



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

**OPTIMIZACION DE LA ESTADIFICACION MEDIASTINICA Y DEL  
ANALISIS MOLECULAR EN EL CANCER DE PULMON NO CELULA  
PEQUEÑA MEDIANTE PUNCION-ASPIRACION GUIADA POR  
ECOBRONCOSCOPIA SECTORIAL**

CARMEN ANGELA CENTENO CLEMENTE

# **TESIS DOCTORAL**

## **OPTIMIZACION DE LA ESTADIFICACION MEDIASTINICA Y DEL ANALISIS MOLECULAR EN EL CANCER DE PULMON NO CELULA PEQUEÑA MEDIANTE PUNCION-ASPIRACION GUIADA POR ECOBRONCOSCOPIA SECTORIAL**

CARMEN ANGELA CENTENO CLEMENTE

Director: Felipe Andreo García

Tutor: Cristina Tural Llàcher

Juan Ruiz Manzano\* (hasta 27/02/2020)

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Año 2020





Universitat Autònoma de Barcelona

Los doctores **Cristina Tural Llàcher** y **Felipe Andreo García** informan que la tesis doctoral titulada “OPTIMIZACION DE LA ESTADIFICACION MEDIASTINICA Y DEL ANALISIS MOLECULAR EN EL CANCER DE PULMON NO CELULA PEQUEÑA MEDIANTE PUNCION-ASPIRACION GUIADA POR ECOBRONCOSCOPIA SECTORIAL”, presentada por la doctoranda CARMEN ANGELA CENTENO CLEMENTE, realizada bajo su tutoría y dirección respectivamente, cumple con las exigencias metodológicas y científicas para su defensa.

-----  
CRISTINA TURAL LLÀCHER

-----  
FELIPE ANDREO GARCIA

Badalona, junio del 2020



A mi madre, por ser mi fuente de inspiración.  
A mi padre, por enseñarme a caminar en la vida.  
A Omar, por su apoyo incondicional en este camino.

*“Lo único imposible es aquello que no intentas”.*  
(Autor desconocido).



## ABREVIATURAS

ACCP: American College of Chest Physicians

ALK: del inglés “*Anaplastic lymphoma kinase*”

ATS: American Thoracic Society

BRAF: del inglés “*V-Raf murine sarcoma oncogene homolog B1*”

CP: Cáncer de pulmón

CPCP: Cáncer de pulmón célula pequeña

CPNCP: Cáncer pulmonar no célula pequeña

CK: citoqueratina

DGS: Disección ganglionar sistemática

EBUS: del inglés “*endobronchial ultrasound*”

EGFR: del inglés “*epidermal growth factor receptor*”

ELM4: del inglés “*Echinoderm microtubule-associated protein- like 4*”

ESMO: European Society of Medical Oncology

ERS: European Respiratory Society

EUS: del inglés “*endoscopic ultrasound*”

FDG: 18F-fluorodesoxiglucosa

FISH: hibridación in situ fluorescente

GTPasa: guanosina trifosfatasa

H-E: hematoxilina-eosina

HER2: del inglés “*human epidermal growth factor 2*”

HGFR: del inglés “*hepatocyte growth factor*”

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer

IHQ: Inmunohistoquímica

KRAS: del inglés “*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*”

MAPK: del inglés “*Mitogen-activated protein kinases*”

MET: del inglés “*proto-oncogene receptor tyrosine kinase*”

NGS: del inglés “*next generation sequencing*”

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAAF-EUS-B: punción aspiración con aguja fina guiada por ultrasonografía endoscópica con ecobroncoscopio

PATB-EBUS: punción aspiración transbronquial guiada por ecobroncoscopia

PD-L1: del inglés *“programmed cell death protein 1”*

PET-TC: Tomografía por emisión de positrones - tomografía computarizada

PS: del inglés *“performance status”*

RM: Resonancia magnética

ROS 1: del inglés *“proto-oncogene 1”*

ROSE: del inglés *“rapid on-site evaluation”*

SUV: del inglés *“standardised uptake value”*

TAC: Tomografía axial computarizada

TK: Tirosina quinasa

TKi: inhibidor tirosina quinasa

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo 1

TEMLA: Linfanectomía mediastínica extendida vía transcervical

VAMLA: Linfadenectomía mediastínica video asistida

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo



## INDICE

<b>PRESENTACIÓN</b> .....	13
<b>RESUMEN</b> .....	14
<b>SUMMARY</b> .....	15
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	17
1. El cáncer de pulmón.....	18
1.1. Clasificación .....	18
1.2. Evaluación inicial.....	22
1.3. Métodos diagnósticos.....	23
1.4. Diagnóstico anatomopatológico.....	26
1.5. Biomarcadores predictivos .....	26
2. Estadificación del cáncer de pulmón.....	31
2.1. Estadificación ganglionar.....	33
2.1.1. Técnicas no quirúrgicas.....	35
2.1.2. Técnicas quirúrgicas.....	36
3. Ecobroncoscopia sectorial.....	37
3.1. Generalidades.....	37
3.2. Indicaciones.....	39
3.3. Utilidad en la estadificación del cáncer de pulmón.....	40
3.4. Utilidad en el estudio molecular del cáncer de pulmón.....	42

<b>II. HIPÓTESIS.....</b>	<b>45</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
<b>IV. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>51</b>
1. Artículo 1.....	52
2. Artículo 2.....	60
<b>V. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
<b>VI. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>VIII. LÍNEAS DE FUTURO.....</b>	<b>86</b>
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>92</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>104</b>
1. Anexo 1. Publicaciones relacionadas a la tesis.....	105
2. Anexo 2. Presentaciones en congresos.....	112
3. Anexo 3. Financiación.....	131

## **PRESENTACION**

Esta tesis doctoral pretende demostrar la relevancia de la punción-aspiración guiada por ecobroncoscopia sectorial en la optimización de la estadificación mediastínica e hilar/interlobar del cáncer pulmonar no célula pequeña, así como en la obtención de material citológico para el análisis molecular en este subgrupo de pacientes.

La presentación de esta tesis ha sido realizada por compendio de artículos, de acuerdo con las normas establecidas por la Universidad Autónoma de Barcelona.

## **RESUMEN**

La presente Tesis Doctoral se ha basado en la compilación de dos artículos que tratan de evidenciar la utilidad de punción aspiración transbronquial guiada por ecobroncoscopia (PATB-EBUS) en dos subgrupos de pacientes con cáncer de pulmón no célula pequeña (CPNCP). El primer artículo se basó en la utilidad de la PATB-EBUS en la estadificación ganglionar sistemática en pacientes con cáncer de pulmón (CP) y mediastino normal (N0/N1) por PET/TC. El segundo artículo se basó en la realización del estudio molecular secuencial (EGFR, KRAS, ALK, ROS-1, ERBB2, BRAF y MET) a partir de muestras citológicas obtenidas mediante PATB-EBUS o punción aspiración con aguja fina por ultrasonografía endoscópica con ecobroncoscopio (PAAF-US-B), en pacientes con CPNCP.

Las conclusiones fueron: 1) El primer estudio nos evidencia que la PATB-EBUS sistemática es un método muy preciso para estadificación ganglionar en pacientes con CPNCP sin compromiso mediastínico en la PET/TC; así también nos evidencia la nula prevalencia de afectación ganglionar N3 contralateral (mediastínica e hilar/interlobar) en nuestra serie, lo que nos cuestiona la necesidad del muestreo en regiones hilar/interlobar durante la PATB-EBUS. 2) El segundo estudio nos muestra que las muestras citológicas obtenidas por PATB-EBUS y/o PAAF-EUS-B pueden ser suficientes para el estudio molecular secuencial, individual y parcial; así también nos evidencia que las extensiones en membrana son válidas para el estudio de alteraciones oncogenéticas.

## **SUMMARY**

The present doctoral thesis is based on the compilation of two articles that demonstrate the usefulness of Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) in two subgroups of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

The first paper was based on the utility of systematic mediastinal lymph node staging via EBUS-TBNA in patients with lung cancer and normal mediastinum (N0/N1) by PET/CT. The second paper was based on the performance of sequential molecular study (EGFR, KRAS, ALK, ROS-1, ERBB2, BRAF and MET) from cytological samples obtained by EBUS-TBNA and/or Oesophageal ultrasound-guided fine needle aspiration with an echobronchoscope (EUS-B-FNA), in patients with NSCLC.

The conclusions were: 1) The first study shows us that the systematic EBUS-TBNA is a very precise method for lymph node staging in patients with NSCLC without mediastinal compromise on PET/CT; This also shows us the infrequency of contralateral N3 lymph node involvement (mediastinal and hilar / interlobar) in our series, which questions the need for sampling of hilar / interlobar regions during TBNA. 2) The second study shows us that the cytological samples obtained by EBUS-TBNA and / or EUS-FNA may be sufficient for the sequential, individual and partial molecular study; it also proves that membrane extensions are valid for the study of oncogenetic alterations.



## **I. INTRODUCCION**

## **1. EL CANCER DE PULMON**

A nivel mundial, el cáncer de pulmón (CP) es el cáncer más comúnmente diagnosticado (11.6% del total de casos) y la principal causa de muerte por cáncer, tanto en hombres como en mujeres<sup>1</sup>. En el año 2018, se estimó cerca de 1.8 millones de muertes por esta causa, lo que representa 1 de cada 5 fallecimientos se debe al CP.<sup>1</sup> El diagnóstico se suele realizar entre los 55 y 75 años, con un pico máximo entre los 65 y 70 años.

El tabaco es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CP, el cual se incrementa a mayor duración e intensidad de consumo<sup>2</sup>. Los fumadores tienen un riesgo entre 15 y 25 veces mayor de padecer CP que los no fumadores, y tiene una latencia de 15 a 20 años en relación con el consumo de cigarrillos<sup>3</sup>. En España durante el 2012, el consumo de tabaco ocasionó un total de 60,456 defunciones, de las cuales 18,437 se debieron al CP<sup>4</sup>. Sin embargo, cerca del 20% de casos no presentan exposición tabáquica, sobretudo en mujeres. Existen otros factores de riesgo como el tabaquismo pasivo, la exposición a radón, la exposición a productos del ambiente laboral (alquitrán, hollín, arsénico, cromo y asbesto), las comorbilidades pulmonares previas (por ejemplo, la fibrosis pulmonar idiopática y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica), así como alteraciones genéticas<sup>5</sup>.

### **1.1. CLASIFICACION DEL CANCER DE PULMON**

Aproximadamente el 95% de casos de CP son de tipo epitelial. Tradicionalmente, se han dividido en carcinoma pulmonar de célula pequeña (CPCP) y en carcinoma pulmonar de célula no pequeña (CPNCP)<sup>6</sup>. Este último corresponde al 80-85% del total de casos<sup>7</sup>. En el año 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo hincapié en el uso de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para la tipificación adecuada de los tumores pulmonares, así como en la caracterización molecular por las implicaciones terapéuticas<sup>8</sup> (Tabla 1).

<p><i>Adenocarcinoma</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lepídico, acinar, papilar, micropapilar, sólido</li> <li>• Mucinoso invasivo <ul style="list-style-type: none"> <li>– Mixto, mucinoso y no mucinoso</li> </ul> </li> <li>• Coloide, fetal, entérico, mínimamente invasivo</li> <li>• Lesiones preinvasivas <ul style="list-style-type: none"> <li>– Hiperplasia adenomatosa atípica</li> <li>– Adenocarcinoma in situ</li> </ul> </li> </ul> <p><i>Carcinoma de células escamosas</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Queratinizante, no queratinizante, basaloide</li> <li>• Lesión preinvasiva: carcinoma de células escamosas in situ</li> </ul> <p><i>Tumores neuroendocrinos</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Carcinoma de células pequeñas, carcinoma neuroendocrino de células grandes</li> <li>• Tumor carcinoide, hiperplasia difusa de células neuroendocrinas</li> </ul> <p><i>Carcinoma de células grandes</i></p> <p><i>Carcinoma adenoescamoso</i></p> <p><i>Carcinoma sarcomatoide</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pleomórfico, de células fusiformes, de células gigantes</li> <li>• Carcinosarcoma, blastoma pulmonar</li> </ul> <p><i>Carcinomas inclasificables y otros</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Carcinoma NUT, carcinoma linfoepitelioma-like</li> <li>• Tumores tipo glándula salival</li> </ul>
---

**Tabla 1:** Clasificación de tumores epiteliales malignos invasivos de pulmón. Organización Mundial de la Salud (NUT: proteína nuclear en el testículo). Adaptado de Travis et al<sup>8</sup>.

El CPNCP se subdivide en:

- i. **Adenocarcinoma.** Es la forma histológica más común del CPNM en ambos sexos<sup>9</sup>, y el más heterogéneo pudiendo existir más de un patrón morfológico en un mismo tumor. Muestran diferenciación glandular, con presencia de células grandes, núcleos de aspecto vesicular y citoplasma con vacuolas de moco. La mayoría se ubica en el parénquima pulmonar periférico, y pueden originarse a partir de lesiones displásicas pre-invasivas como la hiperplasia adenomatosa atípica<sup>10</sup>.

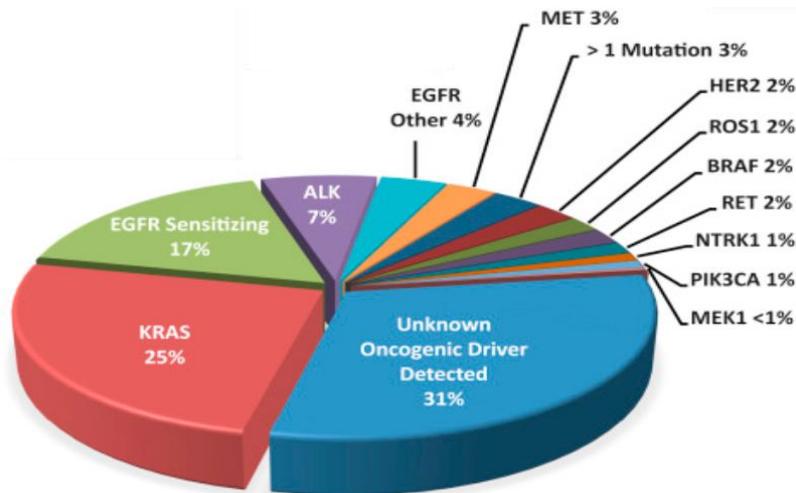
En el año 2011, la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC), la *American Thoracic Society* (ATS), y la *European Respiratory Society* (ERS) propusieron una nueva clasificación del adenocarcinoma basada en la invasión histológica<sup>11</sup> (Tabla 2).

Las agrupaciones se correlacionan con resultados clínicos, así las lesiones preinvasivas que tienen un curso clínico indolente presentan casi el 100% de curabilidad frente a carcinomas invasivos que presentan un pronóstico peor<sup>12</sup>.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LUNG CANCER/AMERICAN THORACIC SOCIETY/EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY CLASSIFICATION OF LUNG ADENOCARCINOMA IN RESECTION SPECIMENS	
Preinvasive lesions	
Atypical adenomatous hyperplasia	
Adenocarcinoma <i>in situ</i> ( $\leq$ 3 cm formerly BAC)	
Nonmucinous	
Mucinous	
Mixed mucinous/nonmucinous	
Minimally invasive adenocarcinoma ( $\leq$ 3 cm lepidic predominant tumor with $\leq$ 5 mm invasion)	
Nonmucinous	
Mucinous	
Mixed mucinous/nonmucinous	
Invasive adenocarcinoma	
Lepidic predominant (formerly nonmucinous BAC pattern, with $>$ 5 mm invasion)	
Acinar predominant	
Papillary predominant	
Micropapillary predominant	
Solid predominant with mucin production	
Variants of invasive adenocarcinoma	
Invasive mucinous adenocarcinoma (formerly mucinous BAC)	
Colloid	
Fetal (low and high grade)	
Enteric	

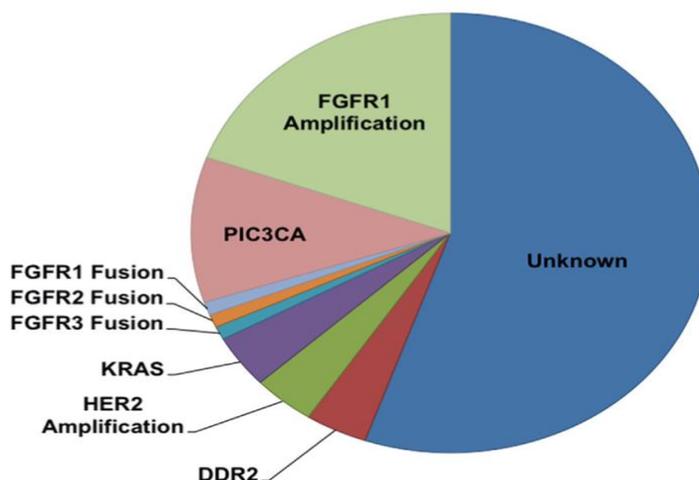
**Tabla 2.** Clasificación del Adenocarcinoma pulmonar. Adaptado de Travis et al<sup>9</sup>.

El adenocarcinoma puede presentar diferentes alteraciones oncogénicas, que oscilan entre 2-40% del total de casos<sup>13-17</sup>, y que incluye las mutaciones del gen EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Fig. 1).



**Figura 1.** Alteraciones oncogénicas en el adenocarcinoma pulmonar. Adaptado de Tsao AS et al <sup>15</sup>.

- ii. **Carcinoma escamoso.** Es la forma más relacionada con el hábito tabáquico. Se caracteriza por zonas de diferenciación escamosa y zonas de queratinización, presencia de puentes intercelulares y perlas córneas. Las células son grandes con citoplasma denso y núcleo hiper cromático. Los tumores se ubican más en zonas centrales, alrededor de los bronquios principales y derivan de lesiones del epitelio bronquial como la displasia escamosa o el carcinoma in situ<sup>10</sup>. Presentan alteraciones oncogénicas diversas, con escasa implicación clínica (Fig. 2).



**Figura 2.** Alteraciones genéticas potencialmente tributarias de tratamiento dirigido en el carcinoma escamoso. Adaptado de Berge EM et al <sup>16</sup>

- iii. **Carcinoma de células grandes.** Es un subtipo poco frecuente, menos del 3% de los CP<sup>18</sup>. Se localiza en la periferia del pulmón, de aspecto voluminoso y necrótico. Sus células son poligonales y poseen núcleos grandes, sin las características morfológicas ni inmunohistoquímicas del carcinoma escamoso o el adenocarcinoma<sup>10</sup>.
- iv. **Otros tipos de CPNCP.** El adenoescamoso es un tipo raro, e híbrido ya que contiene tanto componente de escamoso como de adenocarcinoma en al menos 10% del tumor respectivamente. Tiene importancia clínica por presentar similar frecuencia de alteraciones moleculares como el adenocarcinoma<sup>19</sup>.  
El carcinoma sarcomatoide se clasifica en carcinoma pleomórfico, carcinoma de células fusiformes, carcinoma de células gigantes, carcinosarcomas y blastomas<sup>10</sup>. El diagnóstico histológico se puede sospechar con muestras pequeñas, pero el diagnóstico definitivo sólo es posible con la resección completa del tumor, debido a su heterogeneidad y a su pleomorfismo histológico<sup>20</sup>.

## 1.2. EVALUACION INICIAL

### i. CLINICA

Los síntomas y signos derivan del crecimiento del tumor primario, de la invasión de estructuras intratorácicas adyacentes, de la afectación de estructuras extratorácicas o de la presencia de síndromes paraneoplásicos. La tos es el síntoma más frecuente en el CP. La aparición de hemoptisis, ya sea no amenazante pero persistente o hemoptisis franca, evidencia alteración de la mucosa bronquial o afectación vascular. La disnea progresiva o cambios en la disnea habitual puede evidenciarse ante la presencia de atelectasia o neumonitis obstructiva. El dolor pleurítico aparece secundario a la invasión de la pleura.

### ii. PRUEBAS RADIOLOGICAS

En estadios iniciales, los síntomas pueden ser escasos y la sospecha diagnóstica se realiza por un hallazgo casual en una radiografía de tórax o alguna otra prueba de imagen que se practica como parte del estudio de otra patología. Contrariamente, cuando aparecen los síntomas, la enfermedad puede encontrarse en estadios

avanzados. La radiografía de tórax simple suele ser la prueba radiológica inicial. La tomografía axial computarizada (TAC) de tórax y abdomen superior con contraste, nos permite una valoración inicial del tumor (T), detectar afectación ganglionar mediastínica e hilar (N), y detectar metástasis (M) pulmonares contralaterales, hepáticas, óseas o suprarrenales, así como afectación pleural. Sin embargo, la TAC por sí sola, en muchos casos no es suficiente para una adecuada estadificación.

La combinación de la TAC con la tomografía por emisión de positrones utilizando 18-fluorodesoxiglucosa (18FDG-PET-TC) es una técnica con mayor precisión recomendada en la estadificación y planificación del tratamiento en el CP<sup>21</sup>. Tiene valor en la caracterización de nódulos pulmonares > 8 mm, y puede ayudar en la identificación de metástasis accesibles para la toma de muestras diagnósticas<sup>22,23</sup>.

La resonancia magnética (RM) no ha demostrado ser mejor que la TAC en la estadificación del CP<sup>24</sup>. Sin embargo, puede tener utilidad en situaciones especiales como la valoración de compromiso vascular mediastínico, pericárdico o cardíaco en pacientes con contraindicación de contraste endovenoso; ayudar en la diferenciación de zonas de neumonitis con zonas de tumor; o en la valoración de extensión local en tumores del sulcus superior. La RM cerebral se recomienda para la identificación de metástasis cerebrales en pacientes con adenocarcinoma con clínica neurológica y TAC craneal no concluyente<sup>25</sup>.

### **1.3. METODOS DIAGNOSTICOS**

La prueba para conseguir confirmación histológica debe ser aquella que ayude tanto al diagnóstico como a la estadificación, con el fin de evitar pruebas innecesarias y complicaciones añadidas. Dependerá del tamaño y localización del tumor primario, y de la presencia de lesiones metastásicas accesibles.

#### **i. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS NO INVASIVAS**

La citología de esputo puede ayudar a identificar células tumorales del árbol tráqueo-bronquial. Es económica y fácil de realizar, siendo útil en casos de CP con deterioro del estado general. Los tumores diagnosticados por esta técnica, suelen ser de localización central, mayor tamaño, y de subtipo histológico escamoso<sup>26</sup>.

## ii. PRUEBAS MINIMAMENTE INVASIVAS

- a) Broncoscopia flexible. Tiene un papel importante en la evaluación del CP. La rentabilidad de las diversas técnicas broncoscópicas (broncoaspirado, cepillado endobronquial, biopsia bronquial o biopsias transbronquial) dependerá de si el tumor es central y endoscópicamente visible. Para una lesión central y visible, la sensibilidad realizando 4-5 biopsias bronquiales es  $> 95\%$ <sup>27</sup>. Las características morfológicas endoscópicas de la lesión tumoral pueden influir en la obtención de material diagnóstico, así la presencia de infiltración submucosa, necrosis tumoral o áreas de compresión bronquial disminuyen la rentabilidad de la biopsia bronquial. La punción transbronquial/transtraqueal “a ciegas” con aguja fina es una técnica que permite obtener muestras de ganglios o masas hiliares, subcarinales o paratraqueales. Nos permite una estadificación mediastínica, en el mismo acto de la broncoscopia, pero su rentabilidad puede estar influenciada por el tamaño de los ganglios y la experiencia del broncoscopista.

Si la lesión se localiza en la periferia del pulmón, se pueden realizar otras técnicas más avanzadas, como el uso del broncoscopio fino, la ecobroncoscopia radial, la broncoscopia con navegación electromagnética o la broncoscopia con navegación virtual, con las que se pueden utilizar vaina de guía, cepillado bronquial, punciones con aguja fina y biopsias transbronquiales dirigidas, aumentando el rendimiento diagnóstico hasta el 70%<sup>28</sup>. Técnicas endoscópicas como la ecobroncoscopia y ecoendoscopia, permiten la punción de lesiones adyacentes a la vía aérea o esofágica guiadas en tiempo real.

- b) Punción aspiración con aguja fina o aguja gruesa transtorácica, guiada por TC o ecografía torácica. Se realiza en lesiones periféricas y tiene una alta sensibilidad (86%) y especificidad (99%)<sup>29</sup> para lesiones malignas, aunque disminuye en nódulos menores de 15 mm (Fig. 3). Está indicada cuando existe necesidad de diagnóstico histológico en pacientes no tributarios de tratamiento quirúrgico, o cuando existe discrepancia entre la sospecha clínica y las pruebas radiológicas, con lo que se puede evitar un procedimiento quirúrgico si se descarta malignidad<sup>30</sup>. Las complicaciones secundarias pueden ser neumotórax, hemorragia pulmonar o

hemoptisis. Sin embargo, la frecuencia de neumotórax puede variar en función de la técnica utilizada, hasta un 25,3% si se realiza bajo guía de la TAC e incluso requerir colocación de tubo de drenaje en el 5,6%<sup>31</sup>; mientras que bajo guía ecográfica aproximadamente el 1% pueden presentar neumotórax, siendo la ecografía una técnica más segura porque permite la punción en tiempo real y la punción de lesiones con contacto pleural<sup>32</sup>.



**Figura 3.** Biopsia pleural guiada por ecografía torácica.

- c) Técnicas pleurales. La toracocentesis es la prueba inicial en el estudio de derrame pleural maligno. El uso de la ecografía torácica para la localización del derrame pleural, así como la identificación de engrosamientos pleurales, incrementa el rendimiento diagnóstico de la toracocentesis y la biopsia pleural<sup>32</sup>.

### iii. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

El uso de técnicas quirúrgicas para confirmación histológica se realiza sólo cuando los resultados obtenidos por técnicas no invasivas han sido infructuosos. La mediastinoscopia o la videotoracoscopia permiten la obtención de muestras histológicas cuando existe afectación ganglionar mediastínica, lesiones pulmonares o pleurales.

#### 1.4. DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO

La toma de muestras, tanto citológicas como histológicas, deberán servir para la identificación morfológica, inmunohistoquímica y molecular del tumor, lo que resulta importante para identificar opciones de tratamiento personalizadas. Cerca del 80% de los casos de CP son diagnosticados en fase localmente avanzada o con enfermedad metastásica<sup>33</sup>, y según el estado general del paciente es posible que sólo se puedan obtener muestras citológicas o biopsias pequeñas.

Se recomienda la utilización de técnicas de IHC siempre que los hallazgos morfológicos sean insuficientes para una adecuada subclasificación histológica. Los anticuerpos más utilizados para la diferenciación de adenocarcinoma y carcinoma escamoso son el factor de transcripción tiroideo 1 (TTF-1), la napsina, p40/p63 y la citoqueratina (CK) 5 - 6 (Tabla 3). Con estas técnicas se logra una adecuada clasificación hasta en el 80% de los casos<sup>34</sup>.

Anticuerpo	Tipo Histológico	Positividad (%)
TTF-1	Adenocarcinoma	80
Napsina	Adenocarcinoma	80-85
CK-7	Adenocarcinoma	95-100
p63	Carcinoma escamoso	>90
P40	Carcinoma escamoso	99-100
CK 5-6	Carcinoma escamoso	80

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados en el diagnóstico del adenocarcinoma y del carcinoma escamoso pulmonar<sup>34</sup>.

#### 1.5. BIOMARCADORES PREDICTIVOS

A pesar de los avances en el tratamiento del CPNCP, la tasa de supervivencia a los 5 años no supera el 15%, a nivel mundial<sup>35</sup>. Los biomarcadores predictivos para la selección de tratamientos son alteraciones mutacionales que juegan un papel en la proliferación y supervivencia de las células tumorales, y están relacionados con la respuesta o resistencia a tratamientos oncoespecíficos. En el CP, algunos biomarcadores se han validado como objetivos confiables para una terapia sistémica dirigida,

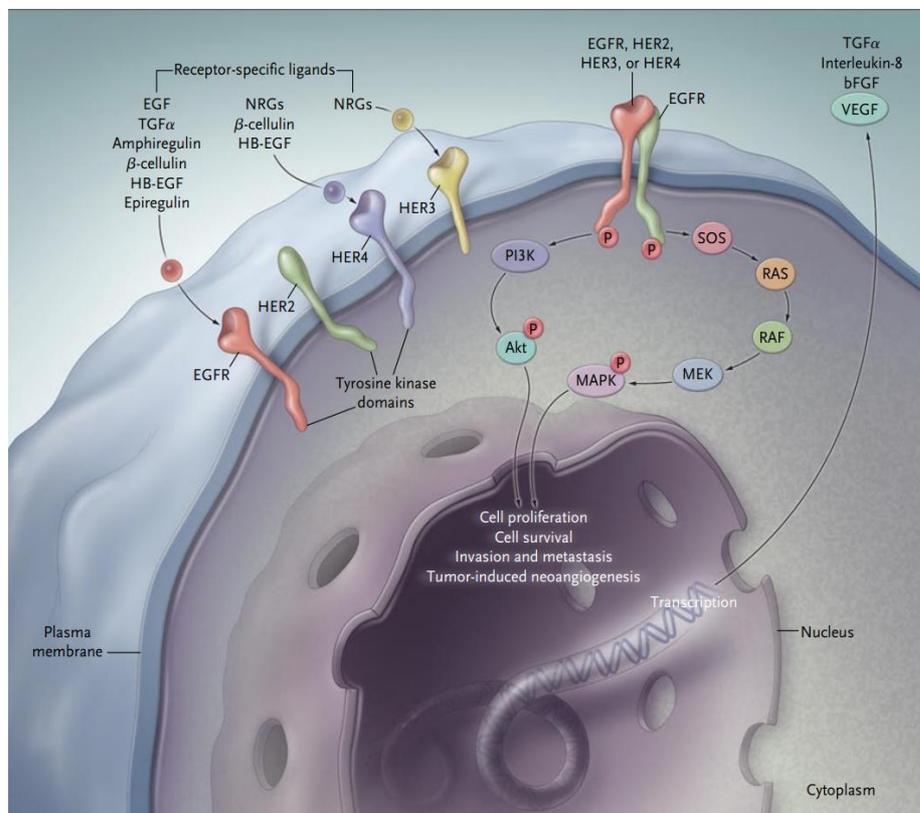
mejorando la calidad de vida y la supervivencia libre de progresión en pacientes con CPNCP avanzado<sup>17,36</sup>.

La identificación de estos biomarcadores ha conllevado a cambios en los algoritmos terapéuticos del CP avanzado<sup>37-39</sup>.

### i. MUTACIÓN DEL GEN EGFR

El EGFR es un receptor de la familia tirosina quinasa (TK), y el gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 7. El EGFR es una proteína de la membrana celular, que se activa mediante la unión de diversos ligandos, lo que produce la dimerización o la oligomerización del receptor, desencadenando diversas cascadas de señalización intracelular. La ruta de señalización más conocida es la vía Ras/MAPK (*Mitogen-activated protein kinases*) que es imprescindible para la proliferación celular<sup>40</sup> (Fig. 4).

La activación inadecuada del EGFR puede ocurrir mediante mutaciones, deleciones o amplificaciones de secuencias que codifican el dominio TK. Esta activación favorece la supervivencia de las células malignas, con una descontrolada proliferación celular tumoral, permitiendo la invasión celular y las metástasis<sup>41</sup>.



**Figura 4: Mecanismos de activación del EGFR.**  
Recuperado de Ciardiello F, Tortora G<sup>40</sup>.

Las mutaciones activadoras del gen EGFR han sido identificadas en grupos de pacientes con CPNCP. La frecuencia depende de la subpoblación estudiada, y varía entre el 5-20%, siendo más frecuentes en mujeres, no fumadoras, histología adenocarcinoma y raza asiática<sup>17,40</sup>. Existen 4 mutaciones activadores del gen EGFR que se encuentran en los exones 18 al 21. La delección del exón 19 y del exón 21, constituyen más del 80%. Los pacientes con estas mutaciones se benefician del tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa (TKIs) como el gefitinib o erlotinib<sup>42-46</sup>, que incrementaron la supervivencia media frente al tratamiento convencional de 12 meses a 2 años<sup>45</sup>.

Sin embargo, existen resistencias a los tratamientos con TKIs, que pueden ser primarias con falta de respuesta inicial, o secundarias que ocurren tras una respuesta inicial favorable pero no duradera. La presencia de otras mutaciones, como del KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) o del BRAF (*V-Raf murine sarcoma oncogene homolog B1*) han sido asociadas a pobre respuesta a los TKIs. La resistencia más conocida es la mutación T790M en el exón 20, que ha sido detectada en casi el 50% de los tumores tratados con TKI<sup>47</sup>. Se han desarrollado fármacos de segunda y tercera generación para mejorar la tasa de respuesta a estos tratamientos<sup>48</sup>.

## ii. REORDENAMIENTOS DEL GEN ALK

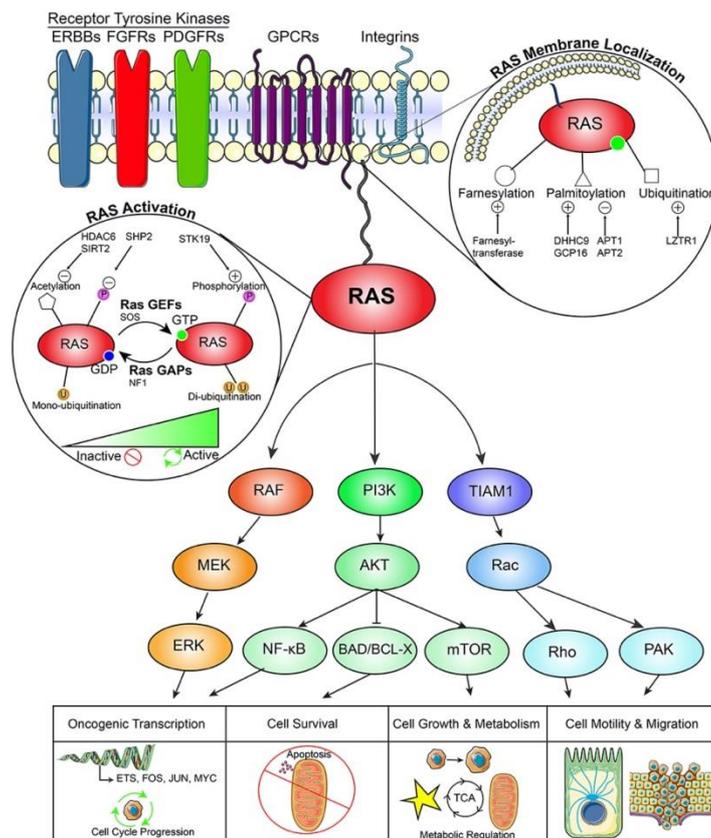
La ALK (*Anaplastic lymphoma kinase*) es una proteína transmembrana perteneciente a la familia de receptores tirosina quinasa de la insulina, que se asocia a los linfomas anaplásicos y algunas formas de linfomas no hodgkinianos. La activación del gen se produce por la fusión con otros genes. La fusión del ELM4 (*echinoderm microtubule-associated protein-like 4*) con ALK genera una actividad tirosina quinasa constante, activación de la cascada mitogénica y elevada sensibilidad a la inhibición del ALK. La fusión EML4-ALK ha sido identificada en el 2-7% de pacientes con adenocarcinoma pulmonar<sup>13</sup>. Los casos con CPNCP avanzado que presentan este reordenamiento suelen ser jóvenes, con escaso o nulo hábito tabáquico y predominantemente de la estirpe adenocarcinoma<sup>49</sup>.

El estudio inicial con un inhibidor del ALK –crizotinib- en pacientes con CPNCP avanzado evidenció que el tratamiento se asociaba a una tasa de respuesta global del 57%, y una tasa de supervivencia libre de progresión a los 6 meses del 72%<sup>50</sup>.

Sin embargo, la presencia de resistencias a crizotinib ha requerido el desarrollo de inhibidores de ALK de segunda generación (ceritinib, alectinib, brigatinib o lorlatinib) que sean más potentes, capaces de superar estas resistencias y tener mayor actividad sobre las metástasis del sistema nervioso central. Estos inhibidores no se encuentran ampliamente disponibles a nivel mundial y precisan de más ensayos clínicos que demuestren su efectividad<sup>51</sup>.

#### iv. MUTACIÓN DEL GEN KRAS

Este protooncogen codifica la proteína guanosina trifosfatasa (GTPasa). Su función consiste en mediar la señalización intracelular, que ha sido producida por la activación de receptores transmembrana, con lo que regula la proliferación y supervivencia celular<sup>52</sup> (Fig. 5). El gen se localiza en el brazo corto el cromosoma 12, y sus principales mutaciones se producen en los codones 12,13 y 61.



**Figura 5. Mecanismos de acción de KRAS**

Recuperado de Gimble RC et al<sup>52</sup>.

Es la mutación más frecuente, detectándose hasta en el 25% de los adenocarcinomas, y afecta principalmente a pacientes de raza caucásica y con hábito tabáquico. Su presencia esta relacionada a la poca eficacia de los TKIs en el paciente con CP avanzado con mutación del EGFR, por lo que su determinación puede tener utilidad clínica cuando no existe respuesta al tratamiento con TKIs<sup>53</sup>.

**v. REORDENAMIENTOS DEL GEN ROS 1**

El ROS 1 (*proto-oncogene 1*) es miembro de la familia de los receptores tirosina quinasa, se localiza en el cromosoma 6, y controla el ciclo y la proliferación celular. Los reordenamientos del gen ROS 1 se producen en el 1-2% de los CPNCP, principalmente en adenocarcinomas, afectando a jóvenes no fumadores<sup>54</sup>. Crizotinib ha demostrado una tasa de respuesta global del 72% con un tiempo libre de progresión de 19,2 meses<sup>55</sup>.

**vi. MUTACIÓN DEL GEN ERB-B2**

El ERB-B2 también conocido como HER-2 (*human epidermal growth factor 2*), es un receptor tirosina quinasa, y su activación (homo/heterodimerización) es capaz de incrementar las vías de señalización intracelulares, incrementando la proliferación celular, diferenciación y migración. La incidencia de la mutación es del 2-5% en el CPNCP tipo adenocarcinoma, y se relaciona con la ausencia de hábito tabáquico<sup>56</sup>. Diversos estudios publicados con el uso de fármacos como dacomitinib, neratinib o en combinación, han demostrado resultados prometedores, pero se precisa ampliar su investigación.

**vii. MUTACIÓN DEL GEN DE BRAF**

Es un protooncogen localizado en el cromosoma 7, que codifica la proteína quinasa serina /treonina, la cual participa en las vías de señalización intracelular (vía MAPK). Las mutaciones están presentes en el 7% de los CPNCP, predominantemente en la estirpe adenocarcinoma. La mutación más frecuente es la V600E, y se produce en mujeres sin exposición tabáquica. La combinación de dabrafenib y trametinib en pacientes con mutación BRAF V600E ha demostrado una respuesta de la enfermedad del 63%<sup>57</sup>.

### **viii. AMPLIFICACIÓN O MUTACIÓN DEL GEN MET**

MET (*mesenchymal epithelial transition*) es el gen que codifica el HGFR (*hepatocyte growth factor*), y su protooncogen se localiza en el cromosoma 7. La activación del gen MET desencadena vías de señalización intracelulares que conducirán a mitogénesis, angiogénesis, morfogénesis, migración, supervivencia e invasión tumoral. En el CPNCP se ha observado la mutación del exón 14, y en mayor frecuencia la amplificación del gen, en el 1,4-21% de los enfermos sin tratamiento con TKIs, y hasta en el 20% de los pacientes con mutación del EGFR, tratados con TKIs<sup>58</sup>.

## **2. ESTADIFICACION DEL CANCER DE PULMON**

En la práctica clínica, es importante evaluar el estadio de enfermedad y decidir el tratamiento adecuado para un paciente con CP, basado en factores pronósticos como el grado de afectación neoplásica, las características anátomo-patológicas del tumor, y las características del paciente.

Se recomienda iniciar la confirmación histológica del estudio diagnóstico y/o de estadificación del CP, por aquellas pruebas que nos proporcione más información del estadio de enfermedad (por ejemplo, biopsiar la metástasis o ganglio afecto, en vez de biopsiar el tumor primario pulmonar). Sin embargo, cada caso se debe ser individualizar para la optimización de su futuro tratamiento.

El sistema TNM se basa en la descripción del grado de extensión anatómica del CP, siendo un indicador de pronóstico de supervivencia, siendo la supervivencia es mayor cuando existe enfermedad localizada respecto a los estadios metastásicos. En el año 2017, la IASLC actualizó el sistema TNM del 2009, y publicó la 8ª edición del TNM del CP que trata de agrupar a los pacientes en subgrupos basados en supervivencia similar. Para esta nueva edición, analizó una base de datos prospectiva con 94,708 casos recogidos en 16 países<sup>59</sup>. Esta nueva clasificación es aplicable para carcinomas pulmonares (célula pequeña y no célula pequeña), así como para tumores carcinoides broncopulmonares.

Las categorías T (tumor), N (ganglios linfáticos) y M (metástasis) se detallan en las tablas 4-7, así como la clasificación por estadios de enfermedad (Tabla 7)<sup>59</sup>.

<b>Tx</b>	No se pueden evaluar el tumor primario, o existencia de tumor demostrada por la presencia de células tumorales en el esputo o el lavado bronquial pero sin visualización tumoral por radiodiagnóstico o broncoscopia
<b>To</b>	Ausencia de evidencia del tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor de 3 cm o menos en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (es decir: no hay invasión en el bronquio principal)
<b>T1a (mi)</b>	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
<b>T1a</b>	Tumor de 1 cm o menos en su diámetro mayor
<b>T1b</b>	Tumor de >1 cm pero <2 cm en su diámetro mayor
<b>T1c</b>	Tumor de >2 cm pero <3 cm en su diámetro mayor
<b>T2</b>	Tumor de >3 cm pero <5 cm en su diámetro mayor, o tumor con cualquiera de las siguientes características: afecta el bronquio principal (a cualquier distancia de carina principal) pero sin afectar esta; invade pleura visceral, asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hiliar (total o parcial)
<b>T2a</b>	Tumor de >3 cm pero <4 cm en su diámetro mayor
<b>T2b</b>	Tumor de >4 cm pero <5 cm en su diámetro mayor
<b>T3</b>	Tumor de >5 cm pero <7 cm en su diámetro mayor o tumor que invade directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pleura parietal, pared torácica (incluyendo los tumores de surco pulmonar superior), nervio frénico, pericardio parietal; o existencia de nódulo/s tumoral/es separado/s del tumor primario pero en el mismo lóbulo que este
<b>T4</b>	Tumor de >7 cm o cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral o carina; o existencia de nódulo/s tumoral/es separado/s del tumor primario, en un lóbulo diferente del pulmón homolateral

**Tabla 4.** Categorías del tumor primario (T), según la 8ª edición de la Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón <sup>59</sup>.

<b>Nx</b>	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
<b>No</b>	Ausencia de metástasis en ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b>	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales homolaterales y/o hiliares e intrapulmonares homolaterales, incluida la afectación por extensión directa
<b>N2</b>	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos homolaterales y/o subcarínicos
<b>N3</b>	Metástasis en los ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales o escalenos o supraclaviculares

**Tabla 5.** Categorías de metástasis ganglionar regional (N), según la 8ª edición de la Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón <sup>59</sup>.

<b>Mo</b>	Ausencia de metástasis a distancia
<b>M1</b>	Presencia de metástasis a distancia
<b>M1a</b>	Presencia de nódulo/s tumoral/es en un lóbulo contralateral; Tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico maligno
<b>M1b</b>	Presencia de una sola metástasis extratorácica en un solo órgano
<b>M1c</b>	Presencia de más de una metástasis extratorácica en un órgano o en varios

**Tabla 6.** Categorías de metástasis a distancia (M), según la 8ª edición de la Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón <sup>59</sup>.

	No	N1	N2	N3
<b>T1</b>	IA	IIB	IIIA	IIIB
<b>T2a</b>	IB	IIB	IIIA	IIIB
<b>T2b</b>	IIA	IIB	IIIA	IIIB
<b>T3</b>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
<b>T4</b>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
<b>M1a</b>	IVA	IVA	IVA	IVA
<b>M1b</b>	IVA	IVA	IVA	IVA
<b>M1c</b>	IVB	IVB	IVB	IVB

**Tabla 7.** Estadios según la 8ª edición de la Clasificación TNM del Cáncer de Pulmón <sup>59</sup>.

## 2.1. ESTADIFICACION GANGLIONAR

En el momento del diagnóstico inicial, entre el 26 y el 44% de los pacientes con CP presenta afectación ganglionar mediastínica. La distribución ganglionar se basa en el mapa ganglionar de la IASLC, el cual concilia los mapas de Naruke y Mountain/Dresler, que lo divide en estaciones ganglionares (Fig. 6) según límites y referencias anatómicas. Este mapa es aplicable tanto para el estadiaje clínico, para el estadiaje quirúrgico y anatomopatológico<sup>60</sup>. La afectación directa del tumor sobre el ganglio se considera metástasis ganglionar, y el grado de afectación ganglionar está en función del número de estaciones ganglionares afectadas.

Según su localización respecto al tumor primario, podemos dividir la afectación ganglionar en diferentes categorías:

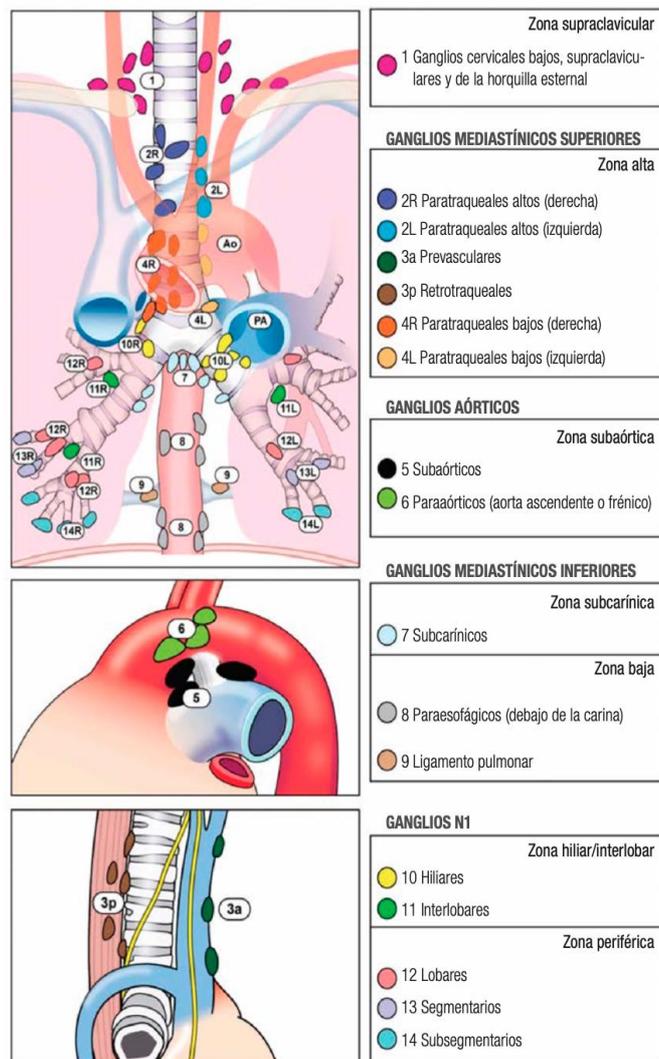
- a) N3: afectación ganglionar hilar/interlobar y/o mediastínica contralateral, y/o afectación ganglionar a nivel de escalenos o supraclaviculares ipsi o contralaterales.
- b) N2: afectación ganglionar ipsilateral o subcarinal.
- c) N1: afectación ganglionar hilar y/o peribronquiales ipsilateral.
- d) N0: sin afectación ganglionar.

Las guías clínicas actuales recomiendan la confirmación histológica de la afectación ganglionar mediastínica mediante pruebas endoscópicas, y la confirmación tras la resección tumoral y ganglionar sistemática (cirugía abierta, videoasistida, o

robóticamente asistida), o con técnicas quirúrgicas cuando existe alta sospecha de afectación metastásica (N2/N3) si las técnicas endoscópicas son negativas<sup>61-63</sup>. Estos resultados son de utilidad para el médico de cara la planificación del tratamiento y el pronóstico de la enfermedad.

Tras la resección tumoral, el análisis de supervivencia dividió en 4 grupos con diferentes pronósticos<sup>59</sup>:

- a) N1a: afectación de una sola estación ganglionar.
- b) N1b: afectación de más de una estación ganglionar N1, o -N2a1: afectación de una estación ganglionar N2 sin afectación N1 (“skip metástasis”).
- c) N2a2: afectación ganglionar de una estación N2 y afectación N1.
- d) N2a2: afectación de más de una estación ganglionar N2.



**Figura 6.** Mapa ganglionar de la *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*, Recuperado de Rush V et al<sup>60</sup>.

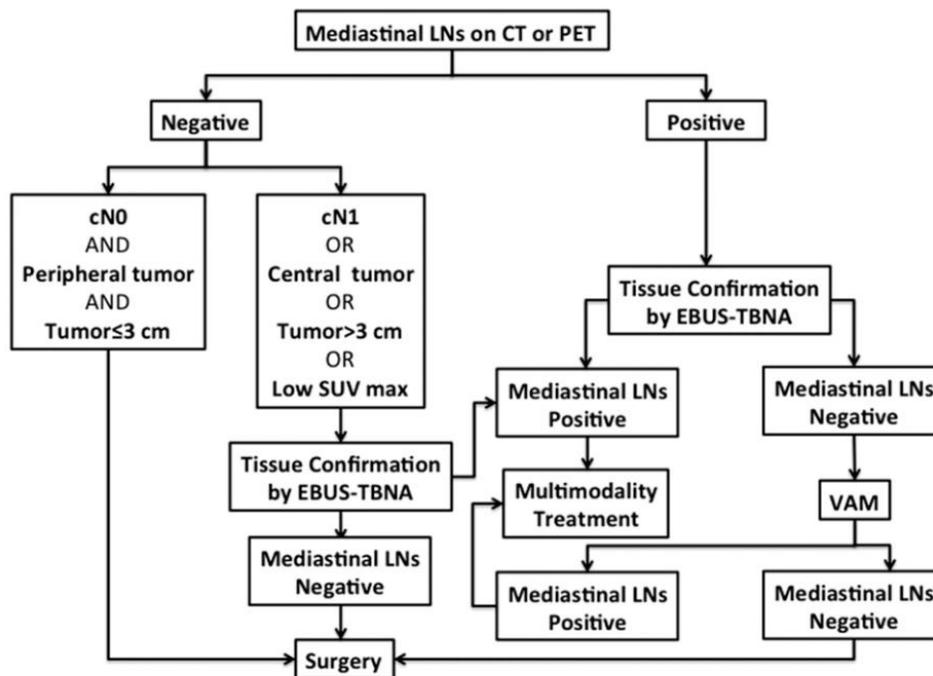
De las diversas técnicas de estadificación ganglionar mediastínica, se debe elegir la más eficiente, la más segura, la menos invasiva y la más rápida en realizarse en cada centro hospitalario, de esta manera que no se retrase el tratamiento del paciente.

### **2.1.1. TÉCNICAS NO QUIRÚRGICAS**

La TAC permite la detección de ganglios incrementados de tamaño y valorar el número de estaciones ganglionares afectadas, según los límites anatómicos establecidos<sup>56</sup>. Se considera ganglio sospechoso cuando el eje menor es >10 mm. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para la identificación de afectación ganglionar por TAC es del 55%, 81%, 58% y 83% respectivamente<sup>61,62</sup>.

La PET-TC por su alto rendimiento diagnóstico se recomienda por las guías clínicas para la estadificación en el CP en pacientes candidatos de tratamiento radical<sup>61-63</sup>. El incremento de captación de FDG (*Standardised uptake value*, SUV  $\geq$  2.5) se considera sugestivo de malignidad. La PET-TC muestra una mayor exactitud diagnóstica (78-93%) para la identificación de afectación metastásica frente a la PET y la TAC por separado<sup>21,23</sup>. Sin embargo, presenta una alta tasa de falsos positivos, en relación con procesos inflamatorios/infecciosos, que pueden producir un incremento de pruebas adicionales. Por otro lado, los falsos negativos se producen cuando existen ganglios con infiltración tumoral infracentrímetros, tumores con baja actividad metabólica o presencia de bajo flujo sanguíneo. Por lo tanto, la PET-TC resulta insuficiente sin una técnica de confirmación cito-histológica.

La ecobroncoscopia sectorial es la técnica de elección recomendada por las diferentes sociedades respiratorias y oncológicas (*American Thoracic Society - ATS*, *European Society of medical Oncology – ESMO-* and *American College of Chest Physicians - ACCP*) como primer paso mínimamente invasivo, en la estadificación ganglionar del CP. Se debe realizar cuando exista afectación ganglionar por TAC y/o PET-TC, y en los casos con mediastino normal cuando se trate de un tumor primario >3cm, tumor central, exista sospecha de afectación N1 o tumor de bajo SUV), sobretodo de tipo adenocarcinoma (Fig. 7)<sup>37,61,64</sup>.



**Figura 7.** Algoritmo diagnóstico en la estadificación ganglionar mediastínica del cáncer de pulmón. Recuperado de De Leyn et al <sup>64</sup>

### 2.1.2. TÉCNICAS QUIRÚRGICAS

Existen diferentes técnicas quirúrgicas para la exploración del mediastino. La mediastinoscopia cervical estándar descrita por Enric Carlens en 1954, fue utilizada para la valoración mediastínica en el CP, y así evitar la realización de toracotomías innecesarias. En la actualidad, la mediastinoscopia es un procedimiento que nos permite la valoración de mediastino anterosuperior, con un rol importante en la estadificación del CP, así como en el diagnóstico de lesiones primarias o secundarias. Mediante esta técnica podemos acceder y biopsiar las estaciones mediastínicas paratraqueales superiores e inferiores (2 y 4), las pretraqueales (3), las subcarinales anteriores (7) y eventualmente las adenopatías en relación con los bronquios principales. Las complicaciones son escasas, pero algunas de ellas potencialmente graves (parálisis recurrential izquierda, lesión de grande vaso o lesión del árbol traqueobronquial). La sensibilidad es de 86% y el VPN es de 94,5%<sup>65</sup>. La incorporación de imágenes de video al mediastinoscopio convencional ha hecho posible una mejor visualización de estructuras mediastínicas, así como mayor comodidad en el trabajo.

La mediastinoscopia es considerada el “*gold standard*” en la valoración ganglionar mediastínica del CP. Sin embargo, es incompleta debido a que el mediastino es más amplio. La mediastinoscopia cervical extendida es una técnica que permite acceder a las estaciones ganglionares paraaórticas y subaórticas (estaciones 5 y 6), y está indicada cuando existe CP del pulmón izquierdo. Es compleja y con mayor riesgo de lesión vascular. En el mismo sentido, la mediastinostomía anterior permite acceder al mediastino anterior y medio, aunque es una técnica menos usada.

La linfadenectomía mediastínica video asistida (VAMLA) y la linfanelectomía mediastínica extendida vía transcervical (TEMLA), son técnicas quirúrgicas invasivas cuyo objetivo es la estadificación precisa, mediante la extirpación de los ganglios linfáticos mediastínicos y del tejido circundante. La técnica TEMLA permite adicionalmente la extirpación de los ganglios en las estaciones 3a, 3p, 5 y 6. La complicación más frecuente es la parálisis recurrencial izquierda. La sensibilidad y el VPN para ambas pruebas, son mayores del 90%, siendo el rendimiento diagnóstico superior a la mediastinoscopia convencional<sup>66,67</sup>.

La toracoscopia o la videotoracoscopia exploradora permite evaluar el mediastino posterior y la cavidad pleural, así permite el estudio amplio de las estaciones ganglionares (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9) aunque de un sólo hemitórax, y puede ser complementaria a otras técnicas. Se puede realizar una linfadenectomía radical similar a la toracotomía, sino existen adherencias pleurales firmes.

### **3. ECOBRONCOSCOPÍA SECTORIAL**

#### **3.1. GENERALIDADES**

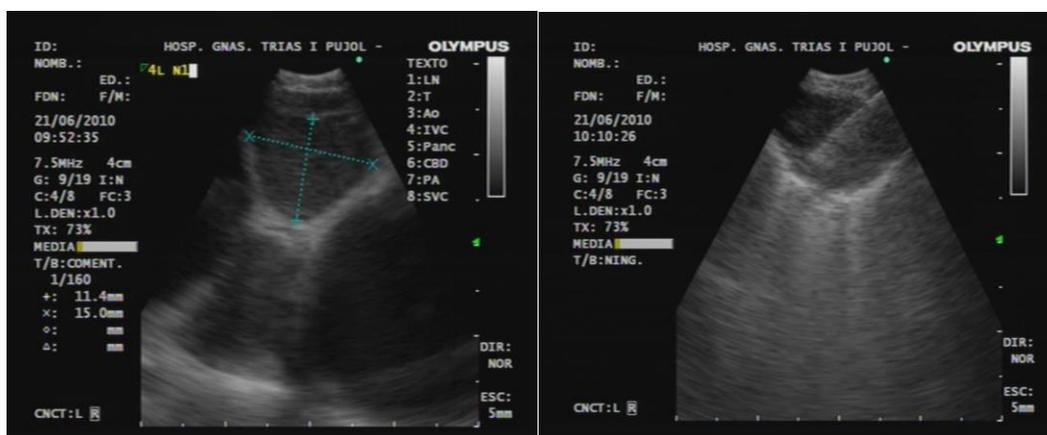
La ecobroncoscopia sectorial o lineal es una técnica broncoscópica, que combina la broncoscopia tradicional con la ecografía, de forma que permite la visualización de estructuras adyacentes a la pared traqueobronquial como son los ganglios hiliares, mediastínicos, lesiones mediastínicas o pulmonares.

La punción aspiración transbronquial guiada por ultrasonografía endobronquial (PATB-EBUS) en tiempo real, es un procedimiento mínimamente invasivo que ha

demostrado tener un alto rendimiento diagnóstico en la evaluación del mediastino que es comparable con la mediastinoscopia, e incluso superior si se combina con ultrasonografía endoscópica (EUS) o la ultrasonografía endoscópica con ecobroncoscopio (EUS-B)<sup>67,68-70</sup>. Desde su comercialización en el 2005, su uso se ha incrementado en la práctica médica, particularmente en el diagnóstico y estadificación de la neoplasia pulmonar<sup>71</sup>.

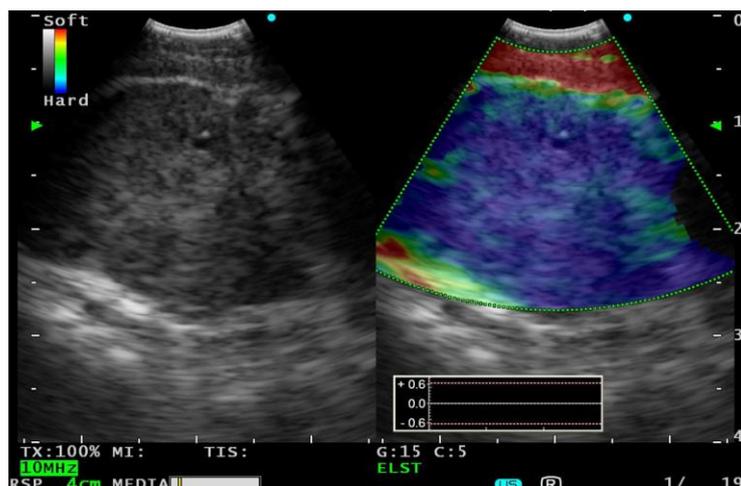
### Instrumento

El ecobroncoscopio posee un transductor convexo (5-12 MHz) en su extremo distal, que emite un haz de ultrasonidos y proporciona una imagen sectorial a través de las estructuras peritrapeobronquiales. A menor frecuencia, mayor profundidad y menor resolución, lo que es utilizado por la ecobroncoscopia sectorial para la punción en tiempo real (Fig. 8). Las características ultrasonográficas de las adenopatías pueden predecir la afectación tumoral<sup>72</sup>. Adicionalmente, se dispone de modo Doppler color y modo H - FLOW (flujo de alta resolución) que también permiten la identificación de patrones vasculares que ayudan a predecir afectación metastásica<sup>73</sup>.



**Figura 8.** Punción aspiración en tiempo real guiada por ecobroncoscopio sectorial de adenopatía.

Recientemente, la incorporación de la elastografía, método que evalúa la elasticidad o rigidez relativa de un tejido mediante imágenes en color (rojo, amarillo, verde, azul), nos ayuda a diferenciar lesiones benignas de malignas (lesión benigna más blanda: rojo, lesión maligna más dura: azul) (Fig. 9). Esta técnica ha demostrado ser más precisa en caracterización ganglionar mediastínica sin embargo no reemplaza a los hallazgos anatomopatológicos obtenidos por la PATB-EBUS<sup>74</sup>.



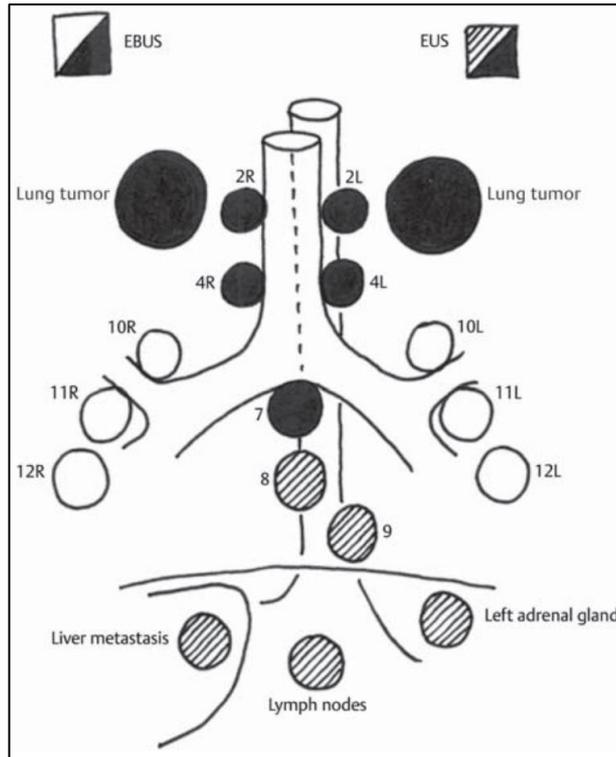
**Figura 9.** Modo elastografía de adenopatía subcarinal. El color azul denota dureza, y es un signo de malignidad.

### 3.2. INDICACIONES

Sus principales indicaciones son la valoración de las adenopatías mediastínicas y/o hiliares así como el diagnóstico de tumores pulmonares adyacentes al árbol traqueobronquial, y los tumores mediastínicos (Tabla 8). Las estaciones ganglionares accesibles por EBUS son la 2, 3p, 4, 7, 10, 11 y 12, y mediante el EUS-B, se pueden acceder a las estaciones 8 y 9, así como visualizar las estaciones 5 y 6 (Fig. 10).

Indicaciones
Diagnóstico y/o estadificación de neoplasia pulmonar
Recidiva de la neoplasia pulmonar
Reestadificación de la neoplasia pulmonar
Diagnóstico de metástasis ganglionares de neoplasias extratorácicas
Diagnóstico de tumores adyacentes a la vía aérea central
Diagnóstico de tumores mediastínicos
Diagnóstico de enfermedades granulomatosas (sarcoidosis y tuberculosis)
Diagnóstico de procesos linfoproliferativos
Obtención de material para estudio molecular de neoplasia pulmonares y extratorácicas

**Tabla 8.** Indicaciones del uso de la ecobroncoscopia sectorial.



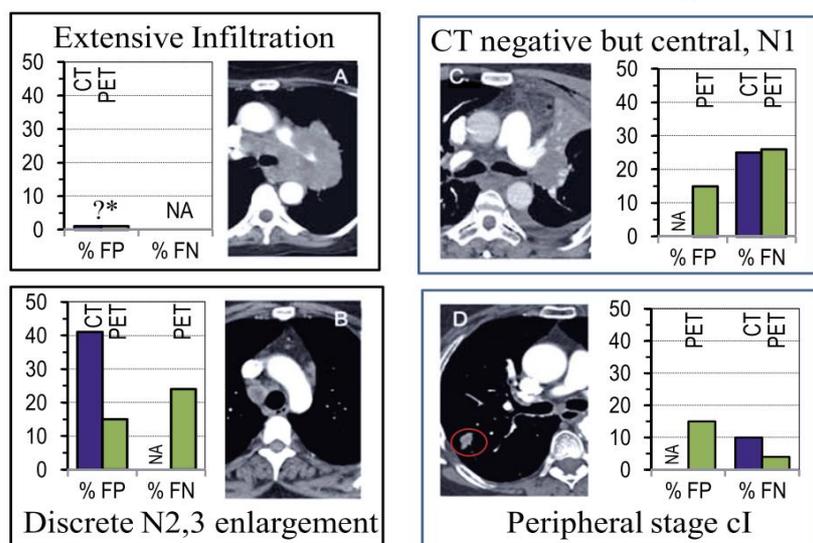
**Figura 10.** Grupos ganglionares accesibles por EBUS o EUS.  
Recuperado de Villman et al <sup>70</sup>.

### 3.3. UTILIDAD EN LA ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE PULMÓN

La ecobroncoscopia es la técnica inicial de elección para la estadificación ganglionar mediastínica mínimamente invasiva del cáncer de pulmón, por su alto rendimiento diagnóstico en la evaluación de los ganglios mediastínicos e hiliares. La estadificación por PATB-EBUS debe ser sistemática, y se recomienda empezar por las estaciones N3, seguidas de las N2, y finalmente las N1 cuando sea necesario, y se deben de puncionar cualquier ganglio de tamaño  $\geq 5\text{mm}$ , así como obtener muestras de al menos 3 estaciones N2/3 muestreadas<sup>59,62</sup>.

Un metaanálisis que incluyó 1066 pacientes, y que valoró el rendimiento diagnóstico de la PATB-EBUS frente a la TAC y la PET-TC, obtuvo una sensibilidad del 90%, especificidad de 98%, VPP de 99% y VPN de 93% <sup>74</sup>.

Las guías clínicas de la ACCP para la estadificación del a CP establecen 4 grupos basados en los hallazgos de la TAC, lo que orientan a valorar la necesidad de confirmación cito-histológica (Fig. 11, Tabla 9)<sup>59</sup>.



**Figura 11.** Grupos de afectación mediastínica. Adaptado de Silvestri et al<sup>59</sup>.

Grupo	Descripción	Prevalencia N2/N3 (%)	¿Se requiere estadificación ganglionar histológica?
A	Extensa afectación mediastínica.	100%	No. Sólo diagnóstico.
B	Leve afectación mediastínica.	60%	Si
C	Mediastino normal, pero tumor central o sospecha de N1.	20-25%	Si
D	Tumor periférico. Mediastino e hilio normal.	5-10%	No. Realizar tratamiento directamente, si PET-TC negativo.

**Tabla 9.** Indicaciones para la confirmación cito-histológica en la estadificación mediastínica, basados en hallazgos de TAC tórax.

Al comparar la EBUS con técnicas invasivas como la mediastinoscopia, algunos autores han comunicado que la sensibilidad de la PATB-EBUS para la detección de metástasis mediastínicas e hiliares es equivalente o incluso superior, con una sensibilidad de la mediastinoscopia en el rango de 68 a 79%, respecto a 81-87% para la PATB-EBUS<sup>76,77</sup>.

En un estudio retrospectivo, se ha descrito una sensibilidad del 92,3% y un VPN del 96,3% de la PATB-EBUS para detectar afectación metastásica ganglionar en ganglios

radiológicamente no patológicos (< 10 mm)<sup>78</sup>. La prevalencia de metástasis ganglionar mediastínica (N2) oculta en los casos con mediastino normal por PET-TC y/o TAC puede llegar a ser de 17-22%<sup>79,80</sup>, y la PATB-EBUS puede llegar a detectar hasta un 40% de estos pacientes, y debe ser realizada particularmente en los pacientes que presentan afectación clínica N1<sup>81</sup>. Sin embargo, la necesidad de muestro de estaciones ganglionares hiliares e interlobares contralaterales (estaciones 10 y 11) no es del todo conocida, en casos sin afectación N3 mediastínica negativa por PET-TC<sup>82</sup>.

El uso combinado del EBUS y del EUS-B, como técnicas complementarias, permite el acceso a casi todas las estaciones ganglionares mediastínicas, con el consiguiente incremento de la sensibilidad, del VPN y del rendimiento diagnóstico (91,1%, 96,1%, 97,2%), respecto a cuando se realiza EBUS únicamente (84,4%, 93,3%, 95,1%)<sup>83</sup>.

### **3.4. UTILIDAD EN EL ESTUDIO MOLECULAR DEL CÁNCER PULMONAR**

La identificación de diferentes alteraciones oncogénicas en el CPNCP puede conducir a la elección de un tratamiento específico, y ser a la vez un factor pronóstico. La utilidad de las muestras citológicas obtenidas mediante PATB-EBUS para el estudio molecular ha sido valorada en diferentes estudios<sup>84-89</sup>, siendo factible en el 70-90% de los casos, pero para biomarcadores aislados. Sin embargo, con el avance de estos tratamientos cada vez se precisa mayor cantidad de material cito-histológico para el análisis de un mayor número de posibles dianas moleculares o resistencias.

En el año 2014, se publicaron las guías para la adquisición y preparación de muestras obtenidas a partir de PATB-EBUS, para el diagnóstico y estudio molecular del CPNCP. Esa guía estableció que las diferentes muestras citológicas (extensión o bloque celular) son adecuadas para utilizarse en el estudio molecular, pero su utilidad va a depender de la representabilidad de la muestra (número de células tumorales viables, porcentaje tumoral) y de la sensibilidad de la prueba molecular. Asimismo recomienda realizar 4 punciones del ganglio para obtención de material tumoral. No observó diferencias en función de las técnicas de sedación usadas, el tiempo de la prueba, el tipo de aguja, o el número de pases por cada punción<sup>90</sup>.

Más recientemente, las guías de manejo terapéutico del CPNCP avanzado han incorporado el tratamiento con inmunoterapia como los inhibidores del PD-L1 (*programmed cell death protein 1*), por lo que su determinación es importante en este grupo de pacientes<sup>37</sup>. Un estudio reciente ha demostrado que las muestras citológicas obtenidas por PATB- EBUS son adecuadas para su detección con una elevada tasa de éxito<sup>91</sup>. En el mismo sentido, se ha evaluado la factibilidad de técnicas de NGS (*next generation sequencing*) en muestras citológicas obtenidas por PATB-EBUS, demostrando similar concordancia cuando se realiza técnicas de PCR o FISH para cada gen<sup>82</sup>. Sin embargo, el NGS nos brinda más información de posibles alteraciones genéticas, pero se precisan de mayores estudios para la validación de estos hallazgos.



## **II. HIPOTESIS**

## **HIPOTESIS**

- La determinación de la prevalencia de afectación ganglionar N3 (mediastínica o hiliar/interlobar) en pacientes sin afectación mediastínica por PET-TC (N0/N1) mediante la estadificación sistemática por PATB-EBUS, nos ayudará a valorar la utilidad de estadificación sistemática en este subgrupo de pacientes.
- La obtención de muestras citológicas a partir de adenopatías mediastínicas e hiliares y/o masas tumorales centrales en los pacientes con CPNCP avanzado mediante PATB-EBUS y/o PAAF-EUS-B, podrían ser suficientes para la determinación de 7 alteraciones moleculares cuando se optimiza el tipo muestra citológica (bloques celulares y/o extensiones en membrana).



### **III. OBJETIVOS**

## **OBJETIVOS**

- 1.** Analizar la utilidad y rendimiento diagnóstico de la estadificación mediastínica sistemática mediante la PATB-EBUS en pacientes con CPNCP sin afectación mediastínica por PET/TC (N0/N1).
- 2.** Determinar la prevalencia de afectación ganglionar N3 (mediastínica, hiliar e interlobar) en pacientes con cáncer de pulmón sin afectación mediastínica por PET/TC (N0/N1).
- 3.** Valorar las tasas de éxito (completo, parcial e individual) para la determinación de diferentes alteraciones moleculares (EGFR, KRAS, ALK, ROS-1, ERBB2, BRAF y MET), a partir de diferentes muestras citológicas (bloques celulares y/o extensiones en membrana o extensiones silanizadas) obtenidas mediante PATB-EBUS y/o PAAF-EUS-B en pacientes con CPNM avanzado.
- 4.** Valorar diferentes muestras citológicas obtenidas por ecobroncoscopia para el estudio molecular en pacientes con CPNCP.



## **IV. MATERIAL Y METODOS**

## **1. ARTICULO 1**

# **Is it necessary to sample the contralateral nodal stations by EBUS-TBNA in patients with lung cancer and clinical N0/N1 on PET-CT?**

Pere Serra, Carmen Centeno, José Sanz-Santos, Mohamed Torky, Sonia Baeza, Leire  
Mendiluce, Carlos Martínez-Barenys, Pedro López de Castro, Jorge Abad, Antoni  
Rosell, Felipe Andreo

Lung Cancer 2020 Apr;142:9-12

Impact Factor:4,670

DOI: 10.1016/j.lungcan.2020.01.014

## RESUMEN

**Objetivos:** La estadificación mediastínica sistemática (muestreo de todos los ganglios visibles que miden  $\geq 5$  mm desde la estación N3 a la N1), independientemente de la PET/TC (tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada) mediante aspiración con aguja transbronquial por ultrasonido endobronquial (PATB-EBUS) es un paso decisivo en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeña (CPCNP). Analizar la prevalencia de la enfermedad N3, así como de la utilidad de la estadificación sistemática en el subgrupo de pacientes que se sometieron a la estadificación PATB-EBUS sin mostrar lesiones mediastínicas en la PET/TC (N0/N1).

**Material y métodos:** Se realizó un análisis retrospectivo de una base de datos recolectada prospectivamente que incluyó a 174 pacientes con un diagnóstico final de CPCNP, con enfermedad N0/N1 en la PET/CT que se sometieron a una estadificación sistemática de PATB-EBUS.

**Resultados:** Se incluyeron 174 pacientes consecutivos. La PATB-EBUS sistemática detectó afectación mediastínica N2 en 21 (12%) casos, y no se detectaron casos de enfermedad N3 (ni hiliares ni mediastínicos). De los 153 pacientes restantes N0/N1 mediante la PATB-EBUS, 122 se sometieron a resección pulmonar que reveló 4 casos de enfermedad N2, mientras que se confirmó que 117 eran N0/N1. Treinta y tres pacientes con enfermedad N0/1 mediante la PATB-EBUS, no se sometieron a cirugía y fueron excluidos para el cálculo del VPN. La sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo negativo (VPN), el valor predictivo positivo (VPP) y la precisión diagnóstica del EBUS sistemático fue del 84%, 100%, 96,7%, 100% y 97% respectivamente.

**Conclusión:** La PATB-EBUS sistemática es un método muy preciso para la estadificación de los ganglios linfáticos en pacientes con CPNCP sin afectación mediastínica en la PET/TC. A la espera de más estudios, la ausencia de compromiso ganglionar hilar contralateral en nuestra serie, cuestiona la necesidad de un muestreo hilar contralateral en este subgrupo de pacientes.





## Is it necessary to sample the contralateral nodal stations by EBUS-TBNA in patients with lung cancer and clinical N0 / N1 on PET-CT?



Pere Serra<sup>a,b,\*</sup>, Carmen Centeno<sup>a,b</sup>, José Sanz-Santos<sup>c,d</sup>, Mohamed Torky<sup>a</sup>, Sonia Baeza<sup>a</sup>, Leire Mendiluce<sup>a</sup>, Carlos Martínez-Bareny<sup>c</sup>, Pedro López de Castro<sup>c</sup>, Jorge Abad<sup>a</sup>, Antoni Rosell<sup>a,b</sup>, Felipe Andreo<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Pulmonology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Spain

<sup>c</sup> Pulmonology Department, Hospital Universitari Mutua de Terrassa, Terrassa, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Universitat de Barcelona, Facultat de Medicina, Spain

<sup>e</sup> Thoracic Surgery Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Lung cancer  
Staging lung cancer  
Endobronchial ultrasound  
EBUS staging  
Systematic EBUS

### ABSTRACT

**Objectives:** Systematic mediastinal staging (sampling all visible nodes measuring  $\geq 5$  mm from N3 station to N1, regardless of PET/CT (positron emission tomography/computed tomography) by endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) is a decisive step in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). We analyzed the prevalence of N3 disease and the utility of systematic staging in the subgroup of patients who underwent EBUS-TBNA staging without showing mediastinal lesions on the PET/CT (N0/N1).

**Material and methods:** We conducted a retrospective analysis of a prospectively collected database that included 174 patients with a final diagnosis of NSCLC, with N0/N1 disease on PET/CT who underwent a systematic EBUS-TBNA staging.

**Results:** 174 consecutive patients were included. Systematic EBUS-TBNA detected N2 mediastinal involvement in 21 (12 %) cases, and no cases of N3 disease were detected (neither hilar nor mediastinal). Of the remaining 153 patients N0/N1 EBUS-TBNA, 122 underwent lung resection that revealed 4 cases of N2 disease while 117 were confirmed to be N0/N1. Thirty-three patients with N0/1 disease after EBUS-TBNA did not undergo surgery and were excluded for the NPV calculation. Sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) and overall accuracy of systematic EBUS was 84 %, 100 %, 96.7 %, 100 % and 97 % respectively.

**Conclusion:** Systematic EBUS-TBNA is a very accurate method for lymph node staging in patients with NSCLC without mediastinal involvement on PET/CT. Pending more studies, the absence of contralateral hilar nodal involvement in our series, questions the need for a contralateral hilar sampling in this subgroup of patients.

### 1. Introduction

In patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), accurate mediastinal lymph node of staging becomes crucial to determine the prognosis of the disease and the choice of treatment [1]. Computerized tomography (CT) and Positron Emission Tomography CT (PET/CT) with 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) are usually the initial non-invasive staging techniques, followed by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA), a minimally invasive procedure with great diagnostic accuracy [2].

The European Respiratory Society (ERS), the European Society of

Thoracic Surgeons (ESTS) and the European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) joint guidelines for preoperative staging of NSCLC recommends EBUS-TBNA as a first choice technique for invasive mediastinal staging [3,4]. According to these guidelines, as a minimum requirement, EBUS-TBNA should sample at least three different mediastinal nodal stations (4 R, 4 L, 7) in patients with NSCLC and an abnormal mediastinum by CT or CT-PET (Recommendation grade D) [4]. Other authors have proposed to perform systematic nodal sampling: sample all lymph nodes measuring  $\geq 5$  mm, with a minimum of three N2/N3 stations, starting with contralateral N3 nodal stations, followed by N2 stations and finally N1 lymph nodes when required [5,6]. A

\* Corresponding author at: Pulmonology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet S/N, 08916, Badalona, Barcelona, Spain.  
E-mail address: [pereserra11@hotmail.com](mailto:pereserra11@hotmail.com) (P. Serra).

<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.01.014>

Received 26 July 2019; Received in revised form 7 January 2020; Accepted 11 January 2020  
0169-5002/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

recent study has demonstrated that, in patients with a PET/CT showing N2 disease, systematic EBUS-TBNA procedure has obtained more clinically relevant information (in 13 % of cases) compared with sampling only FDG-avid nodes [7].

In absence of mediastinal involvement on PET/CT the reported prevalence of occult mediastinal lymph node disease is about 15–20 %, thus a histological confirmation is required [4,8–10]. Several clinical features have been associated with a greater risk of hidden mediastinal lymph node disease in a normal PET/CT like: N1 involvement on PET/CT, central-located tumors, primary tumor without FDG uptake and tumors measuring more than 3 cm in the long axis [2,4,11]. A recent meta-analysis that included patients with normal mediastinum undergoing EBUS-TBNA showed a pooled prevalence of mediastinal nodal involvement of 12.8 %, with a 7 % probability of having an occult metastasis after a negative EBUS-TBNA [19].

As the exactly prevalence of N3 occult disease in patients with normal PET/CT is unknown [5,12–14], it raises the question whether some nodal stations, especially in case of hilar N3 stations, could be spared from sampling in patients with normal mediastinum on PET/CT. Recently, a review by Murgu [11] questions the importance of assessing the N3 hilar stations, concluding that studies in this field are needed.

The aim of this study is to evaluate the diagnostic performance of systematic EBUS-TBNA (sampling all visible lymph nodes > 5 mm by ultrasonography, from station N3 to N1) in NSCLC patients without mediastinal involvement on PET/CT (N0/N1) and describe the prevalence of N3 disease (both hilar and mediastinal) in this group.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Design

This is a retrospective analysis of a prospectively collected single-center database that included consecutive patients with final diagnosis of NSCLC without mediastinal involvement on PET/CT who underwent systematic EBUS-TBNA for mediastinal staging.

### 2.2. Patients

Patients with confirmed NSCLC without mediastinal involvement on PET/CT who underwent systematic EBUS-TBNA for mediastinal staging from January 2010 to June 2017 were included. All the patients met the criteria of hidden mediastinal disease including: N1 disease, central tumor or tumor > 3 cm [2,4,11]. Normal mediastinum on PET/CT was defined when none of the nodes showed an absolute maximum value of standardized uptake (SUVmax)  $\geq$  2.5, and/o a ratio between the SUVmax of the mediastinal lymph nodes divided by the SUVmax of the tumor of  $\geq$  0.5 [4,13,14]. All patients signed written informed consents and the study was approved by the Ethic Committee.

Patients without mediastinal disease after EBUS-TBNA underwent mediastinoscopy and/or lung resection surgery, according to the tumor board decision of our center. Inoperable patients were excluded for the analysis of NPV. Systematic nodal dissection (SND) during lung resection surgery was considered the gold standard [15]. SND

### 2.3. Lymph node sampling

Systematic EBUS-TBNA staging included sampling of any lymph node measuring  $\geq$  5 mm starting from N3 hilar stations, followed by mediastinal N3 stations, then N2 stations and finally N1 stations as long as the rapid on-site examination (ROSE) by the pathologist did not detect malignancy [10,19]. If N3 disease was detected, the procedure was then terminated. In case of N2 involvement, the needle was changed, and the sampling proceeded to the rest of N2 stations.

Linear EBUS was performed (BFUC180 F, Olympus Optical Co Ltd., Tokyo, Japan), under local anesthesia and sedation, using topical lidocaine spray and intravenous midazolam, propofol, and/or fentanyl in

accordance with standard recommendations [16]. All mediastinal, hilar and lobar nodes with a short-axis of  $\geq$  5 mm identified during the procedure were targeted under direct ultrasound visualization with a EBUS-TBNA 22-gauge cytology needle (NA-201SX-4022, Olympus Optical Co Ltd.) [17], under negative pressure.

### 2.4. Pathological examination

The aspirated material was placed on slides and examined *in situ* by the pathologist (rapid on-site evaluation, ROSE) using rapid hematoxylin, who evaluate the viability of the sample, and classified them as “normal tissue”, “malignant”, or “non-satisfactory” [18].

### 2.5. Statistical analysis

Data were entered into a database and analyzed using SPSS software (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: SPSS Inc). Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies, continuous variables as means plus standard deviation (SD), and non-normally distributed data as medians plus interquartile range (IQR).

The sensitivity, specificity, NPV, PPV and overall accuracy of systematic EBUS-TBNA staging were calculated. In patients who EBUS-TBNA showed mediastinal disease, the prevalence of disease N3 and N2 were evaluated separately.

## 3. Results

174 patients with normal mediastinum in PET/CT were included. Patient's characteristics are shown in Table 1. PET/CT showed N0 disease in 119 (68.3 %) patients and N1 disease in 55 (31.7 %). A median of 9 (Range 1–19) lymph nodes per patient and a median of 5 (Range 1–8) nodal stations (both hilar and mediastinal) per patient were sampled. No complications occurred during systematic EBUS-TBNA.

EBUS-TBNA did not show any case of N3 disease, neither hilar nor mediastinal (Fig. 1). In 21 patients (12 %) systematic EBUS-TBNA diagnosed N2 disease (20 cases N2a, 1 case N2b) and were excluded for surgery, while the remaining 153 patients (87.9 %) were staged as N0/N1 after EBUS-TBNA. Of these 153 patients, 32 inoperable patients (for poor lung function or comorbidities), underwent radiotherapy, Stereotactic Ablative Body Radiosurgery (SABR) or palliative treatment. 121 patients (88 N0 and 33 N1 after EBUS) underwent lung resection with SND, with a median of 20.08 lymph nodes (Range 14–25) and a median of 5.23 nodal stations (Range 5–6). SND confirmed N0/N1 disease in 117 (96.7 %) patients and N2 disease in 4 patients (3.3 %). In 3 out of these 4 patients the nodes were not reachable by EBUS-TBNA (stations

**Table 1**  
Patients characteristics.

Patients characteristics	
Age (mean; SD)	67.26 years (SD 8.67)
Sex (n; %)	
Female	147 (84.5 %)
Male	27 (15.5 %)
Histological diagnosis (n; %)	
Adenocarcinoma	80 (46 %)
Squamous-cell carcinoma	69 (39.7 %)
Large-cell carcinoma	3 (1.7 %)
NSCLC not specified	22 (12.6 %)
Tumor location (n; %)	
Right upper lobe	63 (36.2 %)
Middle lobe	10 (5.7 %)
Right lower lobe	32 (18.4 %)
Left upper lobe	53 (30.5 %)
Left lower lobe	16 (9.2 %)

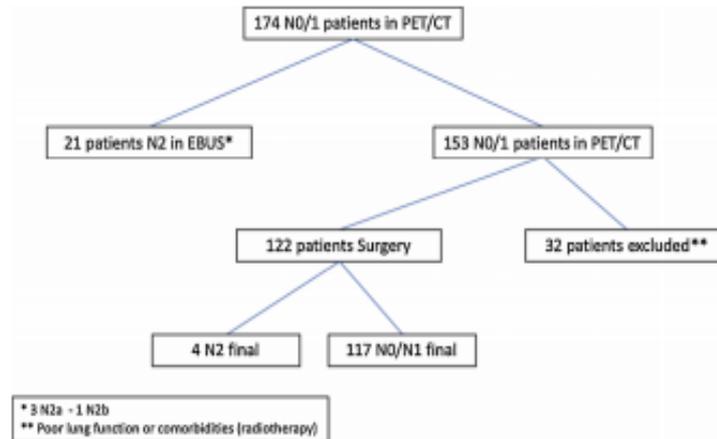


Fig. 1. Patients results.

5 and 6), thus cannot be considered a really false negative result for the technique but a technical limitation. Four patients underwent mediastinoscopy before SND (tumor board decision for patients comorbidity), that resulted negative for mediastinal disease (Fig. 1).

Twenty-five patients presented N2 disease: 21 diagnoses by means of systematic EBUS-TBNA and 4 patients through SND. Thus, the prevalence of N2 disease in our series was 14.4 %, of these, only 3 patients (12.5 %) presented enlarged mediastinal nodes on CT. The prevalence of N2 disease was higher in patients with N1 disease in PET/CT than in those with N0 disease (29 % vs 7.56 %). There was no cases of hilar or mediastinal N3 disease. The prevalence of N2 disease was higher in patients with N1 disease in PET/CT than in those with N0 disease (29 % vs 7.56 %). The sensitivity, specificity, NPV, PPV and diagnostic accuracy of systematic EBUS-TBNA in patients with normal mediastinum, was 84 %, 100 %, 96.7 %, 100 % and 97 % respectively.

#### 4. Discussion

Our study on NSCLC patients without evidence of mediastinal disease on PET/CT who underwent a systematic EBUS-TBNA staging, demonstrates an absence of contralateral mediastinal and hilar disease (N3). It can be suggested that, pending on further studies, during systematic EBUS-TBNA staging procedure in patients with normal mediastinum on PET/CT, sampling of hilar N3 stations could be spared. This would mean minimizing anesthesia time, effort and possible complications of unnecessary samplings during EBUS-TBNA. A previous review [11] has questioned the need for analysis of contralateral N3 in staging NSCLC, asked if it is necessary to puncture the contralateral stations 10 and 11 and demanded more evidence that address this point. Considering these results, we believe we could assess the possibility of not puncturing the N3 station, at least hilar, in the procedures of patients with normal mediastinum, and thus minimizing the time of exploration, reducing the time of sedation, and the number of punctures.

In the last year two meta-analysis focused on EBUS-TBNA in patients with normal mediastinum on PET/CT have been published. Both have showed figures of NPV over 90 % but with poor results in sensitivity (49 %). In one of this meta-analysis more than a half of the patients had  $\geq 2$  sampled nodes per patient during EBUS-TBNA, which is a number that we consider insufficient. In our series, a median of 9 nodes and a median of 5 nodal stations per patient were sampled during systematic EBUS-TBNA to obtain a sensitivity of 84 %. In our opinion, in this population only with high level of thoroughness is possible to achieve high figures of sensitivity. In both meta-analysis, the described prevalence of occult mediastinal disease ranged from 6 to 24 % [19,22].

Some of the studies included in these two meta-analysis did not

differentiate between N2 and N3 disease, while those that differentiated between N2 and N3 reported a pooled prevalence of N3 disease always lower than 1 %. Furthermore, studies that investigated the usefulness of other invasive staging methods in patients with N0/1 on PET/CT have also described a low prevalence of N3 disease [20,21].

Our study specifically analyzes the contralateral N3 station hilar. Additionally, our study showed a prevalence of 14 % of hidden N2 in patients with normal mediastinum on PET/CT, which coincides with a previous series [8–10]. It has already been demonstrated that EBUS-TBNA is a safe and effective method for the diagnosis of mediastinal disease [9,10].

Proceeding or not to mediastinoscopy after a negative EBUS-TBNA is a question for debate. Given that the reported NPV for EBUS-TBNA in patients with N0/1 disease on PET/CT is very high, patients could directly proceed to lung resection [19]. Some authors suggest that mediastinoscopy is not required preoperatively in patients with radiologically normal mediastinum and negative EBUS-TBNA [19]. In our series, only four patients, with impaired lung function and expected pneumonectomy underwent cervical mediastinoscopy to gain confidence before surgery. Mediastinoscopy did not confirm mediastinal involvement in any of the four mentioned patients. In our study, only four out of 121 patients who underwent lung resection surgery presented N2 disease. Three of these patients presented nodal involvement in stations not reachable by EBUS-TBNA. Our results confirm that, in patients with N0/1 disease on PET/CT, the posttest probability of mediastinal involvement after a negative systematic EBUS-TBNA staging is so low (NPV 96.7 %) and the benefit of proceeding to mediastinoscopy is controversial. In this sense, a recent study comparing EBUS-TBNA with mediastinoscopy did not show any cases of N3 hilar involvement, and only 3 cases of contralateral mediastinal involvement in station 5 [5].

In conclusion, our study demonstrates that systematic EBUS-TBNA is an accurate method for mediastinal lymph node staging in patients with NSCLC and normal mediastinum on PET/CT. The prevalence of N3 disease in our series was 0 %. Given this low prevalence, sampling of N3 hilar stations could be spared during a systematic EBUS-TBNA staging procedure in this clinical setting.

#### Declaration of Competing Interest

I declare on behalf of my co-authors and myself that we do not have any competing interests to declare.

#### References

- [1] H. Asamura, K. Chansky, J. Crowley, P. Goldstraw, V.W. Rusch, J.F. Vansteenkiste,

- et al., The international association for the study of lung cancer lung cancer staging project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming 8th edition of the TNM classification for lung cancer, *J. Thorac. Oncol.* 10 (December (12)) (2015) 1675–1684.
- [2] G.A. Silvestri, A.V. Gonzalez, M.A. Jantz, M.L. Margolis, M.K. Gould, L.T. Tanoue, et al., Methods for staging non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed. American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines, *Chest* 143 (May (Suppl. 5)) (2013) e211S–e250S.
- [3] P. Vilmann, P.F. Clemmesen, S. Colella, M. Siemsen, L.P. De, J.-M. Dumoneau, et al., Combined endobronchial and esophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European Respiratory Society (ERS) and the European Society of Thor, *Endoscopy* 47 (June (06)) (2015) 545–559.
- [4] P. De Leyn, C. Dooms, J. Kuzdzal, D. Lardinois, B. Passlick, R. Rami-Porta, et al., Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer, *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* 45 (May (5)) (2014) 787–798.
- [5] C. Dooms, K.G. Tournoy, O. Schuurbeers, H. Decaluwe, F. De Ryck, A. Verhagen, et al., Endosonography for mediastinal nodal staging of clinical N1 non-small cell lung cancer, *Chest* 147 (January (1)) (2015) 209–215.
- [6] M. Evison, P. Crosbie, N. Navani, M. Callister, R.C. Rintoul, D. Baldwin, et al., How should performance in EBUS mediastinal staging in lung cancer be measured? *Br. J. Cancer* 115 (October (8)) (2016) e9–e9.
- [7] J. Sanz-Santos, P. Serra, M. Toeky, F. Andreo, C. Centeno, I. Mendiluce, et al., Systematic compared with targeted staging with endobronchial ultrasound in patients with lung cancer, *Ann. Thorac. Surg.* 106 (August (2)) (2018) 398–403.
- [8] P. Ong, H. Grosu, G.A. Eapen, M. Rodriguez, D. Lazarus, D. Ost, et al., Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for systematic nodal staging of lung cancer in patients with N0 disease by computed tomography and integrated positron emission tomography–computed tomography, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 12 (March (3)) (2015) 415–419.
- [9] M. Shingyoji, T. Nakajima, M. Yoshino, Y. Yoshida, H. Ashinuma, M. Itakura, et al., Endobronchial ultrasonography for positron emission tomography and computed tomography–negative lymph node staging in non-small cell lung cancer, *Ann. Thorac. Surg.* 98 (November (5)) (2014) 1762–1767.
- [10] M.R. Vial, O.J. O’Connell, H.B. Grosu, M. Hernandez, L. Noor, R.F. Casal, et al., Diagnostic performance of endobronchial ultrasound-guided mediastinal lymph node sampling in early stage non-small cell lung cancer: a prospective study, *Respirology* 23 (January (1)) (2018) 76–81.
- [11] S.D. Murgu, Diagnosing and staging lung cancer involving the mediastinum, *Chest* 147 (5) (2015) 1401–1412.
- [12] F.J.F. Herth, R. Eberhardt, M. Krasnik, A. Ernst, Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration of lymph nodes in the radiologically and positron emission tomography-normal mediastinum in patients with lung cancer, *Chest* 133 (April (4)) (2008) 887–891.
- [13] D. Hellwig, T.P. Graeter, D. Ullena, A. Groeschel, G.W. Sybrecht, H.-J. Schaefers, et al., 18F-FDG PET for mediastinal staging of lung cancer: which SUV threshold makes sense? *J. Nucl. Med.* 48 (November (11)) (2007) 1761–1766.
- [14] M. Serra Fortuny, M. Gallego, L. Berna, C. Montón, L. Vigil, M.J. Masdeu, et al., FDG-PET parameters predicting mediastinal malignancy in lung cancer, *BMC Pulm. Med.* 16 (December (1)) (2016) 177.
- [15] P. Goldstraw, Report on the international workshop on intrathoracic staging, London, October 1996, *Lung Cancer* 18 (1997) 107–111.
- [16] I.A. Du Rand, J. Blaikley, R. Botton, N. Chaudhuri, V. Gupta, S. Khalid, et al., British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by NICE, *Thorax* 68 (August (Suppl. 1)) (2013) ii–44.
- [17] I. Garcia-Olivé, E. Monsó, F. Andreo, J. Sanz, E. Castellà, M. Llatjós, et al., Sensitivity of linear endobronchial ultrasonography and guided transbronchial needle aspiration for the identification of nodal metastasis in lung cancer staging, *Ultrasound Med. Biol.* 35 (August (8)) (2009) 1271–1277.
- [18] M. Alsharif, R.S. Andrade, S.S. Groth, E.B. Stelow, S.E. Pambuccian, Endobronchial ultrasound-guided transbronchial fine-needle aspiration: the University of Minnesota experience, with emphasis on usefulness, adequacy assessment, and diagnostic difficulties, *Am. J. Clin. Pathol.* 130 (September (3)) (2008) 434–443.
- [19] H. El-Osta, P. Jani, A. Mamsour, P. Rascoe, S.J. Endobronchial ultrasound for nodal staging of non-small cell lung cancer patients with radiologically normal mediastinum: a meta-analysis, *Ann. Am. Thorac. Soc.* 15 (July (7)) (2018) 864–874.
- [20] S. Call, C. Obiols, R. Rami-Porta, J.C. Trujillo-Reyes, M. Iglesias, R. Saumench, et al., Video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy for staging non-small cell lung cancer, *Ann. Thorac. Surg.* 101 (4) (2016) 1326–1333.
- [21] H. Decaluwe, C. Dooms, X.B. D’Journo, S. Call, D. Sanchez, B. Haager, et al., Mediastinal staging by videomediastinoscopy in clinical N1 non-small cell lung cancer: a prospective multicentre study, *Eur. Respir. J.* 50 (6) (2017) 1701493.
- [22] T.L. Leong, P. Loveland, A. Gorelik, et al., Preoperative staging by EBUS in cN0/N1 lung cancer systematic review and meta-analysis, *J. Bronchol. Intervent. Pulmonol.* 26 (July (3)) (2019) 155–165.



## **2. ARTICULO 2**

### **Molecular analysis in cytological samples obtained by endobronchial or oesophageal ultrasound guided needle aspiration in non-small cell lung cancer**

C. Centeno, P. Serra Mitja, M. Avila, E. Carcereny, A.M. Muñoz-Mármol, T. Morán, E.

Castellà, J. Sanz-Santos, I. García-Olivè, J.L. Ramirez Serrano, A. Rosell Gratacos, F.

Andreo García

Pulmonology 2020 Jun 2

Impact Factor: 2,096

DOI: 10.1016/j.pulmoe.2020.05.001

## RESUMEN

**Introducción:** Las muestras citológicas obtenidas mediante punción aspiración guiada por ecobroncoscopio (PATB-EBUS) son importantes en el estudio diagnóstico, estadiaje y perfil molecular en el carcinoma de pulmón no célula pequeña (CPNCP).

**Objetivo:** Valorar la tasa de éxito del estudio completo, parcial e individual de alteraciones moleculares en muestras ganglionares mediastínicas o masas pulmonares obtenidas por la PATB-EBUS y/o por vía esofágica con ecobroncoscopio (PAAF-EUS-B) en pacientes con CPNCP.

**Métodos:** Estudio prospectivo que incluyeron 90 pacientes con CPNM no escamoso, o escamosos no fumadores. Las muestras citológicas se distribuyeron en dos grupos. Grupo 1: extensiones en membrana y/o bloques celulares para la determinación de mutaciones de *EGFR*, *KRAS*, *ERBB2* y *BRAF*. Grupo 2: bloques celulares en silano para reordenamientos de *ALK*, *ROS-1* y amplificación de *MET*.

**Resultados:** La tasa de éxito para 4 alteraciones moleculares (*EGFR*, *KRAS*, *ALK* y *ROS-1*) fue 78,6%, mientras que para 7 determinaciones fue 44%. La tasa de éxito individual para *EGFR* fue 97%, *KRAS* 96,3%, *ALK* 85%, *ROS-1* 82,3%, *ERBB2* 71,4%, *BRAF* 67,7% y *MET* 81,1%. No se evidenciaron diferencias significativas ( $p=0.489$ ) en el número de determinaciones moleculares (1-3 vs. 4) en el grupo 1, en función de los tipos de muestras (bloque celular vs. membrana vs. bloque celular y membrana).

**Conclusiones:** En pacientes con CPCNP, el material citológico obtenido mediante la PATB-EBUS y/o la PAAF-EUS-B es suficiente para el estudio molecular individual y parcial en la gran mayoría de los casos. Las extensiones en membrana como los bloques celulares son muestras válidas para análisis molecular.



ORIGINAL ARTICLE

## Molecular analysis in cytological samples obtained by endobronchial or oesophageal ultrasound guided needle aspiration in non-small cell lung cancer

C. Centeno<sup>a,b,\*</sup>, P. Serra Mitja<sup>a,b</sup>, M. Avila<sup>c</sup>, E. Carcereny<sup>d</sup>, A.M. Muñoz-Mármol<sup>c</sup>, T. Moran<sup>d</sup>, E. Castellà<sup>c</sup>, J. Sanz-Santos<sup>a</sup>, I. García-Olivè<sup>a</sup>, J.L. Ramirez Serrano<sup>d</sup>, A. Rosell Gratacos<sup>a,b,e</sup>, F. Andreo García<sup>a,b,e</sup>

<sup>a</sup> Bronchoscopy Unit, Pulmonology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Pathology Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Oncology Department, Badalona Applied Research Group in Oncology (B-ARGO), Institut Català d' Oncologia, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> CIBERES, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain

Received 4 February 2020; accepted 3 May 2020

### KEYWORDS

Lung cancer;  
Molecular analysis;  
EBUS-TBNA;  
EUS-B-FNA;  
Cell block;  
PEN membrane slide

### Abstract

**Introduction:** Cytological samples obtained by endobronchial ultrasound (EBUS) are capital for diagnosis, staging and molecular profile in non-small cell lung carcinoma (NSCLC).

**Objective:** To assess the success rate of complete, partial and individual of molecular analysis in samples obtained by EBUS-guided transbronchial needle aspiration (TBNA) and/or by oesophageal ultrasound-guided fine needle aspiration with an echobronchoscope (EUS-B-FNA) in patients with NSCLC.

**Methods:** Prospective study including 90 patients with non-squamous NSCLC, or non-smoking squamous. Cytological samples were classified into two groups. Group 1: PEN membrane slide and/or cell blocks for the determination of mutations of EGFR, KRAS, ERBB2 and BRAF. Group 2: silane coated slides or cell blocks for rearrangements of ALK, ROS1 and MET amplification.

**Results:** The success rate was 78.6% for 4 molecular alterations (EGFR, KRAS, ALK and ROS1), and 44% for 7 determinations. The individual success rate for EGFR was 97%, KRAS 96.3%, ALK 85%, ROS1 82.3%, ERBB2 71.4%, BRAF 67.7% and MET 81.1%. There were no significant differences ( $p = 0.489$ ) in the number of molecular analyses (1–3 vs. 4) in group 1, depending on the types of samples (cell block vs. PEN membrane slide vs. cell block and PEN membrane slide).

\* Corresponding author.

E-mail address: [cacenclemente2013@gmail.com](mailto:cacenclemente2013@gmail.com) (C. Centeno).

<https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.001>

2531-0437/© 2020 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article in press as: Centeno C, et al. Pulmonol. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.001>

**Conclusions:** In patients with NSCLC, the cytological material obtained by ultrasound-guided needle aspiration is sufficient for individual and partial molecular analysis in the vast majority of cases. Membrane slides such as cell blocks are valid samples for molecular analysis.

© 2020 Sociedade Portuguesa de Pneumologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introduction

Lung cancer is the most frequent malignant neoplasm and the main cause of cancer mortality.<sup>1</sup> NSCLC accounts for 85% of all lung cancers, with adenocarcinoma as the most prevalent histological subtype.<sup>1,2</sup> Currently, the identification of different oncogenic alterations leads to oncospecific treatment which improves the overall response rate and progression-free survival in this group of patients.<sup>3,4</sup>

The diagnostic and/or staging process includes different minimally invasive and invasive techniques to obtain cytological and/or histological material, which provides differentiation of the histological subtype and identification of molecular markers according to treatment guidelines.<sup>5,6</sup> EBUS-TBNA is a cost-effective tool for obtaining cytological samples safely, less invasively, and with a lower complication rate, when compared to surgical techniques.<sup>7,8</sup> Several studies have shown that the performance of isolated molecular determinations is feasible in 70–90% of samples obtained by EBUS-TBNA.<sup>9,10</sup> Nevertheless, for newer onco-targeted treatments, a greater amount of cyto/histological material is required in order to analyse a greater number of possible molecular targets or resistances.

The main objective of our study was to assess the success rate in the determination of molecular alterations (EGFR – epidermal growth factor receptor, KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, ALK – anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase, ROS1 – proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS, ERBB2 – erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, BRAF – v-Raf murine sarcoma oncogene homolog B1 and MET – tyrosine-protein kinase Met) in a complete, partial and individual way, from samples obtained by EBUS-TBNA and/or EUS-B-FNA in patients with NSCLC. The secondary objectives of this study were to study its prevalence in our population, and to compare the usefulness of different cytological samples for mutation analysis.

## Methods

### Patients

This is an observational prospective study conducted in a tertiary hospital in patients with suspected or known NSCLC undergoing EBUS-TBNA and/or EUS-B-FNA for diagnosis and/or staging study, from January 2013 to December 2016. The inclusion criteria were patients with advanced stages (IIIB, IV), or stage IIIA non-tributary of surgical treatment, and cases with suspected recurrence or disease progression, in the absence of an active treatment.

Current smokers with squamous carcinoma were excluded. Our study was approved by the Ethics Committee of our hospital (PI-14-073), and the patients signed informed consent forms.

### Procedures

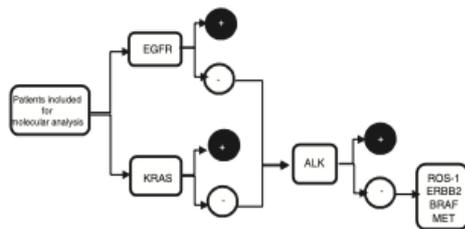
TBNA or FNA were performed under local anaesthesia with lidocaine, and with moderate sedation with midazolam, propofol and/or remifentanyl. The convex probe EBUS (UC 180F, Olympus Optical Co Ltd., Tokyo, Japan) was used, and sampling was performed with the 22-gauge cytology needle (NA2015X-4022; Olympus Optical Co, Tokyo, Japan). Mediastinal and/or hilar nodes with a diameter of the minor axis  $\geq 5$  mm and central masses were punctured. The bronchoscopist proceeded from nodes in regions corresponding to N3 disease to regions of N1 disease.<sup>8</sup> We performed 1–7 punctures per node and/or mass with a maximum of 15 revolutions per puncture, and negative pressure was used ( $-20$  cmH<sub>2</sub>O) in most cases.

### Preparation of cytological samples

The aspirates obtained were placed on slides, fixed with 96% ethanol and stained with haematoxylin. Rapid on-site evaluation (ROSE) was performed by a cytopathologist. Aspirates were considered satisfactory with the following criteria: (1) Benign: 40 lymphocytes per high-power field in cellular areas of the smear and/or clusters of pigmented macrophages without evidence of malignant cells or (2) Metastatic: presence of malignant cells. Samples were considered inadequate if they showed only bronchial/oesophageal cells, erythrocytes or necrotic tissue.

From the metastatic aspirate, two cell blocks  $\pm$  PEN (polyethylene naphthalate) membrane slide (Carl Zeiss, membrane slide NF 1.0 PEN, Germany) were prepared, and if it was not feasible (even with procoagulants), 4 extensions were performed on silane coated slides, and 1 PEN membrane slide. The cell blocks were prepared by air-drying the slides to clot, fixed in 10% formalin, and subsequently analysed in laboratory. Blocks were included in paraffin and sectioned (4  $\mu$ m thickness, 8–10 slides), two for with haematoxylin–eosin staining, two slides for immunohistochemistry staining (IHC) such as thyroid transcription factor 1 (TTF-1) and/or p40, the remaining slides were later used for sequential molecular analysis (Fig. 1).

The samples obtained were divided into two groups. Group 1: PEN membrane slide and/or cell blocks and were used to perform PCR for molecular analysis of EGFR, KRAS, BRAF and ERBB2. Group 2: silane coated slide or cell blocks



**Figure 1** Algorithm of sequential molecular analysis. EGFR: epidermal growth factor receptor; KRAS: kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; ALK: anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase; ROS1: protooncogene tyrosine protein kinase ROS; ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; BRAF: v-Raf murine sarcoma oncogene homolog B1; MET: tyrosine-protein kinase Met.

and were used to perform FISH techniques for ALK, ROS1, and MET studies.

### Laboratory methods

#### Detection of EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2 genes mutations

The polymerase chain reaction (PCR) technique was used from cell blocks or membrane slides, where tumour cell extraction was performed using laser microdissection techniques (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Germany). DNA was extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol. If tumour cells were <200, a lysis buffer with proteinase K compatible with the PCR buffer was used (Ecogen, Barcelona, Spain). For the determination of deletions of exon 19 of the EGFR, the GeneScan technique (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA) was used, while for the detection of the L858R mutation of exon 21 and T790M of exon 20 the Taqman technique was used (Applied Biosystems).

Genomic *KRAS* codons 12 and 13 mutations were assessed by the Sanger technique. Taqman technique was used for V600 mutations in BRAF and exon 20 in ERBB2.

#### Detection of ALK, ROS1 genes rearrangements and MET gene amplification

Fluorescence in situ hybridisation (FISH) was used with the following probes: the Vysis ALK Break-Apart (Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL, USA) for ALK, ZytoLight® SPEC ROS1 Dual Color Break Apart (ZytoVision, Bremerhaven, Germany) for ROS1, and ZytoLight® MET/CEP 7 Dual Color (ZytoVision, Bremerhaven, Germany) for MET. After dewaxing, the slides were processed with the Histology FISH Accessory kit (Dako, Denmark) and hybridisation titration was carried out with an Olympus BX51 fluorescence microscope. A minimum of 50 tumour cells was necessary. For ALK and ROS1 genes rearrangements, samples were considered positive when  $\geq 15\%$  of the cells showed a positive hybridisation pattern. For the MET gene, the criteria described by Noonan et al.<sup>11</sup> was used according to a ratio of MET/centromere  $\geq 1.8$ .

### Statistical analysis

Categorical variables were expressed in relative and absolute frequencies; continuous variables in mean and standard

deviation when they presented a normal distribution, or as median and interquartile range when they did not present a normal distribution.

The success rate for the complete or individual molecular analysis in the samples obtained by EBUS-TBNA or EUS-B-FNA was calculated. The relationships between categorical variables were analysed using the chi-square test or Fisher's exact test. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Data were analysed using IBM SPSS software version 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

### Patient characteristics

Ninety patients were included in the study. In 54 cases (60%), EBUS/EUS-B was the first diagnostic procedure performed. Seventy-one patients (78.9%) had a diagnosis of adenocarcinoma. Baseline characteristics are shown in Table 1.

Of the 12 pulmonary lesions (24–63 mm of short-axis diameter) and 329 hilar and/or mediastinal lymphadenopathies punctured, 114 (30.6%) were malignant. The most frequently punctured metastatic lymph nodes stations were 7 (33), 4R (30), 4L (12) and 10/11/12 (11). The mean short-axis diameter of the lymph node was  $13.3 \pm 6.8$  mm and the average number of punctures per node was 3 (range 1–7).

### Histological subclassification

In 35 cases (39%), the final diagnosis was obtained by morphological assessment, while IHC (TTF-1, p40) was used in 53 (58.9%). A definitive subtyping (morphology and/or IHC) was achieved in 82.2% vs. 17.8% of carcinoma NOS (not otherwise specified). In this subgroup of 14 cases, both morphological assessment and IHC were inconclusive, while in 2 cases IHC was not performed because the material for the molecular analysis was prioritised.

### Molecular analysis

In 96.7% cases it was feasible to start the sequential molecular analysis. The samples obtained were insufficient in the remaining 3 cases: one corresponded to re-staging (difficulty obtaining viable material post neoadjuvant inflammatory changes), and silane coated slides and PEN membrane slides did not contain enough tumour cells for molecular detection in the other two. In the first case, the patient underwent palliative treatment due to deterioration of general condition, while in the other two cases a second procedure was performed [puncture of the primary mass by CT-guided percutaneous transthoracic needle biopsy (CT-guided PTNB) and by EBUS].

IHC was performed in both sufficient and insufficient samples for complete molecular analysis (65.5% vs. 60%,  $p = 0.115$ ).

A partial molecular analysis (EGFR, KRAS, ALK and ROS1) was performed in 78.6% of patients, while complete analysis was carried out in 44% of cases. Table 2 details the individual results for each molecular detection.

Please cite this article in press as: Centeno C, et al. Pulmonol. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.001>

**Table 1** General characteristics of patients.

Baseline characteristics	Patients (n = 90)
Age	65.2 ± 9.4
Sex, n (%)	
Male	74 (82.2%)
Smoking history, n (%)	
Never-smoker	8 (9%)
Former smoker	35 (38.8%)
Current smoker	47 (52.2%)
Histological type, n (%)	
Adenocarcinoma	71 (78.9%)
Squamous carcinoma	3 (3.3%)
Carcinoma NOS	16 (17.8%)
Stages, n (%)	
Inoperable IIIA	31 (34.4%)
Multi-level N2	11
Persistent N2	5
Poor lung function	11
Performance status 3–4	4
IIIB	16 (17.8%)
IV	43 (47.8%)
Procedure	
EBUS-TBNA	76 (84.4%)
EUS-B-FNA	11 (12.2%)
Both	3 (3.3%)
Molecular study, n (%)	
Yes	87 (96.7%)
No	3 (3.3%)
Final treatment	
Oncospecific	11 (12.2%)
Conventional (chemotherapy and/or radiotherapy)	62 (68.9%)
None → (rapid → progression → or → poor → performance)	17 (18.9%)

Carcinoma NOS (not otherwise specified) type; EBUS-TBNA (endobronchial ultrasound guided biopsy); EUS-B-FNA (oesophageal ultrasound-guided fine needle aspiration with an echobronchoscope).

Mutations in the EGFR genes were detected in thirteen cases (15%), 12 of them (92.3%) belonging to the adenocarcinoma subtype. Mean age was 67.8 ± 10 years, 38% were women, and 5 cases corresponded to never-smokers. The most frequent mutation was the deletion of exon 19 (54%).

### Molecular analysis by group

In group 1, it was feasible to carry out 4 determinations in 38 (44%), while only 1–3 mutations could be studied in 49 (56%). There were no significant differences in the number of molecular determinations (1–3 vs. 4) ( $p=0.489$ ) when separated by sampling subgroups between: (1) cell block, (2) PEN membrane slide, and (3) cell block and PEN membrane slide (Table 3).

In group 2, it was feasible (70/81) to carry out 3 determinations (ALK and/or ROS1 and/or MET) in 86%. Of these,

complete analysis was performed in 28 cases (34.6%), and only 2 in 38 cases (47%).

### Discussion

The results of our study showed that the cytological samples obtained by EBUS-TBNA or EUS-B-FNA, mainly cell blocks and PEN membrane slides, has had a high success rate for sequential molecular analysis, both partially and individually. The College of American Pathologists (CAP), the International Association for the study of Lung Cancer (IASLC) and the Association for Molecular Pathology (AMP) jointly issued guidelines for routine testing of biomarkers in lung cancer and recommended performing the EGFR, ALK and ROS1 genes rearrangements as a first step, and KRAS only if the studies of the first step are negative.<sup>6</sup> In our series, the partial success rate with these 4 biomarkers was around 80%. However, the individual success rate decreased with the sequential analysis, so that EGFR detection was 96.6% while for BRAF it was 67.7%. These results could be explained by the loss of tumour material during the cell block cuts, scraping tumour cell from PEN membrane slide by manual or laser microdissection, or by the delay in processing fresh slides.<sup>12</sup>

The usefulness of cytological samples obtained by EBUS/EUS-B for molecular analysis has been assessed in different studies, with 2 or 3 molecular alterations studied in most of them.<sup>9,10,13–16</sup> In our series, by applying a protocol for obtaining cytological material, effectiveness was optimal (96.7%) to start sequential molecular analysis, and it was up to 44% favourable for 7 biomarkers. Jurado et al.<sup>13</sup> observed that in 82% (42/56) of cases, enough cytological material was obtained for molecular testing (EGFR, ALK and KRAS), while in our study there were 4 detections (EGFR, KRAS, ALK and ROS1) in 78.6% of cases, which was similar but with an additional biomarker in our series. Folch et al.<sup>16</sup> compared the detection of 3 biomarkers (EGFR, KRAS and ALK) in cytological samples (cell blocks) obtained by EBUS, with samples obtained by other techniques (surgical biopsy of mediastinal and hilar nodes, bronchial biopsies, CT-guided PTNB of lung lesions) and managed to show a success rate above 90%, confirming that the EBUS is a suitable tool with which to initiate a genotypic study of NSCLC.

The presence of ROSE was a notable advantage in the optimisation and handling of the samples, as it increases performance in obtaining tumour material for IHC and molecular testing.<sup>17–19</sup> Trisolini et al.<sup>20</sup> demonstrated that the presence of an anatomopathologist can prevent the performance of additional procedures for genotyping in 1 in 10 cases and, although there was no statistical relevance, clinical relevance was observed. In our institution, the good cooperation between cytopathologist and bronchoscopist facilitated the preparation of the samples with adequate tumour material, and in some cases, allowed us to modify the puncture zone in the metastatic lymph node (e.g. presence of necrosis zones), change the lymph node station, or the number of punctures. In our study, ROSE allowed us to perform an average of 3 punctures to obtain sufficient material, below the 4 punctures recommended by the guidelines for obtaining material for molecular study,<sup>21</sup> yet our success rate for partial study was close to 80%.

Please cite this article in press as: Centeno C, et al. Pulmonol. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.001>

**Table 2** Individual molecular analysis.

Type of molecular study	Number of analysed samples	Enough (%)	Positive (%)	Negative (%)
EGFR	87	84 (97%)	13 (15%)	71 (82%)
KRAS	81	78 (96.3%)	18 (22.2%)	60 (74.1%)
ALK	80	68 (85%)	1 (1.3%)	67 (83.7%)
ROS1	79	65 (82.3%)	0	65 (82.3%)
ERBB2	63	45 (71.4%)	0	45 (71.4%)
BRAF	62	42 (67.7%)	0	42 (67.7%)
MET	37	30 (81.1%)	1 (2.7%)	29 (78.3%)

EGFR: epidermal growth factor receptor; KRAS: kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; ALK: anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase; ROS1: protooncogene tyrosine protein kinase ROS; ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2; BRAF: v-Raf murine sarcoma oncogene homolog B1; MET: tyrosine-protein kinase Met.

**Table 3** Molecular analyses by cytological sample in group 1 (type of mutations: EGFR, KRAS, BRAF and ERBB2).

Sample type n = 87 (%)	Number of determinations		p
	1–3 (n = 49)	4 (n = 38)	
Membrane	23 (47.0%)	16 (42.1%)	0.489
Cell block	12 (24.0%)	9 (23.7%)	
Membrane + Cell block	14 (29.0%)	13 (34.2%)	

When evaluating by type of cytological sample (cell block ± PEN membrane slide) for the number of mutations (1–4) we did not observe differences between these samples. PEN membrane slides are an additional tool that contains DNA for molecular subtyping in NSCLC.

The success rate for the detection of EGFR in cytological samples obtained by EBUS varies between 72.2% and 98.7%.<sup>9,10</sup> In our sample, it was 97%, higher than the 90% published by Navani et al.<sup>15</sup> In our study, mutation in EGFR genes was detected in 15%, similar to that reported in histological samples from other Spanish studies (11.6–16.6%).<sup>3,22</sup>

The success rate for the detection of KRAS was 96.3%, higher than the results reported in the studies by Kang and Jurado, 90.2% and 75% respectively<sup>13,23</sup>. Mutations in the KRAS genes were observed in 20%, similar to that reported (23.6%) in different cytological series.<sup>24</sup> In line with previous research, in our experience the presence of EGFR and KRAS mutations was exclusive.<sup>24</sup>

The determination of ALK-rearrangements was possible in 85% of samples, similar to the experience of Jurado et al.,<sup>13</sup> which was 91% (39/41) with a frequency of positive cases (by FISH) of 6.4% (7/109),<sup>14</sup> while in our group only 1 case was positive.

Our article shows that it is feasible to perform a greater number of detections in cytological samples such as cell blocks and membrane PEN slides, following a sequential algorithm and with the help of a cytopathologist. The limitations of our study includes not having all the determinations available in all cases (our assistance protocol did not perform additional analysis in cases where a molecular alteration was already detected) and it was based on data from a single centre with a small sample size, which limits the generalizability of our results.

Immunotherapy with checkpoint inhibitors was recently approved to treat NSCLC. Wang et al.<sup>25</sup> demonstrated

87% feasibility to determine the expression of PD-L1 (programmed death ligand 1) in samples obtained by EBUS-TBNA with a good correlation between the cytological and surgical samples. Likewise, the incorporation of second-generation sequencing (NGS) allowed the analysis of numerous genetic alterations simultaneously, with the use of small amounts of DNA (nanograms). However, its usefulness in cytological samples obtained by EBUS should be validated, since it requires quality DNA and a sufficient tumour cell percentage to give adequate sequencing.<sup>26</sup>

In conclusion, in our series applying a protocol based on obtaining a minimum of 2 cell blocks and optimising the handling of the samples for multiple molecular analysis, we have shown that the cytological samples obtained by EBUS-TBNA or EUS-B-FNA are suitable in a high percentage of patients for individual and partial molecular analysis. PEN membrane slides and cell blocks have shown to be equally valid samples for the determination of mutations.

## Funding

This study was funded by a research grant from the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR 198/2013), Antonio Castellá Award for research projects of the Spanish Association of Respiratory Endoscopy (AEER) and PUBLIBECA of SEPAR. Additionally, it received support from the Germans Trias Talents – 2013 Aid Program, Germans Trias i Pujol Hospital and Institute.

## Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Please cite this article in press as: Centeno C, et al. Pulmonol. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.001>

## Acknowledgement

To Jana Pagès Barón, cytotechnician in our centre for her invaluable collaboration to achieve the appropriate sample circuit between the Molecular Biology Laboratory of the ICO and our centre.

## References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2018;68:394–424.
2. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. SEER cancer statistics review 1975–2017. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2020. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2017/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/), based on November 2019 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2020.
3. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009;361:958–67.
4. Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 2016;388:1012–24.
5. Felip E, Gridelli C, Baas P, Rosell R, Stahel R. Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010. *Ann. Oncol.* 2011;22:1507–19.
6. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2018;142:321–46.
7. Sánchez de Cos J, Hernández Hernández J, Jiménez López MF, Padrones Sánchez S, Rosell Gratacós A, Rami Porta R. Normativa SEPAR sobre estadificación del cáncer de pulmón. *Arch. Bronconeumol.* 2011;47:454–65.
8. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer. *Chest.* 2013;143:e2115–50S.
9. Nakajima T, Yasufuku K, Suzuki M, Hiroshima K, Kubo R, Mohammed S, et al. Assessment of epidermal growth factor receptor mutation by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Chest.* 2007;132:597–602.
10. Garcia-Olive I, Monso E, Andreo F, Sanz-Santos J, Taron M, Molina-Vila MA, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for identifying EGFR mutations. *Eur. Respir. J.* 2010;35:391–5.
11. Noonan SA, Berry L, Lu X, Gao D, Barón AE, Chesnut P, et al. Identifying the appropriate FISH criteria for defining MET copy number-driven lung adenocarcinoma through oncogene overlap analysis. *J Thorac Oncol.* 2016;11:1293–304.
12. Billah S, Stewart J, Staerckel G, Chen S, Gong Y, Guo M. EGFR and KRAS mutations in lung carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2011;119:111–7.
13. Jurado J, Saqi A, Maxfield R, Newmark A, Lavelle M, Bacchetta M, et al. The efficacy of EBUS-guided transbronchial needle aspiration for molecular testing in lung adenocarcinoma. *Ann. Thorac. Surg.* 2013;96:1196–202.
14. Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, Ikebe D, Kageyama H, Soda M, et al. EML4-ALK fusion gene assessment using metastatic lymph node samples obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Clin. Cancer Res.* 2010;16:4938–45.
15. Navani N, Brown JM, Nankivell M, Woolhouse I, Harrison RN, Jeebun V, et al. Suitability of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for subtyping and genotyping of non-small cell lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012;185:1316–22.
16. Folch E, Yamaguchi N, VanderLaan PA, Kocher ON, Boucher DH, Goldstein MA, et al. Adequacy of lymph node transbronchial needle aspirates using convex probe endobronchial ultrasound for multiple tumor genotyping techniques in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2013;8:1438–44.
17. Cameron SEH, Andrade RS, Pambuccian SE. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration cytology: a state of the art review. *Cytopathology.* 2010;21:6–26.
18. Griffin AC, Schwartz LE, Baloch ZW. Utility of on-site evaluation of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens. *Cytojournal.* 2011;8:20.
19. Casadio C, Guarize J, Donghi S, Di Tonno C, Fumagalli C, Vacirca D, et al. Molecular testing for targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer: suitability of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015;144:629–34.
20. Trisolini R, Cancellieri A, Tinelli C, de Biase D, Valentini I, Casadei G, et al. Randomized trial of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration with and without rapid on-site evaluation for lung cancer genotyping. *Chest.* 2015;148:1430–7.
21. van der Heijden EHF, Casal RF, Trisolini R, Steinfors DP, Hwangbo B, Nakajima T, et al. Guideline for the acquisition and preparation of conventional and endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for the diagnosis and molecular testing of patients with known or suspected lung cancer. *Respiration.* 2014;88:500–17.
22. Esteban E, Majem M, Martínez Aguillo M, Martínez Banaclocha N, Dómine M, Gómez Aldaravi L, et al. Prevalence of EGFR mutations in newly diagnosed locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer Spanish patients and its association with histological subtypes and clinical features: The Spanish REASON study. *Cancer Epidemiol.* 2015;39:291–7.
23. Kang YR, Park HY, Jeon K, Koh W, Suh GY, Chung MP. EGFR and KRAS mutation analyses from specimens obtained by bronchoscopy and EBUS-TBNA; 2013. p. 13–5.
24. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC, Goddard AD, Heldens SL, Herbst RS, et al. Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:5900–9.
25. Wang G, Ionescu DN, Lee CH, Hiruki T, Myers R, Shaipanich T, et al. PD-L1 testing on the EBUS-FNA cytology specimens of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2019;136:1–5.
26. Xie F, Zheng X, Mao X, Zhao R, Ye J, Zhang Y, et al. Next-generation sequencing for genotyping of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration samples in lung cancer. *Ann. Thorac. Surg.* 2019;108:219–26.

Please cite this article in press as: Centeno C, et al. *Pulmonol.* 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.001>



## **V. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS**

## RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

El primer estudio “ Is it necessary to sample the contralateral nodal stations by EBUS-TBNA in patients with lung cancer and clinical N0/N1 on PET-CT?” se trata de un análisis retrospectivo de una base de datos recogida prospectivamente que incluyó pacientes con CPNCP confirmado y sin afectación mediastínica en la PET/TC (N0/N1), que se sometieron a PATB-EBUS sistemática para la estadificación mediastínica. Se incluyeron 174 pacientes con mediastino normal en la PET/TC. La PET/TC detectó afectación ganglionar hiliar/interlobar homolateral (N0) en 119 (68,3%) pacientes, y enfermedad N1 en 55 (31,7%). La mediana de ganglios puncionados por paciente fue de 9 (rango 1-19), y la mediana de estaciones puncionadas fue de 5 (rango 1-8) por paciente. La PATB-EBUS no mostró ningún caso de enfermedad N3, ni hiliar/interlobar ni mediastínica. En 21 pacientes (12%) la PATB-EBUS sistemática diagnosticó enfermedad N2 (20 casos N2a, 1 caso N2b), y fueron excluidos para cirugía de resección pulmonar, mientras los 153 pacientes restantes (87,9%) se clasificaron como N0/N1 después de PATB-EBUS.

De estos 153 pacientes, 32 casos fueron inoperables y se sometieron a radioterapia, radioterapia estereotáxica corporal (SBRT), o tratamiento paliativo. Los restantes 121 pacientes (88 N0 y 33 N1 después del EBUS) se sometieron a resección pulmonar con disección ganglionar sistemática (DGS). En 4/121 se sometieron a mediastinoscopia por decisión del comité de tumores, y fue negativa. La DGS confirmó enfermedad N0/N1 en 117 (96,7%) pacientes, y enfermedad N2 en 4 pacientes (3,3%). De estos 4, en 3 pacientes no se pudo acceder a las estaciones afectadas (5 y 6) , con lo que la PATB-EBUS no puede considerarse como verdadero negativo del procedimiento, sino una limitación técnica.

Se evidenció enfermedad N2 en: 21 pacientes mediante PATB-EBUS y en 4 pacientes mediante DSG. Así la prevalencia de enfermedad N2 en nuestro estudio fue del 14,4%, y de estos, sólo 3 pacientes (12,5%) presentaron ganglios mediastínicos aumentados de tamaño en la TAC. La prevalencia de enfermedad N2 fue mayor en pacientes con

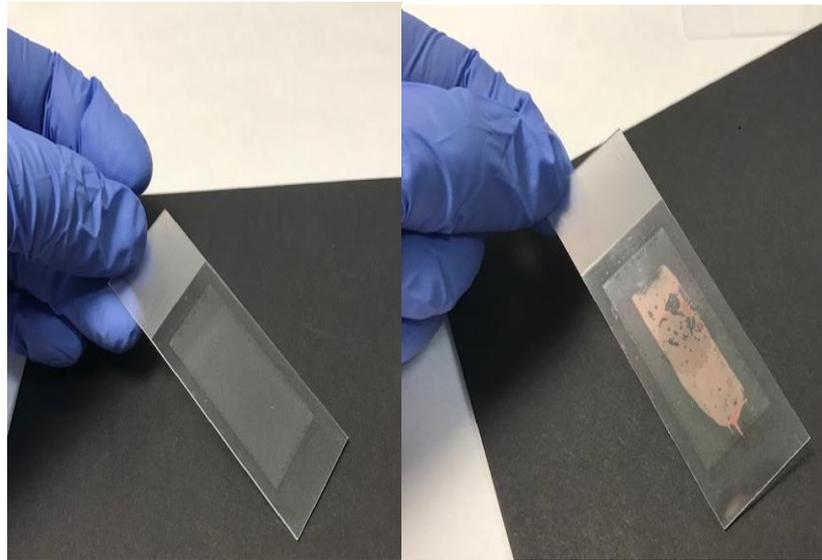
afectación N1 en la PET/TC que en aquellos con enfermedad de N0 (29% frente a 7,56%). No hubo casos de enfermedad hilar/interlobar o mediastínica contralateral (N3).

La sensibilidad, especificidad, VPN, VPP y rendimiento diagnóstico de la PATB-EBUS sistemática en pacientes con mediastino normal, fue del 84%, 100%, 96,7%, 100% y 97% respectivamente.

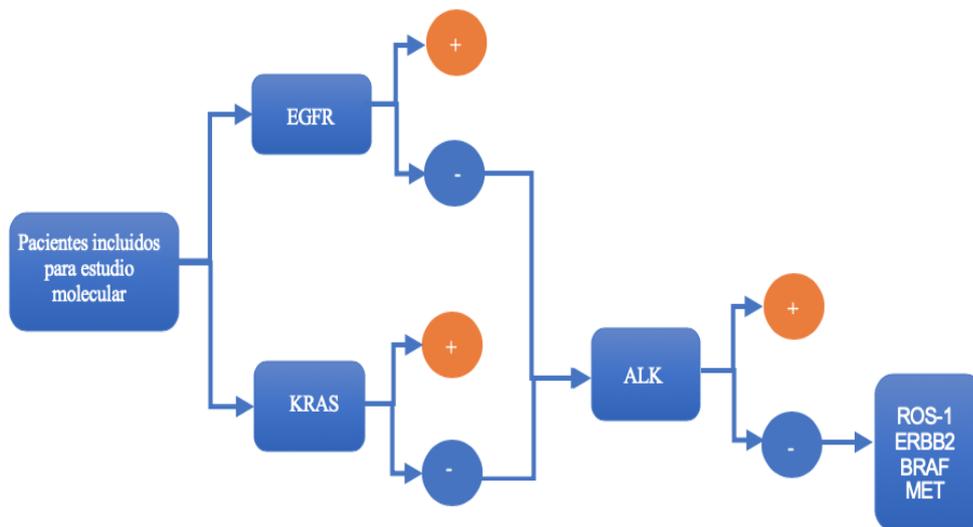
Por otro lado, en el estudio “Molecular analysis in cytological samples obtained by endobronchial or oesophageal ultrasound guided needle aspiration in non-small cell lung cancer” se trató de una serie prospectiva que valoró la realización del estudio molecular secuencial en las muestras citológicas obtenidas en pacientes con CPNCP sometidos a PATB-EBUS y/o PAAF-EUS-B como parte del estudio diagnóstico y/o de estadificación. Como criterios de inclusión se establecieron: Pacientes en estadios avanzados (IIIB, IV), o estadio IIIA no tributarios de tratamiento quirúrgico; y casos con sospecha de recidiva o progresión de enfermedad, en ausencia de tratamiento activo. Se excluyeron pacientes fumadores con carcinoma escamoso, debido a la baja frecuencia de alteraciones diana en esta población.

Durante la realización de la PATB-EBUS y/o PAAF-EUS-B, estuvo presente un anatomopatólogo para la preparación del material obtenido y la valoración *in situ* de las muestras. A partir de las muestras tumorales se realizaron bloques celulares con o sin extensión tipo membrana (Fig. 12), y si no fue factible la realización de bloques celulares se prepararon extensiones en portaobjetos silanizados y extensión tipo membrana. A partir de los bloques celulares se obtuvieron laminillas para tinción de hematoxilina-eosina (H-E), técnicas de IHQ, y técnicas del estudio molecular secuencial (Fig. 13). Las muestras citológicas se distribuyeron en grupos: 1) extensiones en membrana y/o bloques celulares para el estudio de mutaciones de EGFR, KRAS, ERBB2 y BRAF; y 2) bloques celulares o extensiones en silano para reordenamientos de ALK, ROS-1 y amplificación de MET.

Para la determinación de las mutaciones de los genes EGFR, KRAS, BRAF, ERBB2 se utilizaron técnicas de PCR, mientras para la determinación de los reordenamientos de los genes ALK, ROS1 y la amplificación del gen MET se realizaron técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH).



**Figura 12.** Extensión tipo membrana, sin y con material citológico.



**Figura 13.** Algoritmo de estudio molecular secuencial.

En este estudio, se incluyeron 90 pacientes, de los cuales en 54 casos (60%) la ecobroncoscopia fue el primer procedimiento que permitió el diagnóstico anatomopatológico. Setenta y un pacientes (78,9%) tuvieron el diagnóstico de adenocarcinoma. Las características basales se recogen en la Tabla 10.

Características basales	Pacientes (n=90)
Edad	65,2 +/- 9,4
Sexo, n (%)	
Hombre	74 (82,2%)
Historia de tabaquismo, n (%)	
Nunca	8 (9%)
Ex tabaquismo	35 (38,8%)
Tabaquismo activo	47 (52,2%)
Tipo Histológico n (%)	
Adenocarcinoma	71 (78,9%)
Carcinoma escamoso	3 (3,3%)
CPNM – tipo NOS	16 (17,8%)
Estadio, n (%)	
IIIA no quirúrgico	31 (34,4%)
N2 multinivel	11
N2 persistente	5
Mala función pulmonar	11
Bajo <i>performance estatus</i>	4
IIIB	16 (17,8%)
IV	43 (47,8%)
Procedimiento	
PATB-EBUS	76 (84,4%)
PAAF-EUS-B	11 (12,2%)
Ambos	3 (3,3%)
Estudio molecular, n (%)	
SI	87 (96,7%)
NO	3 (3,3%)
Tratamiento final	
Oncodirigido	11 (12,2%)
Convencional (Quimioterapia y/o radioterapia)	62 (68,9%)
Ninguno (rápida progresión o bajo performance)	17 (18,9%)

**Tabla 10.** Características generales de los pacientes

Con respecto al estudio molecular, en el 96,7% de los pacientes fue factible iniciar el estudio molecular secuencial. No hubo diferencia estadística en la utilización de las técnicas de IHQ en las muestras suficientes frente a las insuficientes para el estudio molecular completo (65,5% vs 60%, p=0,115).

En el 78,6% de los pacientes se pudo realizar el estudio molecular parcial (EGFR, KRAS, ALK y ROS-1), mientras que el estudio completo de los 7 biomarcadores (EGFR, KRAS, ALK, ROS-1, ERBB2, BRAF y MET) se realizó en el 44% de los casos. En la Tabla 11 se detallan los resultados individuales para cada determinación molecular.

Tipo de estudio molecular	Nº de muestras analizadas	Suficiente (%)	Positiva (%)	Negativa (%)
<b>EGFR</b>	87	84/87 (97%)	13 (15%)	71 (82%)
<b>KRAS</b>	81	78 (96,3%)	18 (22,2%)	60 (74,1%)
<b>ALK</b>	80	68 (85%)	1 (1,3%)	67 (83,7%)
<b>ROS-1</b>	79	65 (82,3%)	0	65 (82,3%)
<b>ERBB2</b>	63	45 (71,4%)	0	45 (71,4%)
<b>BRAF</b>	62	42 (67,7%)	0	42 (67,7%)
<b>MET</b>	37	30 (81.1%)	1 (2.7%)	29 (78,3%)

**Tabla 11.** Resultados de las determinaciones moleculares individuales

En trece casos (15%) se evidenció mutación del gen EGFR, 12 (92,3%) de los cuales pertenecían al subtipo adenocarcinoma. La mutación más frecuente fue la deleción del exón 19 (54%).

Al valorar por grupos, se observó que en el grupo 1 se realizaron las 4 determinaciones en 38 (44%), mientras solo se pudieron estudiar de 1 a 3 mutaciones en 49 (56%). No se

evidenciaron diferencias significativas en el número de determinaciones moleculares (1-3 vs. 4) ( $p=0,489$ ) al separar por subgrupos de muestreo entre: 1) bloque celular, 2) membrana, y 3) bloque celular y membrana. Mientras que en el grupo 2 fue factible realizar las técnicas de FISH (ALK y/o ROS1 y/o MET) en 70 (86%), y de ellos se realizaron las 3 determinaciones en 28 casos (34,6%), y sólo 2 en 38 casos (47%).



## **VI. RESUMEN GLOBAL DE LA DISCUSION**

En la presente Tesis Doctoral “Optimización de la estadificación mediastínica y del análisis molecular en el cáncer de pulmón no célula pequeña mediante punción-aspiración guiada por ecobroncoscopia sectorial” han realizado las siguientes aportaciones:

En el primer estudio, se demuestra la nula prevalencia de afectación N3 en nuestra serie tanto hilar/interlobar como mediastínica, cuando se realiza la PATB-EBUS sistemática en pacientes con CPNCP con ausencia de afectación mediastínica (N1/N0 por PET/TC), con lo que nos hace cuestionar la necesidad de la punción de adenopatías N3, al menos a nivel hilar/interlobar.

En los estudios comparativos de la PATB-EBUS frente a la mediastinoscopia para la estadificación mediastínica, sólo se evaluaban las estaciones 2, 4 y 7, y se puncionaban los ganglios > 5mm de tamaño en el eje corto, y bajo la sistemática de regiones N3, N2 y N1. En estos estudios no se puncionaban las estaciones 10 y 11<sup>76,93</sup>. Sin embargo, en un estudio donde se realizó la PATB-EBUS en pacientes con mediastino negativo mediante la PET/TC, sí muestrearon las estaciones 10 y 11, pero no se llegó a reportar afectación metastásica en estos niveles<sup>94</sup>. En una revisión previa, se cuestiona la necesidad muestrear estas estaciones (10 y 11), dada la remota posibilidad de metástasis en estos niveles, sin embargo, se necesitaba mayor evidencia para ser demostrado<sup>82</sup>.

Así nuestro estudio apoyaría dicha teoría, dada la prevalencia de 0% de afectación tumoral en dichas estaciones ganglionares en pacientes con mediastino normal por la PET/TC, con la consiguiente optimización del tiempo de exploración, del tiempo de sedación, así como de las posibles complicaciones relacionadas con el procedimiento y la anestesia.

En relación con el rendimiento diagnóstico de la PATB-EBUS, se han publicado dos meta-análisis sobre el papel de la PATB-EBUS en pacientes con mediastino normal mediante la PET/TC. Ambos han mostrado un VPN > 90% pero con baja sensibilidad (49%)<sup>95,96</sup>, lo que podría deberse a la baja cantidad de ganglios muestreados por paciente. Sin embargo, en nuestro estudio la mediana de 9 ganglios y de 5 estaciones

nodales por paciente durante la PATB-EBUS sistemática, probablemente fue la causa del incremento la sensibilidad hasta el 84%. En nuestra opinión, se debe tener un alto nivel de minuciosidad en la estadificación ganglionar de los pacientes con CPNCP, dado el riesgo que conlleva a una estadificación errónea. Los estudios incluidos en estos meta-análisis no diferencian entre N2 y N3, y cuando si lo diferencian han reportado una prevalencia del 1%<sup>95,96</sup>. Este mismo hallazgo se ha observado, al realizar la estadificación invasiva en este subgrupo de pacientes con afectación N1/N0 por PET/TC<sup>97,98</sup>.

Nuestra prevalencia de afectación N2 fue del 14% en pacientes con mediastino normal por PET/TC, lo que coincide con otras series publicadas<sup>79,80</sup>. También se ha publicado un VPN muy elevado para la PATB-EBUS en pacientes con enfermedad N0/1 en PET /TC<sup>91</sup>. En nuestra serie, sólo 4 pacientes con función pulmonar deteriorada y dada la posibilidad de neumonectomía, fueron sometidos a mediastinoscopia cervical.

La mediastinoscopia no detectó afectación del mediastino en ningún paciente. Sólo 4 de 121 pacientes que se sometieron a cirugía de resección pulmonar presentaron afectación metastásica N2. De estos, en 3 casos la afectación ganglionar fue en estaciones ganglionares no accesibles por PATB-EBUS. Nuestros datos confirman que, en pacientes con afectación N0/N1 por PET/TC, la probabilidad post test de presentar compromiso mediastínico después de un EBUS sistemático negativo es muy baja (VPN 96,7%) por lo que la utilidad de la mediastinoscopia sigue siendo muy cuestionable, y los pacientes podrían dirigirse directamente a la resección pulmonar<sup>95</sup>.

Los resultados del segundo estudio demuestran que las muestras citológicas obtenidas por PATB-EBUS o PAAF-EUS-B, principalmente bloque celular y extensiones en membrana, presentan una tasa de éxito elevada para el estudio molecular secuencial, tanto parcial como individual.

En las guías americanas para el estudio de biomarcadores en el cáncer pulmonar se recomienda realizar en un primer paso, el análisis de EGFR, ALK y ROS-1, seguido del estudio de KRAS sólo si las primeras son negativas<sup>99</sup>. En nuestra serie, la tasa de éxito

parcial para estos 4 biomarcadores ha sido de alrededor del 80%. Sin embargo, la tasa de éxito individual disminuyó con el análisis secuencial, de tal forma que el análisis del EGFR obtuvo una tasa de éxito fue del 96,6% mientras que para el BRAF fue del 67,7%. Este hecho se podría explicar por la pérdida de material tumoral durante los cortes del bloque celular, durante la microdissección del tejido tumoral, o por la pérdida de células viables tumorales en las extensiones de membrana, al no procesarse rápidamente por ser una extensión en fresco.

La utilidad de las muestras citológicas obtenidas mediante PATB-EBUS y/o PAAF-EUS-B para el análisis molecular ha sido valorada en diferentes estudios, pero en la mayoría de ellos se estudiaban de 2 a 3 alteraciones moleculares<sup>84-89</sup>. En nuestra serie, aplicando un protocolo para la obtención de material citológico, la rentabilidad ha resultado ser óptima (96,7%), para el estudio molecular secuencial, parcial o completo, siendo posible hasta en un 44% de los casos al realizar el estudio de 7 posibles alteraciones. En la misma línea, Jurado et al. observaron que hasta el 92% de los casos tuvieron suficiente material citológico para el estudio molecular completo o parcial de 3 determinaciones (EGFR, ALK y KRAS)<sup>86</sup>, mientras que el nuestro permitió la detección de 4 biomarcadores (EGFR, KRAS, ALK y ROS-1) en el 78,6% de casos frente al 82% con 3 biomarcadores. Por lo tanto, obtuvimos rendimiento similar, pero con biomarcador adicional.

Al ser comparadas, las muestras citológicas obtenidas por PATB-EBUS con otras citohistológicas obtenidas mediante otras técnicas (biopsia quirúrgica de ganglios mediastínicos e hiliares, biopsias bronquiales, punción aspiración con aguja fina guiada por TAC de lesiones pulmonares) para el análisis molecular (EGFR, ALK, KRAS) se evidenció una tasa de éxito por encima del 90% con el PATB-EBUS, similar a la obtenida por broncoscopia pero superior cuando las muestras fueron obtenidas por punción de lesiones guiada por TAC<sup>89</sup>. Así se han observado, tasas de éxito variables de 67-89% para las muestras citológicas o histológicas guiadas por la TAC, que puede ser debido a la zona de la punción, el tamaño de la lesión, la experiencia de operador o el número de pases<sup>100,101</sup>.

Diferentes medidas para la optimización del muestreo y manejo de las muestras citológicas obtenidas por PATB-EBUS han sido valoradas, pero el rendimiento parece depender del número de células tumorales viables, porcentaje de material tumoral y sensibilidad de la prueba molecular empleada<sup>90</sup>. No se ha evidenciado influencia en la mejora del material citológico, en relación con el tipo de sedación, el tipo de aguja, el número de pases, el tiempo de punción, ni el uso de presión negativa para la succión<sup>90</sup>. La presencia de anátomo-patólogo para la optimización de las muestras y la preparación del material citológico, durante la PATB-EBUS resulta ser una ventajosa como lo evidencian algunos estudios<sup>102-105</sup>. En nuestra experiencia, la buena interrelación de broncoscopista y patólogo podría incrementar el rendimiento diagnóstico de la PATB, así como ha reducido el número de punciones por ganglio a 3 (respecto a otras series), y ha permitido poder obtener una tasa de éxito para el estudio molecular parcial cercana al 80%, lo que concuerda con lo recomendado actualmente<sup>86</sup>.

En relación con el tipo de muestra citológica, los bloques celulares fueron de elección inicialmente, pero en la actualización de las recomendaciones para el estudio molecular en pacientes con cáncer pulmonar del año 2018, se describe también la utilidad de otros tipos de muestras citológicas<sup>96</sup>.

En nuestro estudio, al analizar la rentabilidad por tipo de muestra citológica (bloque celular  $\pm$  extensión en membrana) para el número de mutaciones (1-3 vs. 4) no observamos diferencias entre este tipo de muestras, siendo válidas tanto el bloque celular como la extensión en membrana, siendo ésta última una herramienta adicional para la extracción de DNA en el momento de la tipificación molecular del CPNCP.



## **VII. CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. Los pacientes con CPNCP y afectación N1/N0 por PET/TC sometidos a PATB-EBUS cuyo resultado fue negativo, tienen una probabilidad post test de afectación mediastínica muy baja. La PATB-EBUS sistemática es un método preciso para la detección de afectación ganglionar N3 en pacientes con mediastino normal (N1/N0) por PET/TC, lo que está en consonancia con las recomendaciones de las guías clínicas de no requerir otras exploraciones mínimamente invasivas o invasivas previas a la cirugía terapéutica.
2. Dada la nula prevalencia de afectación ganglionar mediastínica o hilar/interlobar contralateral en nuestro estudio, nos indica que el muestreo de las estaciones 10 y 11 se podría evitar en este subgrupo de pacientes.
3. En nuestra serie, aplicando un protocolo basado en la obtención de un mínimo de 2 bloques celulares y la optimización del manejo de las muestras para el análisis molecular múltiple de forma secuencial, hemos demostrado que las muestras citológicas obtenidas por PATB-EBUS o PAAF-EUS-B son adecuadas en la gran mayoría de los casos para el análisis molecular individual y parcial. En cerca de la mitad de los pacientes también permitieron la realización de un estudio molecular completo.
4. Tanto las extensiones en membrana como los bloques celulares han sido muestras igualmente válidas para la determinación de mutaciones.



## **VIII. LINEAS DE FUTURO**

La PATB-EBUS o la PAAF-EUS-B son técnicas recientes con alta precisión diagnóstica, por lo que han adquirido una gran relevancia en el diagnóstico y estadificación ganglionar del cáncer de pulmón. La importancia de realizar una adecuada estadificación clínica pretratamiento en el CP radica en la elección del mejor tratamiento posible para cada paciente, así como en el impacto sobre la supervivencia global. Numerosos estudios avalan la utilidad de la ecobroncoscopia en el CP, lo que nos ha ayudado a precisar sus indicaciones, sobre todo en los diferentes subgrupos establecidos por el grado de afectación ganglionar mediastínica. Por este motivo, la ecobroncoscopia sectorial como herramienta mínimamente invasiva, aunque aún se precisa de más estudios para optimizar estas indicaciones o plantear nuevas. Los trabajos que forman parte de la presente tesis, ayudan a optimizar la utilidad de esta exploración en dos indicaciones diferentes.

La estadificación ganglionar sistemática en pacientes con mediastino normal (N0/N1 por PET-TC), nos ha permitido comprobar la nula prevalencia de afectación N3 (hiliar/interlobar y mediastínica) en nuestra serie, cuestionando que sea necesaria la punción de al menos las estaciones hiliares e interlobares contralaterales, con la importancia clínica que esto representa para la exploración (menor número de punciones y en consecuencia, menos tiempo por exploración y reducción de la posibilidad de complicaciones). Adicionalmente, la baja tasa de afectación N2 post ecobroncoscopia en este grupo, cuestiona igualmente la necesidad de la mediastinoscopia.

En el futuro, la mejora en la estandarización e individualización de la sistemática del estudio ganglionar por ecobroncoscopia en pacientes con cáncer de pulmón puede ayudarnos en la selección de indicaciones por subgrupos, así como incrementar el rendimiento diagnóstico.

Diversas variables como las características de las lesiones pulmonares y/o ganglios por TAC y que mediante un análisis cuantitativo de estas imágenes “radiómica” se pueda predecir la malignidad; o las características metabólicas de las lesiones y/o ganglios por PET-TC (hipo/hipercaptación, SUV máx-mín); o las características ecográficas mediante ecobroncoscopia (modo M, modo doppler, modo elastografía) de los ganglios o lesiones patológicas. Todas estas características morfometabólicas y ecográficas nos podrían ayudar en la optimización en la planificación del muestreo de los ganglios y/o masas pulmonares, y en consecuencia aumentar el rendimiento diagnóstico.

La adquisición de material citológico suficiente para el análisis molecular es un área que ha sido estudiada, pero con la incorporación de nuevas dianas susceptibles de tratamientos dirigidos, se requiere de mayor cantidad de tejido tumoral, por lo que la optimización del procedimiento es cada vez más necesaria. En la actualidad, la mejora en la obtención de las muestras, así como el tipo de extensión citológica y bloque celular han cobrado importancia para la realización de estudios moleculares, sobre todo en los pacientes no candidatos a cirugía terapéutica por el estadio avanzado de la enfermedad o bajo *performance status* (PS). Adicionalmente, la determinación de otros

marcadores como la expresión de PD-L1 o la determinación de múltiples biomarcadores mediante NGS (*next generation sequencing*) se encuentran en evaluación.

Las nuevas agujas o pinzas histológicas podrían ser de utilidad en la obtención de material tumoral suficiente para esta amplia batería de biomarcadores requeridas en los pacientes con CP.



## **IX. BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest.* 2003;123(1 Suppl):21S-49S.
3. Lopez AD, Collishaw NE, Piha T. A descriptive model of the cigarette epidemic in developed countries. *Tobacco Control* 1994; 3:242-7.
4. Gutiérrez-Abejón E, Rejas-Gutiérrez J, Criado-Espejel P, Campo-Ortega EP, Breñas-Villalón MT, Martín-Sobrino N. Impacto del consumo de tabaco sobre la mortalidad en España en el año 2012 [Smoking impact on mortality in Spain in 2012]. *Med Clin (Barc).* 2015;145(12):520-525.
5. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health.* 2019;85(1):8.
6. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(3):439-445.
7. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(1):10-29.
8. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. (2015). WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, Lyon, France.
9. 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.
10. Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clinics in Chest Medicine.* 2011; 32(4): 669-692.
11. Guo Z, Yi F, Yin W, et al. Clinical value of the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification of lung adenocarcinoma *Thorac Cancer.* 2017;8(3):159-169.

12. Yoshizawa A, Motoi N, Riely GJ, et al. Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol.* 2011;24(5):653-664.
13. Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* 2011;12(2):175-180.
14. Jänne PA, Meyerson M. ROS1 rearrangements in lung cancer: a new genomic subset of lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2012;30(8):878-879.
15. Tsao AS, Scagliotti GV, Bunn PA Jr, et al. Scientific Advances in Lung Cancer 2015. *J Thorac Oncol.* 2016;11(5):613-638.
16. Berge EM, Doebele RC. Targeted therapies in non-small cell lung cancer: emerging oncogene targets following the success of epidermal growth factor receptor. *Semin Oncol.* 2014;41(1):110-125.
17. Dearden S, Stevens J, Wu YL, Blowers D. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol.* 2013;24(9):2371-2376.
18. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer.* 2014;120(18):2883-2892.
19. Tochigi N, Dacic S, Nikiforova M, Cieply KM, Yousem SA. Adenosquamous carcinoma of the lung: a microdissection study of KRAS and EGFR mutational and amplification status in a western patient population. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(5):783-789.
20. Antoine M, Vieira T, Fallet V, et al. Pulmonary sarcomatoid carcinoma. *Ann Pathol.* 2016;36(1):44-54.
21. Vansteenkiste J, Fischer BM, Doooms C, Mortensen J. Positron-emission tomography in prognostic and therapeutic assessment of lung cancer: systematic review. *Lancet Oncol.* 2004;5(9):531-540. Pinilla I, Gómez León N. Utilidad de la PET/TC en el cáncer de pulmón. *Radiologia.* 2009;51(3):248-260.
22. Carter BW, Lichtenberger JP 3rd, Shroff GS, Truong MT, Wu CC. Role of Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography-Computed Tomography in the Evaluation of Suspicious Pulmonary Nodules. *Semin Roentgenol.* 2017;52(3):166-172.

23. Groheux D, Quere G, Blanc E, et al. FDG PET-CT for solitary pulmonary nodule and lung cancer: Literature review. *Diagn Interv Imaging*. 2016;97(10):1003-1017.
24. Biederer J, Hintze C, Fabel M. MRI of pulmonary nodules: technique and diagnostic value. *Cancer Imaging*. 2008;8(1):125-130.
25. Gállego Pérez-Larraya J, Hildebrand J. Brain metastases. *Handb Clin Neurol*. 2014;121:1143-1157.
26. García Marrón M, Gallo Martín F, García Muñoz JP, Viejo Bañuelos JL. Estudio de las técnicas de diagnóstico en cien pacientes con carcinoma bronquial. *Arch Bronconeumol* 1986; 22 (1): 17-23.
27. Gellert AR, Rudd RM, Sinha G, Geddes DM. Fiberoptic bronchoscopy: effect of multiple bronchial biopsies on diagnostic yield in bronchial carcinoma. *Thorax*. 1982;37(9):684-687.
28. Wang Memoli JS, Nietert PJ, Silvestri GA. Meta-analysis of guided bronchoscopy for the evaluation of the pulmonary nodule. *Chest*. 2012;142(2):385-393.
29. Lacasse Y, Wong E, Guyatt GH, Cook DJ. Transthoracic needle aspiration biopsy for the diagnosis of localised pulmonary lesions: a meta-analysis. *Thorax*. 1999;54(10):884-893.
30. Baldwin DR, Eaton T, Kolbe J, et al. Management of solitary pulmonary nodules: how do thoracic computed tomography and guided fine needle biopsy influence clinical decisions?. *Thorax*. 2002;57(9):817-822.
31. Heerink WJ, de Bock GH, de Jonge GJ, Groen HJ, Vliegenthart R, Oudkerk M. Complication rates of CT-guided transthoracic lung biopsy: meta-analysis. *Eur Radiol*. 2017;27(1):138-148.
32. Botana-Rial M, Leiro-Fernández V, Represas-Represas C, González-Piñeiro A, Tilve-Gómez A, Fernández-Villar A. Thoracic ultrasound-assisted selection for pleural biopsy with Abrams needle. *Respir Care*. 2013;58(11):1949-1954.
33. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute.
34. Pelosi G, Scarpa A, Forest F, Sonzogni A. The impact of immunohistochemistry on the classification of lung tumors. *Expert Rev Respir Med*. 2016;10(10):1105-1121.

35. Hirsch FR, Suda K, Wiens J, Bunn PA Jr. New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2016;388(10048):1012-1024.
36. Rosell R, Moran T, Queralt C, et al. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*. 2009;361(10):958-967.
37. Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up *Ann Oncol*. 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237.
38. Majem M, Juan O, Insa A, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol*. 2019;21(1):3-17.
39. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15(4):504-535.
40. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1160-1174.
41. Arteaga CL. Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol*. 2002; 29: 3-9.
42. Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, et al. Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*. 2006;12(13):3908-3914.
43. Riely GJ, Pao W, Pham D, et al. Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 1):839-844.
44. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361(10):947-957.
45. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(3):239-246.

46. Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2011;12(8):735-742.
47. Suda K, Onozato R, Yatabe Y, Mitsudomi T. EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival?. *J Thorac Oncol.* 2009;4(1):1-4.
48. Le T, Gerber DE. Newer-Generation EGFR Inhibitors in Lung Cancer: How Are They Best Used?. *Cancers (Basel).* 2019;11(3):366.
49. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46(10):1773-1780.
50. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung. *N Engl J Med.* 2010;363(18):1693-1703.
51. Liao BC, Lin CC, Shih JY, Yang JC. Treating patients with ALK-positive non-small cell lung cancer: latest evidence and management strategy. *Ther Adv Med Oncol.* 2015;7(5):274-290.
52. Gimple RC, Wang X. RAS: Striking at the Core of the Oncogenic Circuitry. *Front Oncol.* 2019;9:965.
53. Metro G, Chiari R, Duranti S, et al. Impact of specific mutant KRAS on clinical outcome of EGFR-TKI-treated advanced non-small cell lung cancer patients with an EGFR wild type genotype. *Lung Cancer.* 2012;78(1):81-86.
54. Kim HR, Lim SM, Kim HJ, et al. The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2013;24(9):2364-2370.
55. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014;371(21):1963-1971.
56. Garrido-Castro AC, Felip E. HER2 driven non-small cell lung cancer (NSCLC): potential therapeutic approaches. *Transl Lung Cancer Res.* 2013;2(2):122-127.
57. Planchard D, Besse B, Groen HJM, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(7):984-993.

58. Pasquini G, Giaccone G. C-MET inhibitors for advanced non-small cell lung cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(4):363-375.
59. Rami-Porta R. 2016. Staging Handbook in Thoracic Oncology. An International Association for the Study of Lung Cancer Publication. North Fort Myers, FL. Editorial Rx Press.
60. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, et al. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4(5):568-577.
61. Detterbeck FC, Lewis SZ, Diekemper R, Addrizzo-Harris D, Alberts WM. Executive Summary: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 Suppl):7S-37S.
62. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013;143(5 Suppl):e211S-e250S.
63. Sánchez de Cos J, Hernández JH, López MF, et al. SEPAR guidelines for lung cancer staging. *Arch Bronconeumol*. 2011;47(9):454-465.
64. De Leyn P, Dooms C, Kuzdzal J, et al. Preoperative mediastinal lymph node staging for non-small cell lung cancer: 2014 update of the 2007 ESTS guidelines. *Transl Lung Cancer Res*. 2014;3(4):225-233.
65. Lemaire A, Nikolic I, Petersen T, et al. Nine-year single center experience with cervical mediastinoscopy: complications and false negative rate. *Ann Thorac Surg*. 2006;82(4):1185-1190.
66. Zieliński M. Video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy and transcervical extended mediastinal lymphadenectomy. *Thorac Surg Clin*. 2012;22(2):219-225.
67. Zielinski M, Szlubowski A, Kołodziej M, et al. Comparison of endobronchial ultrasound and/or endoesophageal ultrasound with transcervical extended mediastinal lymphadenectomy for staging and restaging of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2013;8(5):630-636.

68. Ge X, Guan W, Han F, Guo X, Jin Z. Comparison of Endobronchial Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration and Video-Assisted Mediastinoscopy for Mediastinal Staging of Lung Cancer. *Lung*. 2015;193(5):757-766.
69. Zhang R, Ying K, Shi L, Zhang L, Zhou L. Combined endobronchial and endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for mediastinal lymph node staging of lung cancer: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2013;49(8):1860-1867.
70. Vilmann P, Clementsen PF, Colella S, et al. Combined endobronchial and esophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European Respiratory Society (ERS) and the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *Endoscopy*. 2015;47(6):c1.
71. Dooms C, Decaluwe H, De Leyn P. Mediastinal staging. *ERS Monograph*. 2015; 68: 159-66.
72. Fujiwara T, Yasufuku K, Nakajima T, et al. The utility of sonographic features during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for lymph node staging in patients with lung cancer: a standard endobronchial ultrasound image classification system. *Chest*. 2010;138(3):641-647.
73. Nakajima T, Anayama T, Shingyoji M, Kimura H, Yoshino I, Yasufuku K. Vascular image patterns of lymph nodes for the prediction of metastatic disease during EBUS-TBNA for mediastinal staging of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2012;7(6):1009-1014.
74. Dietrich CF, Jenssen C, Herth FJ. Endobronchial ultrasound elastography. *Endosc Ultrasound*. 2016;5(4):233-238.
75. Dong X, Qiu X, Liu Q, Jia J. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the mediastinal staging of non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann Thorac Surg*. 2013;96(4):1502-1507.
76. Ernst A, Anantham D, Eberhardt R, Krasnik M, Herth FJ. Diagnosis of mediastinal adenopathy-real-time endobronchial ultrasound guided needle aspiration versus mediastinoscopy. *J Thorac Oncol*. 2008;3(6):577-582.

77. Yasufuku K, Pierre A, Darling G, et al. A prospective controlled trial of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration compared with mediastinoscopy for mediastinal lymph node staging of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;142(6):1393-400.e1.
78. Herth FJ, Eberhardt R, Vilmann P, Krasnik M, Ernst A. Real-time endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for sampling mediastinal lymph nodes. *Thorax*. 2006;61(9):795-798.
79. Ong P, Grosu H, Eapen GA, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for systematic nodal staging of lung cancer in patients with N0 disease by computed tomography and integrated positron emission tomography-computed tomography. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(3):415-419.
80. Shingyoji M, Nakajima T, Yoshino M, et al. Endobronchial ultrasonography for positron emission tomography and computed tomography-negative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2014;98(5):1762-1767.
81. Vial MR, O'Connell OJ, Grosu HB, et al. Diagnostic performance of endobronchial ultrasound-guided mediastinal lymph node sampling in early stage non-small cell lung cancer: A prospective study. *Respirology*. 2018;23(1):76-81.
82. Murgu SD. Diagnosing and staging lung cancer involving the mediastinum. *Chest*. 2015; 147: 1401-12.
83. Hwangbo B, Lee GK, Lee HS, et al. Transbronchial and transesophageal fine-needle aspiration using an ultrasound bronchoscope in mediastinal staging of potentially operable lung cancer. *Chest*. 2010;138(4):795-802.
84. Nakajima T, Yasufuku K, Suzuki M, Hiroshima K, Kubo R, Mohammed S, et al. Assessment of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation by Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration. *Chest* 2007;132:597–602.
85. Garcia-Olivé I, Monsó E, Andreo F, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for identifying EGFR mutations. *Eur Respir J*. 2010;35(2):391-395.
86. Jurado J, Saqi A, Maxfield R, et al. The efficacy of EBUS-guided transbronchial needle aspiration for molecular testing in lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 2013;96(4):1196-1202.

87. Sakairi Y, Nakajima T, Yasufuku K, et al. EML4-ALK fusion gene assessment using metastatic lymph node samples obtained by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Clin Cancer Res.* 2010;16(20):4938-4945.
88. Navani N, Brown JM, Nankivell M, et al. Suitability of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for subtyping and genotyping of non-small cell lung cancer: a multicenter study of 774 patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(12):1316-1322.
89. Folch E, Yamaguchi N, VanderLaan PA, et al. Adequacy of lymph node transbronchial needle aspirates using convex probe endobronchial ultrasound for multiple tumor genotyping techniques in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2013;8(11):1438-1444.
90. van der Heijden EH, Casal RF, Trisolini R, et al. Guideline for the acquisition and preparation of conventional and endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens for the diagnosis and molecular testing of patients with known or suspected lung cancer. *Respiration.* 2014;88(6):500-517.
91. Wang G, Ionescu DN, Lee CH, et al. PD-L1 testing on the EBUS-FNA cytology specimens of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2019;136:1-5.
92. Xie F, Zheng X, Mao X, et al. Next-Generation Sequencing for Genotyping of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Samples in Lung Cancer. *Ann Thorac Surg.* 2019;108(1):219-226.
93. Annema JT, van Meerbeeck JP, Rintoul RC, et al. Mediastinoscopy vs endosonography for mediastinal nodal staging of lung cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2010;304(20):2245-2252.
94. Herth FJ, Eberhardt R, Krasnik M, Ernst A. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration of lymph nodes in the radiologically and positron emission tomography-normal mediastinum in patients with lung cancer. *Chest.* 2008;133(4):887-891.
95. El-Osta H, Jani P, Mansour A, Rascoe P, Jafri S. Endobronchial Ultrasound for Nodal Staging of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer with Radiologically Normal Mediastinum. A Meta-Analysis. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(7):864-874.

96. Leong TL, Loveland PM, Gorelik A, Irving L, Steinfort DP. Preoperative Staging by EBUS in cN0/N1 Lung Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Bronchology Interv Pulmonol*. 2019;26(3):155-165.
97. Call S, Obiols C, Rami-Porta R, et al. Video-Assisted Mediastinoscopic Lymphadenectomy for Staging Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg*. 2016;101(4):1326-1333.
98. Decaluwé H, Dooms C, D'Journo XB, et al. Mediastinal staging by videomediastinoscopy in clinical N1 non-small cell lung cancer: a prospective multicentre study. *Eur Respir J*. 2017;50(6):1701493.
99. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(3):321-346. Solomon SB, Zakowski MF, Pao W, et al. Core needle lung biopsy specimens: adequacy for EGFR and KRAS mutational analysis. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;194(1):266-269.
100. Schneider F, Smith MA, Lane MC, Pantanowitz L, Dacic S, Otori NP. Adequacy of core needle biopsy specimens and fine-needle aspirates for molecular testing of lung adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2015;143(2):193-306.
101. Cameron SE, Andrade RS, Pambuccian SE. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration cytology: a state of the art review. *Cytopathology*. 2010;21(1):6-26.
102. Griffin AC, Schwartz LE, Baloch ZW. Utility of on-site evaluation of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration specimens. *Cytojournal*. 2011;8:20.
103. Casadio C, Guarize J, Donghi S, et al. Molecular Testing for Targeted Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Suitability of Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration. *Am J Clin Pathol*. 2015;144(4):629-634.

104. Collins BT, Chen AC, Wang JF, Bernadt CT, Sanati S. Improved laboratory resource utilization and patient care with the use of rapid on-site evaluation for endobronchial ultrasound fine-needle aspiration biopsy. *Cancer Cytopathol* 2013;121:544-51.



## **X. ANEXOS**

**1. ANEXO 1**  
**PUBLICACIONES RELACIONADA A LA TESIS**

- Andreo García F, Centeno Clemente CÁ, Sanz Santos J, Barturen Barroso Á, Hernández Gallego A, Ruiz Manzano J. Initial experience with real-time elastography using an ultrasound bronchoscope for the evaluation of mediastinal lymph nodes. Arch Bronconeumol. 2015 Feb;51(2):e8-e11.



## Nota clínica

## Experiencia inicial con elastografía en tiempo real mediante ecobroncoscopio en la evaluación de ganglios linfáticos mediastínicos



Felipe Andreo García<sup>a,b,c,e,\*</sup>, Carmen Ángela Centeno Clemente<sup>a</sup>, José Sanz Santos<sup>a</sup>,  
Ángel Barturen Barroso<sup>c</sup>, Alba Hernández Gallego<sup>d</sup> y Juan Ruiz Manzano<sup>a,b,e</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Neumología, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

<sup>b</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España

<sup>c</sup> Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario de Cruces, Baracaldo, Vizcaya, España

<sup>d</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, España

<sup>e</sup> Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España

## INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

## Historia del artículo:

Recibido el 26 de enero de 2014

Aceptado el 14 de abril de 2014

On-line el 31 de octubre de 2014

## Palabras clave:

Elastografía

Ultrasonografía endobronquial

Ultrasonografía endoscópica

Cáncer de pulmón

## RESUMEN

La elastografía en tiempo real realizada durante la ultrasonografía endoscópica digestiva es una técnica relativamente nueva que permite caracterizar la dureza de los tejidos, y ha sido utilizada con éxito como predictor de malignidad en ganglios mediastínicos.

En la presente nota clínica se describe nuestra experiencia práctica en la técnica de la elastografía con ecobroncoscopio en el estudio de los ganglios linfáticos mediastínicos. Presentamos un caso realizado mediante ultrasonografía endobronquial sectorial y el primer caso publicado de elastografía por ultrasonografía endoscópica con ecobroncoscopio, en 2 pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico. El patrón cualitativo en color del tejido se obtuvo en ambos casos y se correlacionó con la evaluación anatomopatológica.

Los resultados de viabilidad iniciales son prometedores y las aplicaciones ecobroncoscópicas, como la estadificación ganglionar guiada, requieren ser evaluadas. Categorizar el riesgo de malignidad puede ser importante para ayudar a tomar decisiones en la obtención de muestras.

© 2014 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Initial Experience With Real-Time Elastography Using an Ultrasound Bronchoscope for the Evaluation of Mediastinal Lymph Nodes

## ABSTRACT

Real-time elastography performed during endoscopic ultrasonography is a relatively new method for characterizing tissue stiffness, and has been used successfully as a predictor of malignancy in mediastinal lymph nodes.

This case report describes our practical experience with this technique using an ultrasound bronchoscope to examine mediastinal lymph nodes. We present a case of sectorial endobronchial ultrasound and the first published case of endoscopic ultrasound elastography using ultrasound bronchoscope in two patients with non-small cell lung carcinoma. Qualitative tissue color pattern was obtained in both cases and correlated with pathological evaluation.

The initial feasibility results are promising and suggest that ultrasound bronchoscopy techniques, such as guided nodal staging, merit additional studies. It may be important to categorize the risk of malignancy to facilitate sampling decisions.

© 2014 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Keywords:

Elastography

Endobronchial ultrasound

Endoscopic ultrasound

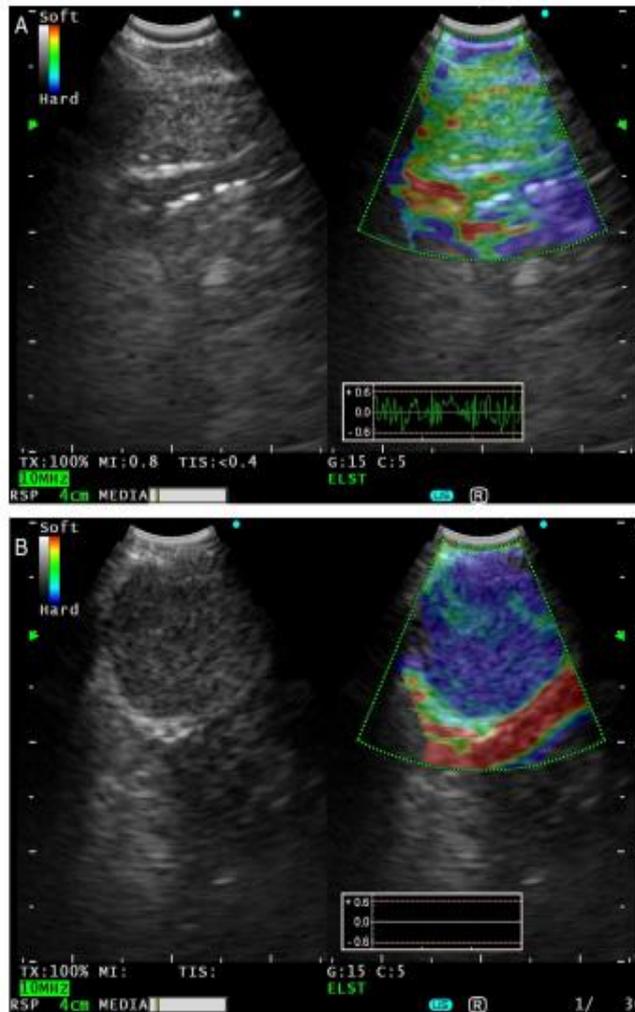
Lung cancer

## Introducción

La clasificación precisa de los ganglios linfáticos en benignos y malignos es importante para la estadificación del cáncer de pulmón. Los criterios ultrasonográficos morfológicos

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fandre@separ.es (F. Andreo García).



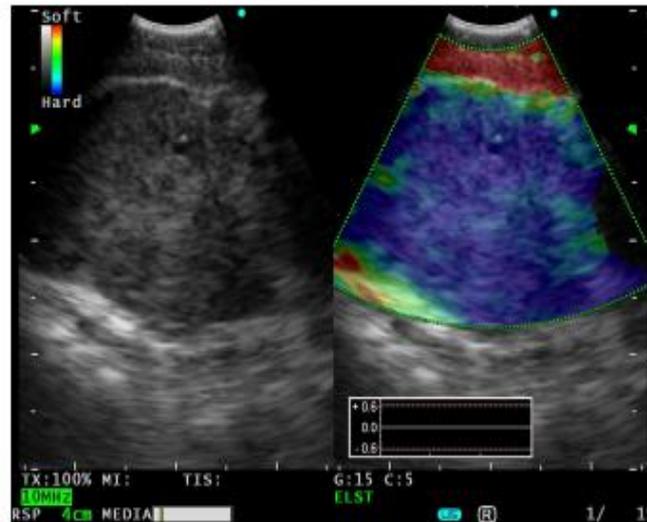
**Figura 1.** A) La imagen de USEB convencional en modo B de escala de grises (izquierda) y en modo elastografía en tiempo real mediante USEB (derecha) muestra un ganglio linfático subcarinal benigno de 6,6 mm, visualizado como un área de rigidez intermedia (verde). B) La imagen de elastografía por USEB (derecha) muestra una adenopatía subcarinal maligna de 12,6 mm que se visualiza como un área dura (azul oscuro-cian) debida a infiltración ganglionar por carcinoma escamoso.

en modo B para la detección de ganglios linfáticos malignos durante la ultrasonografía endobronquial (USEB) pueden ser útiles para la predicción de metástasis<sup>1,2</sup>. Sin embargo, la concordancia inter e intraobservador no es lo suficientemente buena para la mayoría de los signos ultrasonográficos<sup>3</sup>. Una alternativa podría ser la aplicación de la elastografía endosonográfica. Este método proporciona información sobre la elasticidad o rigidez relativa de un tejido mediante imágenes en color, aprovechando la deformación de las estructuras causada por la compresión o las vibraciones, que permite clasificarlo como benigno o maligno. Únicamente se dispone de una publicación previa<sup>4</sup> sobre la elastografía durante la USEB, pero se ha utilizado con buenos resultados en la ultrasonografía endoscópica (USE), con una excelente concordancia interobservador<sup>5</sup>.

## Observación clínica

### Caso 1

Varón de 66 años, exfumador desde hacía 4 años, con antecedentes de EPOC moderada y derrame pleural izquierdo en estudio con citología negativa para malignidad. En los últimos 4 meses había presentado 2 episodios de neumonía en el lóbulo inferior izquierdo (LII). Consulta en urgencias por dolor pleurítico izquierdo, incremento de la tos y mal estado general. La PET-TAC mostró una masa necrótica hipermetabólica en LII y adenopatías hipermetabólicas paratraqueales inferiores izquierdas, subcarinales-paraesofágicas izquierdas y paraaórtica izquierda, compatibles con metástasis. Se practicó una broncoscopia, en la que se apreció una tumoración endobronquial en el bronquio del segmento 10 de LII. La citología



**Figura 2.** En el modo B se visualiza una adenopatía subcarinal de 20,7 mm. La elastografía en tiempo real con ultrasonografía endoscópica con ecobroncoscopio (USE-B) indica una infiltración homogénea y completa de la adenopatía (color azul).

del cepillado bronquial fue compatible con carcinoma escamoso. Se efectuó una ecobroncoscopia (BF-UC180F Olympus, Japón), en la que se puncionaron ganglios 4R n.º 1 (5,4 mm), 4R n.º 2 (5,9 mm), 4R n.º 3 (7,5 mm), 7 n.º 1 (6,6 × 21,4 mm), 4L n.º 1 (13,1 × 15,4 mm) y 7 n.º 2 (12,6 × 15,5 mm) tras cambio de aguja. Los ganglios 7 n.º 1 y 7 n.º 2 se examinaron en el modo elastografía (procesador EU-ME2 Premier Plus Olympus, Japón), obteniéndose un patrón cualitativo de imágenes en color donde las áreas de tejido de mayor consistencia estaban en azul oscuro, las intermedias en verde y las más blandas en rojo (fig. 1A y B). En el modo de pantalla doble, la imagen del modo B se muestra a la izquierda, y a la derecha se superpone la imagen de la codificación de colores de las respuestas de tensión con la imagen ultrasonográfica del modo B. La región de interés para los cálculos de la elastografía se seleccionó manualmente e incluyó el ganglio y los tejidos adyacentes. Las punciones fueron negativas para células malignas, excepto las de 4L n.º 1 y 7 n.º 2, con diagnóstico de metástasis de carcinoma escamoso y necrosis tumoral.

#### Caso 2

Varón de 74 años, fumador, con hipertensión arterial, dislipidemia, infarto agudo de miocardio antiguo y poliglobulia. Refería cuadro de disfonía progresiva desde hacía mes y medio y cuadro de inestabilidad desde hacía 3-4 meses, pero que en los últimos días se había intensificado hasta impedir la bipedestación. En la TAC torácica se observó un nódulo pulmonar de 2 cm en el lóbulo superior derecho, sugestivo de neoformación pulmonar primaria, múltiples pequeños nódulos pulmonares bilaterales sugestivos de metástasis y múltiples adenopatías mediastínicas aumentadas de tamaño. Se realizó una TAC craneal, en la que se apreciaron signos radiológicos compatibles con múltiples metástasis cerebrales. Con el ecobroncoscopio (bajo sedación consciente [midazolam]) se accedió por vía esofágica, dada la existencia de importante edema cerebral<sup>6</sup>, y se visualizó una adenopatía subcarinal de 20 mm que se puncionó. El modo elastografía indicaba que la consistencia estaba marcadamente aumentada (fig. 2). El diagnóstico fue metástasis de adenocarcinoma de pulmón.

#### Discusión

La elastografía tiene el potencial de mejorar el rendimiento diagnóstico de la punción guiada por USE al discriminar entre los ganglios benignos y malignos<sup>7,8</sup>. Podría ser también útil en la identificación de las áreas malignas de las adenopatías con afectación heterogénea y dirigir la punción hacia estas áreas. En un metaanálisis reciente se calculó una sensibilidad de la elastografía durante la USE del 88% y una especificidad del 85%, para la diferenciación entre ganglios linfáticos benignos y malignos<sup>9</sup>.

En el acceso traqueobronquial se ha planteado la posibilidad de que la técnica pudiera estar limitada por la consistencia y la superficie irregular de los cartílagos y la dificultad en la compresión con el extremo distal del ecobroncoscopio. En nuestro primer caso con USEB se pudo obtener imágenes fijas de elastografía a partir de una secuencia dinámica y adecuadas para el análisis de elasticidad, que se correspondió con los resultados citológicos de las punciones. El acceso por vía esofágica con ecobroncoscopio tampoco supuso una limitación. Probablemente el movimiento de los tejidos inducido por los movimientos respiratorios o cardiacos haya determinado el desplazamiento de los ganglios respecto a la pared bronquial o esofágica y el transductor.

En conclusión, la elastografía es una técnica de caracterización tisular viable durante la exploración ecobroncoscópica, y que podría ayudar a predecir la presencia de ganglios malignos y mejorar la toma de muestras. Se requiere la realización de estudios que evalúen la utilidad de la elastografía por USEB en series amplias de pacientes.

#### Financiación

Trabajo financiado parcialmente por Beca SEPAR 2010.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

**Bibliografia**

1. Garcia-Olivé I, Monsó E, Andreo F, Sanz J, Castellà E, Llatjós M, et al. Sensitivity of linear endobronchial ultrasonography and guided transbronchial needle aspiration for the identification of nodal metastasis in lung cancer staging. *Ultrasound Med Biol.* 2009;35:1271-7.
2. Fujiwara T, Yasufuku K, Nakajima T, Chiyo M, Yoshida S, Suzuki M, et al. The utility of sonographic features during endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for lymph node staging in patients with lung cancer: A standard endobronchial ultrasound image classification system. *Chest.* 2010;138:641-7.
3. Garcia-Olivé I, Radau J, Serra P, Andreo F, Sanz-Santos J, Monsó E, et al. Intra- and interobserver agreement among bronchial endosonographers for the description of intrathoracic lymph nodes. *Ultrasound Med Biol.* 2012;38:1163-8.
4. Trosini-Désert V, Jeny F, Taillade L, Vignot S, Zribi H, Capron F, et al. Bronchial endoscopic ultrasound elastography: Preliminary feasibility data. *Eur Respir J.* 2013;41:477-9.
5. Janssen J, Dietrich CF, Will U, Greiner L. Endosonographic elastography in the diagnosis of mediastinal lymph nodes. *Endoscopy.* 2007;39:952-7.
6. Hwangbo B, Lee HS, Lee GK, Lim KY, Lee SH, Kim HY, et al. Transoesophageal needle aspiration using a convex probe ultrasonic bronchoscope. *Respirology.* 2009;14:843-9.
7. Săftoiu A, Vilmann P, Hassan H, Gorunescu F. Analysis of endoscopic ultrasound elastography used for characterisation and differentiation of benign and malignant lymph nodes. *Ultraschall Med.* 2006;27:535-42.
8. Paterson S, Duthie F, Stanley AJ. Endoscopic ultrasound-guided elastography in the nodal staging of oesophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2012;18:889-95.
9. Xu W, Shi J, Zeng X, Li X, Xie WF, Guo J, et al. EUS elastography for the differentiation of benign and malignant lymph nodes: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc.* 2011;74:1001-9.



**2. ANEXO 2**  
**PRESENTACIONES EN CONGRESOS**  
**RELACIONADAS A LA TESIS**

- Cytology sample from EBUS-TBNA for multi-gene analysis in non-small-cell lung cancer (NSCLC). **Carmen Centeno Clemente**, José Sanz Santos, Felipe Andreo, Enric Carcereny, Teresa Morán, Eva Castellà, Mariona Llatjòs, Ana María Muñoz-mármol, José Luis Ramírez, Rafael Rosell, Juan Ruiz-Manzano. European Respiratory Journal Sep 2014, 44 (Suppl 58) P336. ERS congress, Munich 2014. [https://erj.ersjournals.com/content/44/Suppl\\_58/P336](https://erj.ersjournals.com/content/44/Suppl_58/P336).



# Cytology sample from EBUS-TBNA for multi-gene analysis in non-small-cell lung cancer (NSCLC)

Carmen Centeno Clemente, Jose Sanz-Santos, Felipe Andreo, Enric Carcereny, Teresa Moran, Eva Castellà, Mariona Llatjós, Ana María Muñoz-Mármol, José Luis Ramírez, Rafael Rosell, Juan Ruiz-Manzano  
European Respiratory Journal 2014 44: P336; DOI:

Article

Info & Metrics

## Abstract

### BACKGROUND

Identification of distinct oncogenic driver mutations is routinely used to guide clinical care in NSCLC patients (p). Tumor tissue availability is one of the major challenges for NSCLC genotyping. Cytology samples from EBUS-TBNA are one of the main sources of tumor tissue in NSCLC.

### METHODS

We aimed to prospectively assess the utility of cytology samples from EBUS-TBNA for molecular characterization of NSCLC p. NSCLC p with stage IIIA, IIIB and IV were included; smoker p with squamous histology excluded. Molecular analyses for EGFR, KRAS, ALK, ROS1, BRAF and HER2 were performed sequentially. DNA sequencing for EGFR, KRAS, BRAF and HER2 was performed, and FISH for ALK and ROS1; both were analyzed by Molecular Biology Laboratory and Pathology Department, respectively.

### RESULTS

From January 2013, 21 p were included (16 male, median age 63). 63 lymph nodes and 2 lung masses were analyzed and diagnosed malignant in 41%. Most frequently punctured lymph node stations were 4R, 4L, 7 and 11L. Cytology sample was sufficient in 71.4% (15/21) to perform sequential molecular analysis, either complete or until molecular alteration was detected. EGFR mutational status was possible in 21/21(100%) p, with 2 positive results (9.5%). KRAS mutations were tested in 20/20 (100%), with 3 positive results (15%). ALK rearrangements were tested in 16/19 (84.2%), with 1 positive (1/16[6.3%]). ROS1 was analyzed in 14/18 (77.8%) with no rearrangements found. No mutations found in HER2 and BRAF in 12/16(75%) and in 13/17 (76.5%), respectively.

### CONCLUSIONS

Cytology samples from EBUS-TBNA are a suitable source of material for complete molecular genotyping in NSCLC p.

Sponsored by Menarini and AEER award A. Castellà.



- Is cytology sample from endobronchial ultrasound (EBUS)-guided transbronchial needle aspiration (TBNA) sufficient for analysis of major known driver mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC)? Enric Carcereny, **Carmen Centeno**, Ana Muñoz, Teresa Moran, Cristina Queralt, Montserrat Tierno, Felipe Andreo, Mariona Llatjòs, José Luis Ramirez, Anna Estival, Pere Serra, Itziar de Aguirre, Eva Castellà, Erika Mijangos, Ana Montañes, María de los Llanos Gil, Laia Vila, Juan Ruiz Manzano, Rafael Rosell. *Journal of Clinical Oncology* 32, n°.15\_suppl. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15\_suppl.e22110.

## Is cytology sample from endobronchial ultrasound (EBUS)-guided transbronchial needle aspiration (TBNA) sufficient for analysis of major known driver mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC)?

[Enric Carcereny](#), [Carmen Centeno](#), [Ana Munoz](#), [Teresa Moran](#), [Cristina Queralt](#), [Montserrat TiernoFelipe Andreo](#), [Mariona Llatjos](#), [Jose Luis Ramirez](#), [Anna Estival](#), [Pere Serra](#), [Itziar de Aguirre](#), [Eva Castella](#), [Monica Botia](#), [Erika Mijangos](#), [Ana Montañes](#), [Maria de los Llanos Gil](#), [Laia Vila](#), [Juan Ruiz Manzano](#), [Rafael Rosell](#)

Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Molecular Biology. HU Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Institut Català d'Oncologia, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; Catalan Institute Of Oncology, Badalona, Spain; Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona, Spain; Institut Català d'Oncologia Badalona- HU Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain; Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain; Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Institut Català d'Oncologia Badalona- HU Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Institut Català d'Oncologia Badalona- HU Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain; Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, St. Eustatius; Catalan Institute of Oncology, Hospital Germans Trias i Pujol, Pangaea Biotech, Cancer Therapeutics Innovation Group, USP Institut Universitari Dexeus, Barcelona, Spain

[Show Less](#)

[Abstract Disclosures](#) 

### Abstract

e22110

**Background:** Identification of distinct oncogenic driver mutations is routinely used to guide clinical care in NSCLC patients (p). Tumor tissue availability is one of the major challenges for NSCLC genotyping. Cytology samples from EBUS-TBNA are one of the main sources of tumor tissue in NSCLC. **Methods:** We aimed to prospectively assess the utility of cytology samples from EBUS-TBNA for molecular characterization of NSCLC p. NSCLC p with stage IIIA, IIIB and IV were included; smoker p with squamous histology excluded. Molecular analyses for EGFR, KRAS, ALK, ROS1, BRAF and HER2 were performed sequentially. Between 8 and 150 tumor cells were captured by laser microdissection. DNA sequencing for EGFR, KRAS, BRAF and HER2 was performed, and FISH for ALK and ROS1 was analyzed by the Molecular Biology Laboratory and the Pathology Department, respectively (Germans Trias i Pujol Hospital). **Results:** From January 2013, 21 p were included (16 male, median age 63). Sixty-three lymph nodes and 2 lung masses were analyzed and diagnosed malignant in 41%. Most frequently punctured lymph node stations were 4R, 4L, 7 and 11L. Cytology sample was sufficient in 71.4% (15/21) to perform sequential molecular analysis, either complete or until molecular alteration was detected. *EGFR* mutational status was possible in 21/21(100%) p, with 2 positive results (9.5%). *KRAS* mutations were tested in 20/20 (100%), with 3 positive results (15%). *ALK* rearrangements were tested in 16/19 (84.2%), with 1 positive result (1/16[6.29%]). *ROS1* was analyzed in 14/18 p (77.8%) with no rearrangements found. No mutations found in *HER2* and *BRAF* in 12/16(75%) and in 13/17 (76.5%), respectively. **Conclusions:** Cytology samples from EBUS-TBNA are a suitable source of material for a complete molecular genotyping in NSCLC p.

© 2014 by American Society of Clinical Oncology

- Identification of hormone receptors and HER-2 in samples of mediastinal nodal metastases of breast carcinoma obtained through endobronchial ultrasound. **Carmen Centeno**, José Sanz-Santos, Felipe Andreo, Pere Serra, Gloria Bonet, Beatriz Cirauqui, Mireia Margeli, Rafael Rosell, Mariona Llatjòs, Eva Castellà, Juan Ruiz Manzano. European Respiratory Journal Sep 2013 (Suppl 57) P436. ERS congress, Barcelona 2013. [https://erj.ersjournals.com/content/42/Suppl\\_57/P436](https://erj.ersjournals.com/content/42/Suppl_57/P436).

## European Respiratory Society Annual Congress 2013

Abstract Number: 50  
Publication Number: P436

**Abstract Group:** 1.4. Interventional Pulmonology

**Keyword 1:** Bronchoscopy **Keyword 2:** Thoracic oncology **Keyword 3:** Treatments

**Title:** Identification of hormone receptors and HER-2 in samples of mediastinal nodal metastases of breast carcinoma obtained through endobronchial ultrasound

Dr. Carmen 371 Centeno carmencen@hotmail.com MD <sup>1</sup>, Dr. Jose 361 Sanz-Santos jsanzsantos@gmail.com MD <sup>1</sup>, Dr. Felipe 362 Andreo fandreo@separ.es MD <sup>1</sup>, Dr. Pere 363 Serra pereserra11@hotmail.com MD <sup>1</sup>, Dr. Gloria 364 Bonet gbonet.germanstrias@gencat.cat MD <sup>1</sup>, Dr. Beatriz 365 Cirauqui bcirauqui@iconcologia.cat MD <sup>2</sup>, Dr. Mireia 366 Margeli mmargeli@iconcologia.cat MD <sup>2</sup>, Dr. Rafael 367 Rosell rrosell@iconcologia.cat MD <sup>2</sup>, Dr. Mariona 368 Llatjós mllatjos.germanstrias@gencat.cat MD <sup>3</sup>, Dr. Eva 369 Castellà ecastella.germanstrias@gencat.cat MD <sup>3</sup> and Dr. Juan 370 Ruiz-Manzano jruiz@separ.es MD <sup>1</sup>. <sup>1</sup> Pulmonology Department, Hospital Universitari Germans Trias I Pujol, Badalona, Barcelona, Spain, 08916 ; <sup>2</sup> Oncology Department, Catalan Institute of Oncology, Badalona, Barcelona, Spain, 08916 and <sup>3</sup> Pathology Department, Hospital Universitari Germans Trias I Pujol, Badalona, Barcelona, Spain, 08916 .

**Body:** Aim: The expression of estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in samples of metastatic breast carcinoma can differ from the primary tumor in 20% of cases. The absence of receptors and the presence of HER2 protooncogene is associated with resistance to tamoxifen. The aim of this study is to determine the ability of the samples of mediastinal nodal metastases of breast carcinoma obtained by endobronchial ultrasound (EBUS) for the identification of ER, PR and HER2. Patients and method: We prospectively included patients with a final diagnosis of breast cancer with mediastinal nodal metastases diagnosed by EBUS. The determination of hormone receptors was performed by immunohistochemistry using antibody 6F11 antireceptor estrogen and progesterone antireceptor antibody 5D10. The reference threshold to establish a positive result was placed in a 1% of tumor cells. HER2 staining was determined by Herceptest and positive cases were confirmed by fluorescence in situ hybridization. Results: Fourteen patients were included. Estrogen receptors could be identified in 12 (85.7%) cases, progesterone receptors in 8 (57.1%) and HER2 in 8 (57.1%). In 5 cases there were no information about the primary tumor status and thereby changes in the status of PE, RE and HER2 could not be assessed. Of the remaining 7 patients, only one (14.2%) case showed a change (negativisation) in a progesterone receptor. Conclusion: Samples of mediastinal nodal metastases of breast carcinoma obtained through EBUS are suitable for the identification of hormone receptors and HER2.

- Features and safety of deep sedation in endosonography: Comparative study between the airway and the esophageal route. Nancy Pérez Rodas, **Carmen Centeno Clemente**, F. Andreo García, E. Cases Viedma, P. Vila Caral, J. Sanz Santos, A. Briones Gómez, C. Martínez Rivera, R. Martínez Tomás, Juan Ruiz-Manzano, N. Pérez. *European Respiratory Journal* Sep 2015, 46 (Suppl 59) PA325, DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA325. ERS congress Amsterdam 2015.



# Features and safety of deep sedation in endosonography. Comparative study between the airway and the esophageal route

Eli Nancy Perez Rodas, Carmen Centeno Clemente, Felipe Andreo Garcia, Enrique Cases Viedma, Pere Vila Caral, Jose Sanz Santos, Andres Briones Gomez, Carlos Martinez Rivera, Pere Serra Mitja, Juan Ruiz Manzano

European Respiratory Journal 2015 46: PA325; DOI: 10.1183/13993003.congress-2015.PA325

Article

Info & Metrics

## Abstract

**Objective:** To compare the required doses of sedatives, sedation level achieved and complications in patients who underwent transesophageal ultrasound using a convex probe bronchoscope (EUS-B) or endobronchial ultrasound (EBUS).

**Material and Methods:** We included 38 patients sedated with propofol and remifentanil infusion. Two groups were established: group A (EUS-B) of 19 patients and group B (EBUS) with a cohort of 19 patients. Blood pressure (BP), heart and respiratory rate, oxygen saturation and depth of sedation with the visual analogue scale of sedation (VAS) were monitored. Patients received supplemental oxygen (FIO<sub>2</sub> 50%). Mann Whitney U test was used for quantitative variables and the Chi-square test for qualitative variables. The level of significance was set at  $\leq 0.05$ .

**Results:** When comparing no significant differences between baseline variables were observed. Significant differences were observed in total doses of propofol: 279 mg vs. 401 mg ( $p=0.003$ ) and remifentanil: 83 mcg vs. 139 mcg ( $p=0.002$ ), weight and time adjusted doses: Propofol 6.6 vs 8.2 mg/Kg/h ( $p=0.029$ ) and remifentanil 0.03 vs. 0.04 mcg/Kg/min ( $p=0.009$ ) and the mean of the VAS: 8.75 vs 9.56 ( $p=0.020$ ). Apnea and desaturation were less frequent in the group of EUS-B: 1 vs. 3 ( $p=0.290$ ) and 0 ( $n=18$ ) versus 5 ( $p=0.039$ ). The BP was reduced more than 25% of baseline (74% in group A, 79% in group B). In group A there were 4 complications requiring pharmacologic treatment (hypotension) and in group B 3 (2 hypotension and 1 desaturation that required Boussignac CPAP).

**Conclusions:** Patients who underwent EUS-B required fewer doses of sedatives, less sedation depth and had fewer respiratory complications.

- Morphometric analysis of cell blocks obtained by endobronchial ultrasound-guided needle aspiration in lung cancer. Patricia Azahara Raya Marquez, **Carmen Centeno Clemente**, Felipe Andreo García, Marta Avila Terzi, Enric Carcereny Costa, Ana María Muñoz-Mármol, José Ramírez Serrano, María del Pilar Armengol, Mohamed Torkey, Juan Ruiz Manzano. *European Respiratory Journal* Sep 2017, 50 (suppl 61) PA834. ERS Congress Milan 2017. DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA834.



# Morphometric analysis of cell blocks obtained by endobronchial ultrasound-guided needle aspiration in lung cancer

Patricia Azahara Raya Marquez, Carmen Angela Centeno Clemente, Felipe Andreo Garcia, Marta Avila, Enric Carcereny, AM Muñoz, Jose Ramirez, Maria del Pilar Armengol, Mohamed Torky, Juan Ruiz Manzano

European Respiratory Journal 2017 50: PA834; DOI: 10.1183/1393003.congress-2017.PA834

Article

Info & Metrics

## Abstract

**Background:** The quantitative composition of cytological samples processed as biopsies is important to determination of molecular studies in advanced lung cancer. It isn't known exactly the tissue distribution of cell blocks (CB).

**Objective:** Determine the composition of microscopic pathologic CB obtained by EBUS-TBNA or EUS-B-FNA.

**Methods:** Prospective study, which included CB obtained by EBUS-TBNA or EUS-FNA with needle 22G of pts with suspected of advanced NSCLC. Imaging for morphometric analysis was performed using a light microscope (Axioskop2) with 5x objective; were digitized, and photomicrographs of the areas of interest were obtained and analyzed with ZEN-Blue 2011 software through the use of a metering module, which extrapolates to metric dimensions. Images were evaluated by a cytologist and total area, tumor area, and non-tumor area were calculated. PCR and IHC were performed to analyze molecular mutations (EGFR, KRAS, HER2, BRAF, ALK, ROS1).

**Results:** 12 CB of 9 pts, 65.22 ± 8.6 yrs. 5 EBUS-TBNA. 8 mediastinal LN and 1 posterior mediastinal mass. The most punctured stations: 4R (2) and 4L (2). All cases were adenocarcinoma, 1 in stage IIIA, IIIB stage 2, 6 stage IV. The average number of punctures was 3.13. 6 genetic alterations determination was performed in 3 CB. For CB: total area average was 2.43 mm<sup>2</sup> (0.53-6.85), total tumoral area average 0.51 mm<sup>2</sup> (0.01-2.76), and % of tumor area average 12.79%. Table 1.

**Conclusions:** The use of MA in BC obtained by EBUS allows calculation of tumor areas, could be useful for comparative studies with other types of samples or techniques to obtain tumor tissue.

Copyright ©the authors 2017

- Linear Ultrasonic Bronchoscope for the Transesophageal Assessment of Mediastinal or Pleuropulmonary Pathology: Additional Diagnostic Yield. **Carmen Centeno Clemente**, Felipe Andreo, Zoran Stojanovic, Jose Sanz, Gloria Bonet, Pere Serra, Mariona Llatjòs, Joan Ruiz. Chest 2014;145 (3\_MeetingAbstracts):500A. DOI:10.1378/chest.1823830.

## Linear Ultrasonic Bronchoscope for the Transesophageal Assessment of Mediastinal or Pleuropulmonary Pathology: Additional Diagnostic Yield

Carmen Centeno Clemente, MD; Felipe Andreo, MD; Zoran Stojanovic, MD; Jose Sanz, MD; Gloria Bonet, MD; Pere Serra, MD; Mariona Llatjós, MD; Joan Ruiz, MD  
Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

*Chest.* 2014;145(3\_MeetingAbstracts):500A. doi:10.1378/chest.1823830

### Abstract

**SESSION TITLE:** Bronchoscopy & Interventional Procedures

**SESSION TYPE:** Slide Presentations

**PRESENTED ON:** Monday, March 24, 2014 at 09:00 AM - 10:30 AM

**PURPOSE:** To evaluate the role of transesophageal endoscopic ultrasound with bronchoscope-guided fine-needle aspiration (EUS-B-FNA) in patients with mediastinal or paramediastinal lesions.

**METHODS:** Prospective study which included 279 consecutive patients (221 men; mean age 63, SD 13.08), referred to realize EBUS-TBNA, during a 20 months period. Cases that needed substituting or complementing the EBUS-TBNA for EUS-B-FNA were registered. In all the cases with previously realized EBUS-TBNA, cytological samples "in situ" were evaluated before realizing additional transesophageal exploration.

**RESULTS:** In 50 patients (17.9%) EUS-B-FNA was performed. In 4 cases indication for the procedure was completing the staging, in 9 cases was EBUS intolerance, 20 had inaccessible lesions or technical difficulties for EBUS-TBNA and 17 for being contraindicated or with high risk. A total of 77 lesions were punctured (range 4,2-48,9mm): 3 pulmonary left sided apical masses, 1 subaortic, 1 in the upper right lobe, 3 mediastinal masses, 1 pleural and 68 lymph nodes. In 26 cases (52%) additional diagnostic results were obtained (23 cytological and/or microbiological, 1 for

- PD-L1 determination in cytological and histological samples in patients with non-small cell lung cancer. Sonia Margarita Baeza Mena, **Carmen Angela Centeno Clemente**, Felipe Andreo García, Pere Serra Mitja, Rachid Tazi Mezalek, José Luis Mate Sanz, Carlos Marínez Barenys, Enric Carcereny Costa, Victor Margeli Cervera, Jorge Abad Capa. European Respiratory Journal 2018 52: PA882. ERS International Congress París 2018. DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA88.



# PD-L1 determination in cytological and histological samples in patients with non-small cell lung cancer

Sonia Margarita Baeza Mena, Carmen Angela Centeno Clemente, Felipe Andreo Garcia, Pere Serra Mitja, Rachid Tazi Mezalek, Jose Luis Mate Sanz, Carlos Martinez Barenys, Enric Carcereny Costa, Victor Margeli Cervera, Jorge Abad Capa

European Respiratory Journal 2018 52: PA882; DOI: 10.1183/13993003.congress-2018.PA882

Article

Info & Metrics

## Abstract

**Introduction:** The analysis of PD-L1 (programed cell death ligand) expression in tumor samples is important for treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC).

**Objective:** To evaluate PD-L1 determination in cyto-histological samples from patients with NSCLC.

**Methods:** were obtained cytological samples in form of cell blocks (endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration/EBUS-TBNA, US/CT guided fine needle aspiration) or histological samples (endobronchial, CT guided or surgical biopsy). To identify positive tumor cells for PD-L1, immunohistochemistry procedures have been used. Only were evaluated those cases in which  $\geq 100$  viable tumor cells were identified.

**Results:** We include 93 patients (83 men-89.2%), in 78.5% (73) of cases the sample was obtained from non-surgical procedures compared to 21.5% (20) at which a surgical technique was performed. In 23.3% (17/73) of non-surgical procedures were EBUS-TBNA. It was feasible to perform the PD-L1 determination in 99% (92), while only in one case (1%) was the sample insufficient being a histological sample (CT guided biopsy). Of the positive cases, in 14 (15.2%) there was high expression (positive in  $\geq 50\%$  of tumor cells) and in 26 (28.3%) there was low expression (positive in 1-49% of tumor cells). No differences were observed between the PD-L1 expression and the way that the sample was obtained, surgical vs non-surgical ( $p=0.169$ ), neither in the sample type, histological vs cytological ( $p=0.387$ ).

**Conclusions:** The PD-L1 determination is feasible in cytological samples in form of a cell block as an EBUS-TBNA, being a valid method compared to a histological sample obtained by surgical or non-surgical biopsy.

- Endobronchial Ultrasound for Mediastinal Restaging in Non-Small Cell Lung Cancer. S. Baeza Mena, **C. Centeno Clemente**, P. Serra Mitja, C. Martinez-Barenys, E. Carcereny, T. Moran, E. Castella Fernandez, J. Jove Teixido, A. Rosell, F. Andreo García. Journal of Thoracic Oncology, Volume 14, Issue 10, S825 - S826. World Conference on Lung Cancer 2019, Barcelona. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.1776>.

P2.13-05  
Endobronchial Ultrasound for Mediastinal Restaging  
in Non-Small Cell Lung Cancer



**S. Baeza Mena,<sup>1</sup> C. Centeno Clemente,<sup>1</sup> P. Serra Mitja,<sup>1</sup>  
C. Martínez-Barenys,<sup>2</sup> E. Carcereny,<sup>3</sup> T. Moran,<sup>4</sup>  
E. Castella Fernandez,<sup>5</sup> J. Jove Teixido,<sup>6</sup> A. Rosell,<sup>1</sup>**

**F. Andreu García<sup>1</sup>** <sup>1</sup>*Pneumología, Hospital Universitario Germans Trias I Pujol, Badalona/ES,* <sup>2</sup>*Thoracic Surgery, Hospital Universitari Germans Trias I Pujol, Badalona/ES,* <sup>3</sup>*Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology-Badalona; Hospital Universitari Germans Trias I Pujol; B-Argo; Igtp, Badalona/ES,* <sup>4</sup>*Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology-Badalona; B-Argo; Igtp, Badalona/ES,* <sup>5</sup>*Anatomía Patológica, Hospital Germans Trias I Pujol, Badalona/ES,* <sup>6</sup>*Oncología Radioterapéutica, Hospital Germans Trias I Pujol, Badalona/ES*

**Background:** The adequate mediastinal restaging following neo-adjuvant therapy (NAT) in operable patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and N2 spread is crucial. Mediastinoscopy is the gold standard for mediastinal restaging, but endosonographic procedures are less invasive and can be an alternative. **AIM:** Evaluate the role of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspirate EBUS-TBNA in mediastinal the restaging of NSCLC. **Method:** Prospective study with 32 patients with CPNCP N2 spread confirmed by TNBA-EBUS, collected from June 2010 to October 2018. These patients were subjected to neoadjuvant treatment (chemotherapy or radio-chemotherapy), subsequently were performed mediastinum restage with TNBA-EBUS. The negative cases were subjected to mediastinoscopy or thoracotomy. **Result:** Of the 32 cases, the basal characteristics are detailed in table 1. Were analysed 229 lymph nodes, 42 of these were malignant (18%). TNBA-EBUS after neoadjuvant treatment showed persistence of N2 spread in 19 cases (52%). In negative cases (n=13;

41%) were performed mediastinoscopy (n=11) or surgery (n=1). After these procedures were confirmed mediastinal disease in 3 cases, 9 lymph nodes of 43 removed. The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and diagnostic accuracy were 86.4%, 100%, 100%, 72.7% and 90% respectively. There was recurrence of the disease in 15 cases (47%). We found a significant difference between recurrence and the type of neoadjuvant treatment (chemotherapy vs. radio-chemotherapy), p=0.047. Table 1.

Basal Characteristics	N (32)
Age	62.1 +/- 9.4
Sex	
Male	23 (72%)
Tumour localization	
Right upper lobe	15 (47%)
Right lower lobe	8 (25%)
Left upper lobe	8 (25%)
Left lower lobe	1 (3%)
Histology	
Adenocarcinoma	15 (47%)
Squamous carcinoma	12 (37%)
NSCLC not typified	5 (16%)
Neoadjuvant treatment	
Chemoradiotherapy	26 (81%)
Only chemotherapy	6 (19%)

**Conclusion:** TBNA-EBUS is an appropriate semi-invasive tool in mediastinal restage after neoadjuvant treatment, with high diagnostic accuracy. Nevertheless, in negative cases is still necessary support with invasive procedures. **Keywords:** restaging, lung cancer, EBUS

- Tipificació molecular mitjançant secuenciació de nova generació en mostres citològiques obtingudes per Ultrasonografia Endobronquial. Blanca Urrutia Royo, Carlos Folgado López, **Carmen Centeno Clemente**, José Luis Mate Sanz, Enric Carcereny Costa, Pere Serra Mitja, Marta Ávila Terzi, Rachid Tazi Mezalek, Antoni Rosell Gratacós, Felipe Andreo García. SOCAP 2020, aplazado.

### **3. ANEXO 3**

## **FINANCIACIÓN**

La investigación realizada por esta tesis doctoral fue financiada por una beca de ayuda a la investigación de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR 198/2013), por el Premio Antonio Castellá a proyectos de Investigación en el XX Congreso de la Asociación Española de Endoscopia Respiratoria (AEER) en Cartagena – 2014, y por el 1º Premio Olympus a comunicaciones médicas en el XXIV Congreso Nacional de AEER en Bilbao - 2018. Adicionalmente, recibió el soporte del Programa de ayudas Germans Trias Talents – 2013, Hospital e Instituto Germans Trias i Pujol.

