpoint inhibitors in NSCLC. *Curr Treat Options Oncol.* 2014;15(4):658-669.
126. Guo T, Zou L, Ni J, Chu X, Zhu Z. Radiotherapy for unresectable locally advanced non-small cell lung cancer: a narrative review of the current landscape and future prospects in the era of immunotherapy. *Transl Lung Cancer Res.* 2020 Oct;9(5):2097-2112.
127. Gridelli C, Ardizzoni A, Douillard JY, Hanna N, Manegold C, Perrone F, Pirker R, Rosell R, Shepherd FA, De Petris L, Di Maio M, de Marinis F. Recent issues in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: Results of an International Expert Panel Meeting of the Italian Association of Thoracic Oncology. *Lung Cancer.* 2010 Jun;68(3):319-31.
128. Ramalingam S, Belani C. Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist* 2008;13 Suppl 1:5-13.
129. Masters GA, Temin S, Azzoli CG, et al. Systemic Therapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol* 2015;33:3488-515.
130. Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 2001;19:3210-8.
131. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:4285-91.

132. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002;346:92-8.
133. Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, et al. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J Clin Oncol* 2003;21:3016-24.
134. Pisters KM, Evans WK, Azzoli CG, et al. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline. *J Clin Oncol* 2007;25:5506-18.
135. Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, et al. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:234S-242S
136. Amini A, Yeh N, Gaspar LE, et al. Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung cancer patients previously treated with conventional radiotherapy: a review. *Radiat Oncol* 2014;9:210.
137. Lagerwaard FJ, Versteegen NE, Haasbeek CJ, et al. Outcomes of stereotactic ablative radiotherapy in patients with potentially operable stage I non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83:348-53.
138. Pennycuik A, Teixeira VH, AbdulJabbar K, et al. Immune Surveillance in Clinical Regression of Preinvasive Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(10):1489-1499.
139. Mascaux C, Angelova M, Vasaturo A, et al. Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis. *Nature.* 2019;571(7766):570-575.
140. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(1):9-31.
141. Kargl J, Busch SE, Yang GH, et al. Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer. *Nat Commun.* 2017;8:14381. Published 2017 Feb 1.
142. Ruiz EJ, Diefenbacher ME, Nelson JK, et al. LUBAC determines chemotherapy resistance in squamous cell lung cancer. *J Exp Med.* 2019;216(2):450-465.

143. Xu C, Fillmore CM, Koyama S, et al. Loss of Lkb1 and Pten leads to lung squamous cell carcinoma with elevated PD-L1 expression. *Cancer Cell*. 2014;25(5):590-604.
144. Mollaoglu G, Jones A, Wait SJ, et al. The Lineage-Defining Transcription Factors SOX2 and NKX2-1 Determine Lung Cancer Cell Fate and Shape the Tumor Immune Microenvironment. *Immunity*. 2018;49(4):764-779.e9.
145. Ferone G, Song JY, Sutherland KD, et al. SOX2 Is the Determining Oncogenic Switch in Promoting Lung Squamous Cell Carcinoma from Different Cells of Origin. *Cancer Cell*. 2016;30(4):519-532.
146. Onoi K, Chihara Y, Uchino J, et al. Immune Checkpoint Inhibitors for Lung Cancer Treatment: A Review. *J Clin Med*. 2020;9(5):1362. Published 2020 May 6.
147. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. 2013;39:1-10.
148. Qu J, Mei Q, Chen L, et al. Chimeric antigen receptor (CAR)-T-cell therapy in non-small-cell lung cancer (NSCLC): current status and future perspectives. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70:619-631.
149. Johnson DB, Sullivan RJ, Menzies AM. Immune checkpoint inhibitors in challenging populations. *Cancer*. 2017;123:1904-1911.
150. Wang DY, Salem JE, Cohen JV, et al. Fatal toxic effects associated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2018;4:1721-1728.
151. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2018-2028.
152. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61:4766-72.
153. Derman BA, Mileham KF, Bonomi PD, Batus M, Fidler MJ. Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the lung: a review. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(5):524-532.
154. Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002;168:4272-6.

155. Li ZB, Chen DD, He QJ, Li L, Zhou G, Fu YM, et al. The LAC score indicates significant fibrosis in patients with chronic drug-induced liver injury: a large biopsy-based study. *Front Pharmacol*. 2021;12:734090.
156. Jiang T, Wang P, Zhang J, Zhao Y, Zhou J, Fan Y, et al. Toripalimab plus chemotherapy as second-line treatment in previously EGFR-TKI treated patients with EGFR-mutant-advanced NSCLC: a multicenter phase-II trial. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):355.
157. Li W, Liu JB, Hou LK, et al. Liquid biopsy in lung cancer: significance in diagnostics, prediction, and treatment monitoring. *Mol Cancer*. 2022;21(1):25. Published 2022 Jan 20.
158. Mok T.S.; Wu Y.L.; Ahn M.J.; Garassino M.C.; Kim H.R.; Ramalingam S.S. Osimertinib or platinum–pemetrexed in EGFR T790M–positive lung cancer. *N Engl J Med* 2017, 376:629–640.
159. Lababede O, Meziane MA. The Eighth Edition of TNM Staging of Lung Cancer: Reference Chart and Diagrams. *Oncologist*. 2018;23(7):844-848. doi:10.1634/theoncologist.2017-065.
160. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W199-W205. doi:10.1093/nar/gkz401.
161. Kovács SA, Fekete JT, Gyórfy B. Predictive biomarkers of immunotherapy response with pharmacological applications in solid tumors [published online ahead of print, 2023 Apr 13]. *Acta Pharmacol Sin*. 2023;10.1038/s41401-023-01079-6. doi:10.1038/s41401-023-01079-6.
162. Gyórfy B, Surowiak P, Budczies J, Lánczky A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer [published correction appears in *PLoS One*. 2014;9(10):e111842]. *PLoS One*. 2013;8(12):e82241. Published 2013 Dec 18. doi:10.1371/journal.pone.0082241.
163. Restrepo JC, Dueñas D, Corredor Z, Liscano Y. Advances in Genomic Data and Biomarkers: Revolutionizing NSCLC Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2023;15(13):3474. Published 2023 Jul 3. doi:10.3390/cancers15133474.

164. Boelens, M.C.; Kok, K.; van der Vlies, P.; van der Vries, G.; Sietsma, H.; Timens, W.; Postma, D.S.; Groen, H.J.; Berg, A.V.D. Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis. *Lung Cancer* 2009, 66, 372–378.
165. Rotolo, F.; Zhu, C.-Q.; Brambilla, E.; Graziano, S.L.; Olaussen, K.; Le-Chevalier, T.; Pignon, J.-P.; Robert Kratzke, R.; Soria, J.-C.; Shepherd, F.A.; et al. Genome-wide copy number analyses of samples from LACE-Bio project identify novel prognostic and predictive markers in early stage non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 2018, 7, 416–427.
166. Guo Y, Song J, Wang Y, et al. Concurrent Genetic Alterations and Other Biomarkers Predict Treatment Efficacy of EGFR-TKIs in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: A Review. *Front Oncol.* 2020;10:610923. Published 2020 Dec 10. doi:10.3389/fonc.2020.610923.
167. Fiala O, Pesek M, Finek J, et al. Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification in Patients with Advanced-stage NSCLC. *Anticancer Res.* 2016;36(1):455-460.
168. Kang, J.U.; Koo, S.H.; Kwon, K.C.; Park, J.W.; Kim, J.M. Gain at chromosomal region 5p15.33, containing TERT, is the most frequent genetic event in early stages of non-small cell lung cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008, 182, 1–11.
169. Hirsch, F.R.; Varella-Garcia, M.; Bunn, P.A., Jr.; Di Maria, M.V.; Veve, R.; Bremnes, R.M.; Barón, A.E.; Zeng, C.; Franklin, W.A. Epidermal Growth Factor Receptor in Non–Small-Cell Lung Carcinomas: Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis. *J. Clin. Oncol.* 2003, 21, 3798–3807.
170. Dacic, S.; Flanagan, M.; Cieply, K.; Ramalingam, S.; Luketich, J.; Belani, C.; Yousem, S.A. Significance of EGFR Protein Expression and Gene Amplification in Non–Small Cell Lung Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2006, 25, 860–865.
171. The AACR Project GENIE Consortium; André, F.; Arnedos, M.; Baras, A.S.; Baselga, J. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov.* 2017, 7, 818–831.
172. Tuna, M.; Amos, C.I.; Mills, G.B. Whole-chromosome arm acquired uniparental disomy in cancer development is a consequence of isochromosome formation. *Neoplasia* 2022, 25, 9–17.

173. Sasaki, H.; Shitara, M.; Yokota, K.; Hikosaka, Y.; Moriyama, S.; Yano, M.; Fujii, Y. Increased FGFR1 copy number in lung squamous cell carcinomas. *Mol. Med. Rep.* 2011, 5, 725–728. *Cancers* 2022, 14, 2174 15 of 15.
174. Lee, E.; Moon, J.W.; Wang, X.; Kim, C.; Li, S.; Shin, B.K.; Jung, W.; Kim, H.K.; Kim, H.K.; Lee, J.-Y. Genomic Copy Number Signatures Uncovered a Genetically Distinct Group from Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma in Non–Small Cell Lung Cancer. *Hum. Pathol.* 2015, 46, 1111–1120.
175. Craddock, K.J.; Lam, W.L.; Tsao, M.-S. Applications of Array-CGH for Lung Cancer. *Methods Pharmacol. Toxicol.* 2013, 973, 297–324.
176. Savic S, Bubendorf L. Role of fluorescence in situ hybridization in lung cancer cytology. *Acta Cytol.* 2012;56(6):611-621.
177. Pecciarini L, Brunetto E, Grassini G, De Pascali V, Ogliari FR, Talarico A, Marra G, Magliacane G, Redegalli M, Arrigoni G, et al. Gene Fusion Detection in NSCLC Routine Clinical Practice: Targeted-NGS or FISH?. *Cells.* 2023; 12(8):1135. <https://doi.org/10.3390/cells12081135>.
178. Peng D, Liang P, Zhong C, et al. Effect of EGFR amplification on the prognosis of EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer patients: a prospective observational study. *BMC Cancer.* 2022;22(1):1323. Published 2022 Dec 17. doi:10.1186/s12885-022-10390-0.
179. Jiang, D.; Li, X.; Wang, H.; Shi, Y.; Xu, C.; Lu, S.; Huang, J.; Xu, Y.; Zeng, H.; Su, J.; et al. The prognostic value of EGFR overexpression and amplification in Esophageal squamous cell Carcinoma. *BMC Cancer* 2015, 15, 377.
180. Lida K, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Ishikawa M, Katagiri A, et al. EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target. *Br J Cancer.* 2011; 105: 420-7.
181. Chien, H.-T.; Cheng, S.-D.; Liao, C.-T.; Wang, H.-M.; Huang, S.-F. Amplification of the EGFR and CCND1 Are Coordinated and Play Important Roles in the Progression of Oral Squamous Cell Carcinomas. *Cancers* 2019, 11, 760.
182. Yang H, Wen L, Zhao C, et al. EGFR amplification is a putative resistance mechanism for NSCLC-LM patients with TKI therapy and is associated with poor

outcome. *Front Oncol.* 2022;12:902664. Published 2022 Aug 1. doi:10.3389/fonc.2022.902664.

183. Chen, S.; Gao, C.; Du, Q.; Tang, L.; You, H.; Dong, Y. A prognostic model for elderly patients with squamous non-small cell lung cancer: A population-based study. *J. Transl. Med.* 2020, 18, 436.

184. Tas, F.; Ciftci, R.; Kilic, L.; Karabulut, S. Age is a prognostic factor affecting survival in lung cancer patients. *Oncol. Lett.* 2013, 6, 1507–1513.

185. Sealy R, Lagakos S, Barkley T, et al. Radiotherapy of regional epidermoid carcinoma of the lung: a study in fractionation. *Cancer.* 1982;49(7):1338-1345.

186. Bozhok AA, Semiglazov VF, Semiglazov V V., Arzumanov AS, Kletsel AE. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Vopr Onkol.* 2005;51(4):434-443.

187. McWilliam, A.; Osorio, E.V.; Faivre-Finn, C.; van Herk, M. Influence of tumour laterality on patient survival in non-small cell lung cancer after radiotherapy. *Radiother. Oncol.* 2019, 137, 71–76.

188. Farrugia MK, Ma SJ, Fung-Kee-Fung S, Suescun JAG, Singh AK. Laterality of Tumor in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer Influences Worsened Survival Associated with Concurrent B-Blocker Use in Patients Managed with Stereotactic Body Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol.* 2020 Nov 1;108(3):e143–4.

189. Jørgensen N, Meline EL, Jeppesen SS, Hansen O, Nielsen M, Schytte T. The effect of tumor laterality on survival for non-small cell lung cancer patients treated with radiotherapy. *Acta Oncol.* 2019;58(10):1393-1398.

190. Dahabreh, I.J.; Linardou, H.; Kosmidis, P.; Bafaloukos, D.; Murray, S. EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: A systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2011, 22, 545–552.

191. Wang F, Fu S, Shao Q, et al. High EGFR copy number predicts benefits from tyrosine kinase inhibitor treatment for non-small cell lung cancer patients with wild-type EGFR. *J Transl Med.* 2013;11:90.

192. Hirsch, F.R.; Herbst, R.S.; Olsen, C.; Chansky, K.; Crowley, J.; Kelly, K.; Gandara, D.R. Increased EGFR Gene Copy Number Detected by Fluorescent In Situ Hybridization Predicts Outcome in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated with Cetuximab and Chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 3351–3357.

193. Shan L, Wang Z, Guo L, et al. Concurrence of EGFR amplification and sensitizing mutations indicate a better survival benefit from EGFR-TKI therapy in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*. 2015;89(3):337-342.
194. Herbst RS, Ansari R, Bustin F, et al. Efficacy of bevacizumab plus erlotinib versus erlotinib alone in advanced non-small-cell lung cancer after failure of standard first-line chemotherapy (BeTa): a double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2011;377(9780):1846-1854.
195. Zhu, C.-Q.; da Cunha Santos, G.; Ding, K.; Sakurada, A.; Cutz, J.-C.; Liu, N.; Tsao, M.S. Role of KRAS and EGFR As Biomarkers of Response to Erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J. Clin. Oncol*. 2008, 26, 4268–4275.
196. Hirsch, F.R.; Varella-Garcia, M.; Bunn, P.A.; Franklin, W.A.; Dziadziuszko, R.; Thatcher, N.; Chang, A.; Parikh, P.; Pereira, J.R.; Ciuleanu, T.E.; et al. Molecular Predictors of Outcome with Gefitinib in a Phase III Placebo-Controlled Study in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *J. Clin. Oncol*. 2006, 24, 5034–5042.
197. Zhang, X.; Zhang, Y.; Tang, H.; He, J. EGFR gene copy number as a predictive/biomarker for patients with non-small-cell lung cancer receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: A systematic review and meta-analysis. *J. Investig. Med*. 2016, 65, 72–81.
198. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(2):123-132.
199. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC, et al. Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome [published correction appears in *N Engl J Med*. 2006 Oct 19;355(16):1746]. *N Engl J Med*. 2005;353(2):133-144.
200. Park, J.S.; Kim, H.S.; Bae, Y.S.; Cheong, J.-H.; Rha, S.Y.; Noh, S.H.; Kim, H. Prognostic significance and frequency of EGFR expression and amplification in surgically resected advanced gastric cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol*. 2016, 46, 507–516.
201. Bunker ML, Raab SS, Landreneau RJ, et al. The diagnosis and significance of visceral pleura invasion in lung carcinoma: histologic predictors and the role of elastic stains. *Am J Clin Pathol*. 1999;112(6):777-783.

202. Shimizu K, Yoshida J, Nagai K, et al. Visceral pleural invasion classification in non-small cell lung cancer: a proposal on the basis of outcome assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127(6):1574-1578. 4. Maeyashiki T, Suzuki K.
203. Travis WD, Brambilla E, Rami-Porta R, et al. Visceral pleural invasion: pathologic criteria and use of elastic stains: proposal for the 7th edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008;3(12):1384-1390.
204. Osaki T, Nagashima A, Yoshimatsu T, Yamada S, Yasumoto K. Visceral pleural involvement in nonsmall cell lung cancer: prognostic significance. *Ann Thorac Surg.* 2004;77(5):1769-1773. doi:10.1016/j.athoracsur.2003.10.058
205. Shimizu, K.; Yoshida, J.; Nagai, K.; Nishimura, M.; Ishii, G.; Morishita, Y.; Nishiwaki, Y. Visceral pleural invasion is an invasive and aggressive indicator of non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2005, 130, 160–165.
206. Wang, T.; Zhou, C.; Zhou, Q. Extent of Visceral Pleural Invasion Affects Prognosis of Resected Non-small Cell Lung Cancer: A meta-analysis. *Sci. Rep.* 2017, 7, 1527.
207. Huang H, Wang T, Hu B, Pan C. Visceral pleural invasion remains a size-independent prognostic factor in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2015;99(4):1130-1139.
208. Friedlaender, A.; Banna, G.; Malapelle, U.; Pisapia, P.; Addeo, A. Next Generation Sequencing and Genetic Alterations in Squamous Cell Lung Carcinoma: Where Are We Today? *Front. Oncol.* 2019, 9, 166.
209. Chinchilla-Tábor LM, Sayagués JM, González-Morais I, Rodríguez M, Ludeña MD. Prognostic Impact of EGFR Amplification and Visceral Pleural Invasion in Early Stage Pulmonary Squamous Cell Carcinomas Patients after Surgical Resection of Primary Tumor. *Cancers (Basel).* 2022;14(9):2174. Published 2022 Apr 27. doi:10.3390/cancers14092174.
210. Stapelfeld, C.; Dammann, C.; Maser, E. Sex-specificity in lung cancer risk. *Int. J. Cancer* 2020, 146, 2376–2382.
211. Pesch, B.; Kendzia, B.; Gustavsson, P.; Jöckel, K.-H.; Johnen, G.; Pohlabein, H.; Olsson, A.; Ahrens, W.; Gross, I.M.; Brüske, I.; et al. Cigarette smoking and lung cancer-relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int. J. Cancer* 2012, 131, 1210–1219.

212. Forde PM, Spicer J, Lu S, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(21):1973-1985. doi:10.1056/NEJMoa2202170.
213. Casarrubios M, Provencio M, Nadal E, et al. Tumor microenvironment gene expression profiles associated to complete pathological response and disease progression in resectable NSCLC patients treated with neoadjuvant chemoimmunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2022;10(9):e005320. doi:10.1136/jitc-2022-005320.
214. Mino-Kenudson M, Schalper K, Cooper W, et al. Predictive Biomarkers for Immunotherapy in Lung Cancer: Perspective From the International Association for the Study of Lung Cancer Pathology Committee. *J Thorac Oncol.* 2022;17(12):1335-1354. doi:10.1016/j.jtho.2022.09.109.
215. Sun D, Liu J, Zhou H, et al. Classification of Tumor Immune Microenvironment According to Programmed Death-Ligand 1 Expression and Immune Infiltration Predicts Response to Immunotherapy Plus Chemotherapy in Advanced Patients With NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2023;18(7):869-881. doi:10.1016/j.jtho.2023.03.012.
216. Rodríguez-Cid JR, Chards SC, González-Espinoza IR, et al. A comparative study of immunotherapy as second-line treatment and beyond in patients with advanced non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer Manag.* 2021;10(3):LMT47. Published 2021 Mar 11. doi:10.2217/lmt-2020-0027.
217. Auclin E, Benitez-Montanez J, Tagliamento M, et al. Second-line treatment outcomes after progression from first-line chemotherapy plus immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2023;178:116-122. doi:10.1016/j.lungcan.2023.02.002.
218. Starr P. Nivolumab Beats Docetaxel as Second-Line Therapy for Patients with NSCLC. *Am Health Drug Benefits.* 2015;8(Spec Issue):1-18.
219. Moliner L, Spurgeon L, Califano R. Controversies in NSCLC: which second-line strategy after chemo-immunotherapy?. *ESMO Open.* 2023;8(2):100879. doi:10.1016/j.esmoop.2023.100879.
220. Provencio M, Serna-Blasco R, Nadal E, et al. Overall Survival and Biomarker Analysis of Neoadjuvant Nivolumab Plus Chemotherapy in Operable Stage IIIA Non-Small-Cell Lung Cancer (NADIM phase II trial) [published correction appears in *J Clin*

- Oncol. 2022 Nov 10;40(32):3785]. *J Clin Oncol.* 2022;40(25):2924-2933. doi:10.1200/JCO.21.02660.
221. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial [published correction appears in *Lancet Oncol.* 2021 Mar;22(3):e92]. *Lancet Oncol.* 2021;22(2):198-211. doi:10.1016/S1470-2045(20)30641-0.
222. Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, et al. Updated Analysis From KEYNOTE-189: Pembrolizumab or Placebo Plus Pemetrexed and Platinum for Previously Untreated Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2020;38(14):1505-1517. doi:10.1200/JCO.19.03136.
223. Rothschild SI, Zippelius A, Eboulet EI, et al. SAKK 16/14: Durvalumab in Addition to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients With Stage IIIA(N2) Non-Small-Cell Lung Cancer-A Multicenter Single-Arm Phase II Trial. *J Clin Oncol.* 2021;39(26):2872-2880. doi:10.1200/JCO.21.00276.
224. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol.* 2018;13(9):1302-1311. doi:10.1016/j.jtho.2018.05.013.
225. Liberini V, Mariniello A, Righi L, et al. NSCLC Biomarkers to Predict Response to Immunotherapy with Checkpoint Inhibitors (ICI): From the Cells to In Vivo Images. *Cancers (Basel).* 2021;13(18):4543. Published 2021 Sep 10. doi:10.3390/cancers13184543.
226. Castle JC, Uduman M, Pabla S, Stein RB, Buell JS. Mutation-Derived Neoantigens for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2019;10:1856. Published 2019 Aug 7. doi:10.3389/fimmu.2019.01856.
227. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69-74. doi:10.1126/science.aaa4971.
228. Pan Y, Fu Y, Zeng Y, et al. The key to immunotherapy: how to choose better therapeutic biomarkers for patients with non-small cell lung cancer. *Biomark Res.* 2022;10(1):9. Published 2022 Mar 7. doi:10.1186/s40364-022-00355-7.

229. Teixido C, Reguart N. Using biomarkers to determine optimal combinations with immunotherapy (biomarker discovery perspective). *Future Oncol.* 2020;16(23):1677-1681. doi:10.2217/fon-2020-0171.
230. Casarrubios M, Provencio M, Nadal E, et al. Tumor microenvironment gene expression profiles associated to complete pathological response and disease progression in resectable NSCLC patients treated with neoadjuvant chemoimmunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2022;10(9):e005320. doi:10.1136/jitc-2022-005320.
231. Ayers M, Luceford J, Nebozhyn M, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 2017;127(8):2930-2940. doi:10.1172/JCI91190.
232. Eltahir M, Isaksson J, Mattsson JSM, et al. Plasma Proteomic Analysis in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with PD-1/PD-L1 Blockade. *Cancers (Basel).* 2021;13(13):3116. Published 2021 Jun 22. doi:10.3390/cancers13133116.
233. Reschke R, Yu J, Flood B, Higgs EF, Hatogai K, Gajewski TF. Immune cell and tumor cell-derived CXCL10 is indicative of immunotherapy response in metastatic melanoma [published correction appears in *J Immunother Cancer.* 2021 Oct;9(10):]. *J Immunother Cancer.* 2021;9(9):e003521. doi:10.1136/jitc-2021-003521.
234. Lee KS, Chung WY, Park JE, et al. Interferon- γ -Inducible Chemokines as Prognostic Markers for Lung Cancer. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(17):9345. Published 2021 Sep 4. doi:10.3390/ijerph18179345.
235. Karin N. CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond. *Front Immunol.* 2020;11:976. Published 2020 May 29. doi:10.3389/fimmu.2020.00976.
236. Tokunaga R, Zhang W, Naseem M, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treat Rev.* 2018;63:40-47. doi:10.1016/j.ctrv.2017.11.007.
237. Li Y, Han S, Wu B, et al. CXCL11 Correlates with Immune Infiltration and Impacts Patient Immunotherapy Efficacy: A Pan-Cancer Analysis. *Front Immunol.* 2022;13:951247. Published 2022 Jul 22. doi:10.3389/fimmu.2022.951247.
238. Monteagudo C, Pellín-Carcelén A, Martín JM, Ramos D. Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma [Role of chemokines in melanoma progression]. *Actas Dermosifiliogr.* 2011;102(7):498-504. doi:10.1016/j.ad.2011.03.004.

239. Darash-Yahana M, Gillespie JW, Hewitt SM, et al. The chemokine CXCL16 and its receptor, CXCR6, as markers and promoters of inflammation-associated cancers. *PLoS One*. 2009;4(8):e6695. Published 2009 Aug 19. doi:10.1371/journal.pone.0006695.
240. Di Pilato M, Kfuri-Rubens R, Pruessmann JN, et al. CXCR6 positions cytotoxic T cells to receive critical survival signals in the tumor microenvironment. *Cell*. 2021;184(17):4512-4530.e22. doi:10.1016/j.cell.2021.07.015.
241. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy [published correction appears in *Science*. 2019 Mar 1;363(6430):]. *Science*. 2018;362(6411):eaar3593. doi:10.1126/science.aar3593.
242. Wang J, Gu X, Cao L, et al. A novel prognostic biomarker CD3G that correlates with the tumor microenvironment in cervical cancer. *Front Oncol*. 2022;12:979226. Published 2022 Sep 13. doi:10.3389/fonc.2022.979226.
243. Zheng Z, Guo Y, Huang X, et al. CD8A as a Prognostic and Immunotherapy Predictive Biomarker Can Be Evaluated by MRI Radiomics Features in Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19):4866. Published 2022 Oct 5. doi:10.3390/cancers14194866.
244. Lavergne M, Hernández-Castañeda MA, Mantel PY, Martinvalet D, Walch M. Oxidative and Non-Oxidative Antimicrobial Activities of the Granzymes. *Front Immunol*. 2021;12:750512. Published 2021 Oct 11. doi:10.3389/fimmu.2021.750512.
245. Zhu P, Martinvalet D, Chowdhury D, Zhang D, Schlesinger A, Lieberman J. The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood*. 2009;114(6):1205-1216. doi:10.1182/blood-2008-12-195768.
246. Inoue H, Park JH, Kiyotani K, et al. Intratumoral expression levels of PD-L1, GZMA, and HLA-A along with oligoclonal T cell expansion associate with response to nivolumab in metastatic melanoma. *Oncoimmunology*. 2016;5(9):e1204507. Published 2016 Jun 30. doi:10.1080/2162402X.2016.1204507.
247. Pereira C, Gimenez-Xavier P, Pros E, et al. Genomic Profiling of Patient-Derived Xenografts for Lung Cancer Identifies B2M Inactivation Impairing Immunorecognition. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):3203-3213. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1946.

248. Zhao Y, Cao Y, Chen Y, et al. B2M gene expression shapes the immune landscape of lung adenocarcinoma and determines the response to immunotherapy. *Immunology*. 2021;164(3):507-523. doi:10.1111/imm.13384.

8. ANEXOS

8.1 Artículo científico publicado como producto de este trabajo de investigación.

Enlace URL: <https://www.mdpi.com/1606380>

DOI: [10.3390/cancers14092174](https://doi.org/10.3390/cancers14092174)

PMID: 35565304

Cita bibliográfica:

Chinchilla-Tábora LM, Sayagués JM, González-Morais I, Rodríguez M, Ludeña MD. Prognostic Impact of *EGFR* Amplification and Visceral Pleural Invasion in Early Stage Pulmonary Squamous Cell Carcinomas Patients after Surgical Resection of Primary Tumor. *Cancers (Basel)*. 2022;14(9):2174. Published 2022 Apr 27. doi:10.3390/cancers14092174

8.2 Premios al presente trabajo de investigación.

Premio: “Asociación Española Contra el Cáncer de Salamanca Real Academia de Medicina de Salamanca 2022”

