



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

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**

Programa de doctorat en Medicina
Departament de Medicina

DIAGNÒSTIC I ESTADIFICACIÓ DEL CÀNCER DE PULMÓ

TESI DOCTORAL

Mireia Serra Fortuny

Director: Dr. Eduard Monsó i Molas

Tutor: Dr. Christian Domingo i Ribas

Tesi inscrita en el programa de Doctorat de Medicina

Departament de Medicina, Facultat de Medicina

Sabadell, 14 de gener de 2019



Departament de Medicina

Christian Domingo i Ribas, Professor agregat del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), de la Unitat Docent de Parc Taulí,

CERTIFICA:

Que la Tesi Doctoral titulada “**Diagnòstic i estadificació del càncer de pulmó**”,

presentada per Mireia Serra Fortuny inscrita al departament de Medicina de la UAB, tutoritzada per mi per optar al grau de doctor, representa una gran aportació al tema i reuneix mèrits suficients per ser presentada i defensada davant del tribunal corresponent.

I, perquè així consti als efectes oportuns, signo aquest certificat a Sabadell, 14 de gener de 2019.

Dr. Christian Domingo i Ribas



Departament de Medicina

Eduard Monsó i Molas, Professor associat del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), de la Unitat Docent de Parc Taulí,

CERTIFICA:

Que la Tesi Doctoral titulada “**Diagnòstic i estadificació del càncer de pulmó**”,

presentada per Mireia Serra Fortuny, inscrita al departament de Medicina de la UAB, dirigida per mí per optar al grau de doctor, representa una gran aportació al tema i reuneix mèrits suficients per ser presentada i defensada davant del tribunal corresponent.

I, perquè així consti als efectes oportuns, signo aquest certificat a Sabadell, 14 de gener de 2019.

Dr. Eduard Monsó i Molas

*“Quan desitges aferrissadament una cosa,
tot l'Univers conspira per ajudar-te a assolir-la”*

Paulo Coelho

AGRAÏMENTS

Primer de tot voldria agrair al meu director Dr Eduard Monsó que m'ha ajudat de manera incondicional a tirar endavant amb aquesta tesi amb molta paciència i dedicació, sense ell no hagués estat possible. Moltes gràcies al meu tutor, Dr Christian Domingo pels seus consells i ajuda incondicional que en tot moment han estat una peça important.

Moltes gràcies a la Dra Laura Millares i Dr José Sanz per la vostra ajuda. Gràcies a tots els pneumòlegs que han participat en els estudis multicèntrics que han permès realitzar els treballs de la tesi.

M'agradaria donar les gràcies a tota la família del Taulí, on vaig créixer com a pneumòloga i com a persona, gràcies pels anys de formació amb el gran equip que sou format per grans professionals i persones, i en especial al Dr Miguel Gallego per les tardes incansables i divertides de ciència durant el meu període de formació.

Gràcies també a tots els companys de l'Hospital Verge de la Cinta, i sobretot a la Dra Inma Salvador, per ser una companya immillorable i una gran persona. Treballar amb tu és simplement un luxe. Gràcies a la Dra Leticia Jaulent, un gran cardiòloga i amiga, amb ella formem un equip —"razón-pulmón" molt competent.

Moltes gràcies a tots els amics i amigues pel suport i consells que m'heu donat en tot moment, en especial a la Irene, Marta, Rosa i Alicia.

Finalment, gràcies als meus pares, Rosa i Jose per estar sempre al peu del canó i creure en mi en cada passa que faig. Gràcies al meu germà Marc, per ser un reflex

d'entusiasme i dedicació. Gràcies a la meva àvia Rosó, a tu va dedicada la tesi, simplement per ser una gran persona amb vitalitat i alegria que transmet als del voltant. I gràcies al meu company de viatge, gràcies David per tots els moments viscuts i per fer-me dibuixar un somriure cada dia.

ABREVIATURES

PET: *Positron emission tomography*

SUVmax: *Maximum standard uptake value*

EBUS-TBNA: *Endobronchial ultrasonography with transbronchial needle aspiration*

CP: Càncer de pulmó

MPOC: Malaltia pulmonar obstructiva crònica

CPCP: Càncer de pulmó cèl·lula petita

CPNCP: Càncer de pulmó no cèl·lula petita

HAA: Hiperplàsia adenomatoïdea atípica

AIS: Adenocarcinoma in situ

AMI: Adenocarcinoma mínimament invasiu

IASLC: *International Association for the Study of Lung Cancer*

ATS: *American Thoracic Society*

ERS: *European Respiratory Society*

ACCP: *American College of Chest Physicians*

TAC: Tomografia axial computeritzada

FDG: *2-fluoro-2-desoxi-D-glucose*

EUS-NA: *Endoscopic ultrasound-guided needle aspiration*

VAMLA: *Video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy*

TEMLA: *Transcervical extended mediastinal lymphadenectomy*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

KRAS: *V-ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogen homolog*

DNMTs: DNA metiltransferases

RASSF1a: *Ras association domain-containing protein 1*

APC: *Adenomatous polyposis coli*

EML4-ALK: *Echinoderm microtubule-associated proteinlike 4*

c-MET: *Tyrosine-protein kinase Met*

Her-2/neu: *Human epidermal growth factor receptor 2*

TKI: *Tyrosin quinase inhibitor*

ALK: *Anaplastic Lymphoma kinase*

ÍNDEX	Pàg.
RESUM	17
SUMMMARY.....	19
1. INTRODUCCIÓ.....	21
1.1 Epidemiologia.....	23
1.2 Etiologia.....	23
1.3 Classificació histològica del càncer de pulmó.....	24
1.3.1 Tumors neuroendocrins.....	25
1.3.1.1 Carcinoma de pulmó cèl·lula petita (CPCP).....	25
1.3.2 Càncer de pulmó no cèl·lula petita (CPNCP).....	25
1.3.2.1 Adenocarcinoma pulmonar.....	26
1.3.2.2 Carcinoma escatós.....	28
1.3.2.3 Carcinoma cèl·lula gran.....	28
1.4 Classificació TNM.....	29
1.5 Estadificació mediastínica.....	32
1.5.1 Tècniques d'imatge.....	33
1.5.1.1 Tomografia axial computeritzada (TAC) de tòrax.....	33
1.5.1.2 La tomografia per emissió de positrons (PET).....	33
1.5.1.3 La PET-TAC.....	36
1.5.2 Tècniques semiinvasives.....	36
1.5.2.1 Ecobroncoscòpia amb punció transbronquial (EBUS-TBNA).....	38

1.5.2.1.1 EBUS radial.....	38
1.5.2.1.2 EBUS lineal.....	39
1.5.2.2 Ultrasonografia endoscòpica digestiva amb punció aspirativa amb agulla fina (EUS-NA).....	42
1.5.3 Tècniques invasives.....	44
1.6 Marcadors moleculars.....	45
1.6.1 Alteracions genètiques.....	45
1.6.2 Alteracions epigenètiques.....	45
1.7 Estudis moleculars.....	46
2. HIPÒTESI.....	49
3. OBJECTIUS.....	53
4. PUBLICACIONS.....	57
4.1 Primer estudi. <i>“Predictors de malignitat mediastínica a PET en càncer de pulmó”</i>	61
4.2 Segon estudi. <i>“Determinants de resultats falsos negatius en el CPNCP estadificat per EBUS-TBNA”</i>	73
4.3 Tercer estudi. <i>“Estat de metilació mitjançant EBUS-TBNA dels ganglis locorregionals”</i>	83
5. DISCUSSIÓ.....	95
5.1 Predictors de malignitat mediastínica a PET en càncer de pulmó.....	97
5.2 Determinants de resultats falsos negatius en el CPNCP	

estadificat per EBUS-TBNA.....	100
5.3 Estat de metilació mitjançant EBUS-TBNA dels ganglis	
locorreionals.....	102
6. CONCLUSIONS.....	105
7. LÍNIES DE FUTUR.....	109
8. BIBLIOGRAFIA.....	113

RESUM

El càncer de pulmó és la neoplàsia més prevalent i la primera causa de mort a nivell mundial per càncer. És molt important poder fer un diagnòstic precoç i una minuciosa estadificació per conèixer l'extensió de la malaltia. Quan la malaltia està confinada al tòrax, l'abordatge dels ganglis mediastítics és de crucial importància i de gran dificultat.

Aquesta tesi doctoral avalua la informació obtinguda de tècniques no invasives i semiinvasives en l'estadificació mediastínica en el càncer de pulmó.

En el primer treball s'avalua el punt de tall del SUVmax en la PET que permet sospitar disseminació mediastínica previ a l'estadificació histològica i valora altres marcadors no influenciats per la variabilitat entre centres. També s'analitza si aquests paràmetres de la PET ens permeten millorar la selecció de tècniques pel mostreig posterior. L'estudi permet determinar que un punt de tall de 4 en el SUVmax dels ganglis mediastítics és predictor de malignitat (OR 10.68, 95% IC 2.98-14.69), sent la precisió diagnòstica i el VPN > 70%. A més, un valor del quocient SUVmax dels ganglis mediastítics/SUVmax del tumor > 0.4, és un bon predictor de malignitat en els ganglis del mediastí (OR 6.62, 95%IC 2.98-14.69) permetent homogeneïtzar els resultats entre centres. La sensibilitat i el VPN de l'EBUS-TBNA van ser inferiors al 90%, independentment del resultat de la PET. Per tant, si el resultat de l'EBUS-TBNA és negatiu (a excepció de tumors < 3cm) i el quocient SUVmax tumor/SUVmax mediastí < 0.4, cal realitzar tècniques complementàries.

En el segon treball s'avaluen els falsos negatius de l'EBUS-TBNA en l'estadificació del mediastí. L'estudi estableix que el 15% de falsos negatius de la tècnica disminueix fins al 3% quan el mostreig es realitza en tres estacions ganglionars. Per tant, el principal determinant per minimitzar resultats falsos negatius en els territoris accessibles per la tècnica és l'exhaustivitat en l'obtenció de la mostra en les tres estacions ganglionars. No obstant, en el cas dels territoris ganglionars no accessibles per EBUS-TBNA els falsos negatius estan relacionats amb la localització del tumor a pulmó esquerre, el que fa recomanable la utilització de tècniques complementàries per millorar el mostreig en els tumors del pulmó esquerre.

Finalment, en el tercer treball s'avalua la relació entre l'estat de metilació dels gens p16, DAPK, RASSF1a, APC i CDH13 en la mostra obtinguda dels ganglis per EBUS-TBNA i l'estadificació i el pronòstic de la malaltia. Es conclou que l'EBUS-TBNA proporciona mostres adequades per fer bloc cel·lular en més de la meitat dels pacients per l'estudi epigenètic. La metilació dels gens APC i p16 en pacients amb CPNCP està associat amb estadis avançats i en pitjor supervivència als sis mesos.

SUMMARY

Lung cancer is the world's most widespread neoplasm and the main cause of death from cancer worldwide. An accurate lymph node evaluation is mandatory in patients with lung cancer who do not present distant metastasis at their first examination.

This thesis is a compilation of three articles that investigate the contributions of noninvasive and semi-invasive techniques in the mediastinal stage of lung cancer. The first study evaluated the SUVmax value that proved to be a good predictor of mediastinal dissemination and identified other parameters which are not influenced by the variability between centers. In the multicenter study performed, a SUVmax in mediastinal lymph nodes above 4 showed an accuracy and a VPN greater than 70% in mediastinum staging (OR 10.68, 95% CI 2.98-14.69). A ratio SUVmax of mediastinum lymph nodes/SUV max of the tumour > 0.4 was also a good predictor for malignancy (OR 6.62, 95% CI 2.98-14.69). This factor allowed the homogenization of the results between centers. Regardless of PET's results, EBUS-TBNA sensitivity and EBUS-TBNA negative predictive value were below 90%. Consequently, if EBUS-TBNA's results are negative (except in tumor < 3 cm) and SUVmax mediastinum/SUVmax tumor < 0.4 , complementary techniques should be performed.

The second study focused on false negative results of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) in the staging of mediastinal lymph nodes. The study established that the 15% of false negative results of the technique were lowered to 3% when the sampling is obtained from the three lower tracheal mediastinal stations. Therefore, the main factor in minimizing false negative results in stations reachable by endobronchial was associated with the extensiveness of sampling these

three mediastinal stations. On the other hand, in case of involvement of non-accessible stations to EBUS-NA, the foremost determinant of a false negative result was the location of the main tumor in the left lung.

Finally, the third study evaluates the relationship between methylation status of p16, DAPK, RASSF1a, APC and CDH13 genes in lymph nodes sampled by EBUS-TBNA, tumor staging and prognosis of the disease. EBUS-TBNA allowed to obtain cell blocks of the lymph nodes in more than 50% of the patients, to perform an epigenetic study. Methylation of p16 and APC genes in NSCLC patients was associated with advanced staging and lower six month survival.

INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Epidemiologia

El càncer de pulmó (CP) és la neoplàsia més freqüent a nivell mundial des del 1985 (1), i s'estima que hi van haver 1.8 milions de nous casos al 2013, el 58% en regions en vies de desenvolupament (2). La seva incidència ha augmentat a nivell mundial un 51% des del 1985 (44% en homes i 76% en dones) (1). És la primera causa de mortalitat per neoplàsia en tot el món (1.64 milions de morts anuals) (2). A nivell europeu, el CP va ser el quart en freqüència després del càncer de mama, el colonorectal i el de pròstata respectivament i el més mortífer amb 353.000 morts anuals durant el 2012 (3). En el nostre país, en el 2013 es van diagnosticar 26715 nous casos (4, 5).

La supervivència als cinc anys varia considerablement en funció de l'estadificació en el moment del diagnòstic: 52.2% per la malaltia localitzada, 25% en cas de malaltia regional i finalment 4% en cas de malaltia disseminada. Malauradament, només el 15% dels casos, en el moment del diagnòstic tindran malaltia localitzada.

1.2 Etiologia

L'etiologia del CP depèn de dos factors: l'exposició a agents carcinògens i la susceptibilitat individual. El fum de tabac és el principal agent responsable i s'estima que es podria evitar fins a un 20% de la mortalitat de tots els càncers a nivell mundial si s'eliminés el seu consum (6).

El CP és el càncer més freqüentment associat a l'exposició ocupacional (7, 8). L'exposició al fum del tabac i l'asbest són factors de risc independents que en combinació provoquen una actuació sinèrgica augmentant el risc relatiu 59 vegades (9).

Els hidrocarburs policíclics aromàtics dels combustibles contribueixen a la contaminació de l'aire i es relacionen per aquesta via amb la carcinogènesi. A més, les dades obtingudes de l'American Cancer Society Prevention Study II apunten que per cada augment de $10\text{g}/\text{m}^3$ de concentració de partícules fines s'incrementa en un 14% el risc de desenvolupar CP (7).

Tot i que l'exposició al fum del tabac és l'agent causal més important per desenvolupar CP, menys del 20% de fumadors presentaran al llarg de la seva vida aquest càncer. Aquesta situació suggereix que probablement existeix una susceptibilitat genètica de cada individu. Sembla haver-hi també una certa agregació familiar. Una metaanàlisi de 41 estudis de casos i controls i de cohorts va demostrar que existeix una associació (OR 1.63 95% CI, 1.3-2.01) entre la història familiar i el CP, que augmenta de manera significativa el risc de desenvolupar la malaltia quan ha afectat prèviament a 2 o més familiars (OR 3.6; 95% CI, 1.7-3.8) (10).

1.3 Classificació histològica del càncer de pulmó

El CP es desenvolupa a partir de les cèl·lules epitelials respiratòries i clàssicament es divideix en dos tipus histològics ben diferenciats, el càncer de pulmó cèl·lula petita (CPCP) i el càncer de pulmó no cèl·lula petita (CPNCP), amb una prevalença del 20% i 80% respectivament.

En el 2015 la Organització Mundial de la Salut (OMS) modifica l'estadificació histològica del carcinoma de pulmó vigent, diferenciant entre CPNCP i carcinoma de pulmó d'origen neuroendocrí.

El carcinoma de pulmó d'origen neuroendocrí agrupa els subtipus carcinoide típic, carcinoide atípic, càncer de pulmó cèl·lula petita (CPCP) i carcinoma neuroendocrí de cèl·lula gran; i el CPNCP agrupa els subtipus adenocarcinoma, carcinoma escatós i carcinoma de cèl·lula gran (11).

1.3.1 Tumors neuroendocrins

Les cèl·lules neuroendocrines deriven de cèl·lules pluripotencials i es caracteritzen per produir neurotransmisors i no realitzar sinapsis. Els tumors neuroendocrins representen entre el 20 al 25% del CP compartint els mateixos trets morfològics i immunohistoquímics. Tenen en comú marcadors neuroendocrins com la cromogranina A, la sinaptofisina i el CD56. Cal destacar que donat que l'índex de proliferació cel·lular està relacionat amb el pronòstic, els tumors neuroendocrins es diferencien en tres grups, els tumors neuroendocrins de baix grau, que inclouen el carcinoide típic i tenen millor pronòstic, els de grau mig amb el carcinoide atípic i finalment amb els d'alt grau que inclouen al CPCP i el carcinoma neuroendocrí de cèl·lula gran, amb pitjor supervivència.

1.3.1.1 Carcinoma de pulmó cèl·lula petita (CPCP)

En sèries recents el CPCP ha suposat una mica més del 10% del total dels CP (12). Més del 95% dels casos estan associat al tabaquisme. Destaca pel seu ràpid creixement i la seva afectació més central. Presenta bona resposta tant a la quimioteràpia com la radioteràpia, però desenvolupa ràpidament resistència al tractament, presentant una supervivència als 2 anys de menys del 10% en pacients amb malaltia disseminada (11).

El CPCP histològicament presenta cèl·lules petites (aproximadament dos vegades el tamany d'un limfòcit) amb escàs citoplasma i nuclèol absent. Presenta una alta taxa de mitosi, d'apoptosi i d'important necrosi. Els marcadors immunohistoquímics poden ajudar a fer el diagnòstic, sent positius per sinaptofisina, cromogranina A i CD56. A diferència dels tumors carcinoides, presenta un l'alt índex de ki-67, del voltant de 70-100% (13, 14).

1.3.2 Càncer de pulmó no cèl·lula petita (CPNCP)

Aquest tipus histològic representa el 80% del CP. Els CPNCP es classifiquen histològicament en adenocarcinoma, carcinoma escatós i carcinoma de cèl·lules grans. En els últims anys la subclassificació histològica i les tècniques immunohistoquímiques del CPNCP han esdevingut indispensable pel tractament amb dianes terapèutiques.

1.3.2.1 Adenocarcinoma pulmonar

És el tipus histològic més freqüent sent més del 50% del CPNCP. Està constituït per cèl·lules grans amb citoplasma abundant. Forma estructures glandulars sovint amb material mucinós. Pot existir en un mateix tumor més d'un patró morfològic. Els seus marcadors immunohistoquímics són TTF1 i la Napsina-A amb un sensibilitat superior al 80%.

Degut a la seva heterogeneïtat en els patrons histològics es poden diferenciar diferents subtipus de lesions (Taula 1). En la nova classificació del 2012 es contemplen les lesions preinvasives, diferenciant-se la hiperplàsia adenomatoïda atípica (HAA) amb tamany menor de 0,5 cm i l'adenocarcinoma in situ (AIS) amb un tamany menor de 3

cm, creixement purament lepidic i sense invasió de l'estroma. L'AIS es subclassifica en no mucinós, mucinós i mixte.

L'adenocarcinoma mínimament invasiu (AMI) és un tumor amb patró predominantment lepidic amb un tamany de ≤ 3 cm i amb invasió de menys de 5 mm de l'estroma miofibroblàstic. No presenta invasió limfàtica, vascular ni pleural ni conté necrosi tumoral. El tumor presenta una supervivència als cinc anys al voltant del 100% després del tractament.

L'adenocarcinoma pulmonar invasiu (> 5 mm d'invasió) representa al voltant del 70-90% dels casos en que es realitza ressecció quirúrgica (Taula 1). Habitualment els tumors tenen una morfologia mixta i es classifiquen segons el subtipus morfològic predominant, sent el més prevalent i el de millor pronòstic el que presenta patró lepidic (15).

Table 1 Recommended nomenclature for reporting pulmonary adenocarcinoma and related lesions in surgical resection specimens and the equivalent nomenclature for use in small diagnostic samples

Adenocarcinoma diagnosis nomenclature in surgical resection specimens	Adenocarcinoma diagnosis nomenclature in small samples (biopsy and cytology)
Atypical adenomatous hyperplasia (AAH)	'Atypical bronchioloalveolar proliferation'. AAH diagnosis not possible in small samples
Adenocarcinoma in situ (AIS)	'Lepidic pattern adenocarcinoma' on biopsy. In situ disease can be neither confirmed nor assumed
Minimally invasive adenocarcinoma (MIA)	'Adenocarcinoma'. MIA not possible in small samples Depending on sample, lepidic or other patterns may be seen (see below)
Invasive Adenocarcinoma	'Adenocarcinoma'. Depending on sample, pattern may be seen, but the reliability of this observation is unknown.
Lepidic predominant	
Acinar predominant	
Papillary predominant	
Micropapillary predominant	
Solid (with mucin) predominant	'Non-small-cell carcinoma, probably adenocarcinoma' (after predictive IHC) Some cases will remain 'NSCLC-NOS' if IHC is not predictive
Adenocarcinoma variants	'Adenocarcinoma'
Invasive mucinous*	Variant histology may be seen and pattern described in small samples, but reliability unknown.
Colloid pattern	
Enterict	
Foetal (low and high grade)	Be aware of possible extrapulmonary metastases mimicking these

Signet-ring cell and clear cell features no longer indicate variants. They are simply cellular changes, not unique to adenocarcinoma, worthy of mention in the report. The possibility of metastatic disease should be considered. Signet-ring cells raise possibility of ALK gene rearrangement.
* Formerly known as mucinous BAC, these lesions are nearly always multifocal, with distinct radiological features mimicking pneumonia.
† A rare tumour with an IHC phenotype identical to colorectal carcinoma. Clinicopathological correlation is required for diagnosis.
BAC, bronchioloalveolar carcinoma; IHC, immunohistochemistry; NSCLC, non-small-cell lung carcinomas.

Taula 1. Nova classificació de l'Adenocarcinoma pulmonar (15)

Les guies IASLC/ATS/ERS recomanen en l'adenocarcinoma integrar la informació molecular per completar el diagnòstic i per tal de valorar tractament dirigit. En uns dos terços de casos s'objectiva alguna alteració molecular en el tumor, i és molt important reconèixer biomarcadors que permetin seleccionar el tractament en els subgrups de pacients amb adenocarcinoma (15).

1.3.2.2 Carcinoma escatós

El carcinoma escatós o epidermoide és el segon en freqüència després del adenocarcinoma, sent el 30-40% del CPNCP (16). Morfològicament consisteix en cèl·lules grans amb citoplasma abundant i nucli hiper Cromàtic. N'existeixen tres variants: queratinitzants, no queratinitzants i basaloides. En el cas de les formes no queratinitzants o poc diferenciades és molt important la immunohistoquímica a fi de diferenciar-les de l'adenocarcinoma. El carcinoma escatós presenta positivitat per p40, sent el marcador més específic i sensible, que s'identifica al voltant del 100%. També són positius en aquest subtipus altres anticossos com p63 (sensibilitat 92-99% i especificitat 74-96%) i citoqueratina 5/6 (11).

1.3.2.3 Carcinoma cèl·lula gran

Representa un 2% dels CPNCP. Presenta cèl·lules de mida gran amb morfologia, arquitectura i immunohistoquímica no compatible amb carcinoma cèl·lula petita, escatós o adenocarcinoma (11).

1.4 Classificació TNM

El sistema d'estadificació anatòmica més utilitzat és el TNM. Aquest sistema fa referència a l'extensió anatòmica del tumor primari (T) que ve determinat pel seu tamany, localització i per les estructures anatòmiques que invaeix; l'afectació dels ganglis limfàtics regionals (N) i la presència de disseminació a distància del tumor primari o metàstasi (M). El TNM no inclou informació molecular del tumor. D'aquesta manera se'n determinen diferents estadis (estadi I fins estadi IV).

El sistema TNM combina les característiques de cada tumor per assignar-hi una estadificació que es correlaciona amb la supervivència i està vinculada a les recomanacions per al tractament. L'objectiu d'aquest mètode d'estadificació és aportar informació descriptiva de l'extensió neoplàsica facilitant la presa de decisions en el tractament i una guia pel pronòstic de la malaltia.

Fins 2016 es va utilitzar la 7a edició del TNM creada per la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) (17) però actualment ja se'n ha creat una nova versió, concretada en la 8a edició (18). Els estudis realitzats en aquesta Tesi Doctoral s'han realitzat tenint en compte la setena edició que era la que estava vigent en el moment de realitzar el treball (Taules 2 i 3).

Per tal de crear la 8a edició del sistema s'ha desenvolupat una base de dades amb aproximadament 95000 pacients amb CP que han estat diagnosticats i tractats en 16 països diferents.

En la nova edició s'emfatitza i es dóna molta importància a la mida del tumor ja que té un impacte pronòstic significatiu. Així doncs, el límit dels 3 cm de tamany tumoral

continua separant els tumors T1 de T2, però es distingeixen diverses categories compreses entre 1 cm i 5 cm segons la mida. Es subclassifica en T1a els tumors de < 1 cm, T1b en tumors amb tamany entre 1-2 cm i T1c en tumors entre 2 i 3 cm. Els T2 es subclassifiquen en T2a aquells compresos entre 3 i 4 cm i T2b els tumors entre 4 i 5 cm de tamany. No hi ha canvis respecte el T3 i T4 respecte l'edició anterior, sent T3 aquells tumors de > 5 cm i < 7 cm de mida i T4 el tumors superiors a 7 cm. Per altra banda, el pronòstic dels tumors classificats per la seva extensió enbronquial a menys de 2 cm de la carina, sense invasió de la carina, és similar a la dels tumors localitzats a més de 2 cm de carina i per tant, es reclassifiquen com a T2. Tampoc hi ha diferència de supervivència en tumors que provoquen una atelectàsia o pneumonitis total comparat amb la parcial, reclassificant-se també com a T2. Finalment, aquells tumors amb afectació diafragmàtica es reclassifiquen com a T4.

En quant a l'afectació ganglionar, no hi ha canvis descriptius però es recomana indicar si hi ha afectació només d'una estació o de múltiples estacions, ja que en aquest segon cas empitjora la supervivència.

Finalment, en quant a la malaltia disseminada, es diferencien en si l'afectació és intratoràctica (M1a), extratoràctica única (M1b) o múltiple (M1c) ja que en el cas de disseminació extratoràctica múltiple s'observen diferències significatives en el pronòstic (18).

T: Tumor primari	
Tx	
T0	No evidència de tumor primari
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm de diàmetre major sense evidència d'invasió del bronqui lobar
T1a	Tumor ≤ 2 cm de diàmetre major
T1b	Tumor > 2 cm però ≤ 3cm de diàmetre major
T2	Tumor > 3 cm però ≤ 7 cm de diàmetre major o tumor que presenti: afectació de bronquis principals sense afectar a carina (distant a ≥ 2cm carina), invasió a pleura visceral, presència d'atelectàsia/ pneumonitis distal extenent-se des de la regió hiliar i afectant parcialment el pulmó.
T2a	Tumor > 3 cm però ≤ 5 cm de diàmetre major
T2b	Tumor > 5cm però ≤ 7 cm de diàmetre major
T3	Tumor > 7 cm de diàmetre major Nòdul(s) tumoral(s) en el mateix lòbul que el tumor primari Tumor a bronqui principal sense afectar a carina (distant < 2 cm de carina) Invasió directa de qualsevol de les següents estructures: paret toràcica (incloent pleura parietal i tumors del sulcus superior), diafragma, nervi frènic, pericardi parietal. Presència d'atelectàsia/pneumonitis distal extenent-se des de la regió hiliar i afectant totalment el pulmó
T4	Nòdul(s) tumoral(s) separat del tumor primari en un lòbul diferent al pulmó homolateral Invasió d'alguna de les següents estructures: mediastí, cor, grans vasos, tràquea, nervi recurrent laringi, esòfag, cos vertebral i carina
N: Afectació ganglionar	
Nx	Ganglis limfàtics regionals que no es poden avaluar
N0	No metàstasi en ganglis regionals
N1	Metàstasi en ganglis ipsilaterals peribronquials i/o hiliars i gangli intrapulmonars, incloent afectació per extensió directa.
N2	Metàstasi mediastínicas ipsilaterals i/o subcarinals
N3	Metàstasi ganglionars contra laterals mediastínicas, hiliars contralaterals, escalèniques ipsilaterals o contralaterals o afectació supraclavicular.
M: Metàstasi a distància	
M0	No metàstasi
M1	Presència de metàstasi
M1a	Nòdul (s) en pulmó contra lateral, tumor amb nòdul (s) pleural o pericàrdic o vessament pleural o vessament pericàrdic
M1b	Metàstasi a distància

Taula 2. Classificació del TNM-estadis de la IASLC (7a edició). Descriptors TNM. (17)

Estadi	T	N	M
Carcinoma ocult	Tx	N0	M0
IA	T1a-T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T1a-T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1-T2	N2	M0
	T3	N1-N2	M0
	T4	N0-N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	Qualsevol T	N3	M0
IV	Qualsevol T	Qualsevol N	M1a-M1b

Taula 3. Classificació TNM-estadis de la IASLC (7a edició). Agrupació d'estadis. (17)

1.5 Estadificació mediastínica

Una estadificació ganglionar mediastínica precisa és de crucial importància en malaltia no disseminada ja que pot condicionar una opció quirúrgica curativa. Per a la seva realització disposem de tècniques d'imatge, proves semiinvasives i invasives.

L'American College of Chest Physicians (ACCP) estableix per troballes en la TAC, quatre grups a partir de la relació entre el tumor primari i l'afectació mediastínica (19).

El primer grup (grup A) presenta infiltració mediastínica envoltant vasos i bronquis sent impossible distingir entre el tumor i els ganglis afectats; en aquest cas la disseminació mediastínica s'accepta només amb les troballes en la TAC i al tractant-se d'estadi III només cal confirmació histològica de la malaltia sense ser necessari l'estadificació del mediastí. En el segon grup (grup B) es pot diferenciar entre tumor i ganglis sent sempre obligatori la confirmació histològica de l'afectació mediastínica.

Els grups C i D tenen ganglis mediastítics de tamany normal en la TAC. En el grup C els pacients presenten tumor central (tumor en el terç proximal del hemitòrax) o sospita de N1, sent la probabilitat d'infiltració N2/N3 relativament alta (20-30%), i per tant la confirmació histològica és imprescindible. Finalment els pacients del grup D presenten tumor perifèric (tumor en els dos terços externs del hemitòrax) i no caldrà fer més estudis per valorar el mediastí perquè la probabilitat de malaltia a distància o invasió mediastínica és baixa (19).

La guia de l'European Society of Thoracic Surgeons recomana realitzar també l'estudi invasiu del mediastí en aquells pacients amb tumor primari > 3 cm tot i una prova

d'imatge amb el mediastí normal (TAC i PET o PET-TAC) donada la alta probabilitat de N2 oculta (20).

1.5.1. Tècniques d'imatge

1.5.1.1 Tomografia axial computeritzada (TAC) de tòrax

La TAC de tòrax amb contrast que inclou talls d'abdomen superior és la primera prova a realitzar quan hi ha sospita de CP per valorar el mediastí ja que permet avaluar la mida i la localització dels ganglis mediastínic. Tot i que no es disposa d'un consens ferm, es determina que els ganglis són patològics quan el seu diàmetre menor és ≥ 1 cm (19). La sensibilitat, especificitat i el valor predictiu positiu (VPP) de la TAC en la identificació d'adenopaties mediastíniques metastàsiques en estudis amb prevalença de malaltia mediastínica del 30%, va ser del 55%, 81% i 58% respectivament (19).

1.5.1.2 La tomografia per emissió de positrons (PET)

La PET és una prova d'imatge que es basa en detectar i analitzar la distribució que adopta a l'interior del cos un radiofàrmac marcat que emet positrons, en el nostre cas un anàleg de la glucosa, la 2-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG). Ens permet detectar l'activitat metabòlica de les cèl·lules neoplàsiques que mostren una alta captació i un augment de glicòlisis comparades amb les cèl·lules sanes del teixit circumdant.

En la interpretació de la prova es realitza, per una banda una valoració subjectiva mitjançant una anàlisi visual considerant-se patològica tota captació del FDG que no es correspongui amb una captació fisiològica del radiofàrmac, en relació amb les estructures de referència com el mediastí i la regió homòloga contralateral. Per altra banda, es fa una valoració semiquantitativa determinant el valor estandarditzat de

captació màxima (SUVmax) que es defineix pel quocient entre la concentració del FDG en el tumor i la dosis injectada dividit pel pes corporal.

El SUVmax es pot veure alterat per diferents factors independentment del metabolisme intrínsec del tumor que fan que la seva reproductibilitat sigui variable. Alguns factors que l'afecten són entre altres les diferents cases comercials de l'aparell, l'interval de temps entre la injecció del radiofàrmac i la realització de la prova d'imatge, i els nivells de glucosa en plasma que competeixen amb el FDG en la captació de les cèl·lules neoplàsiques. Els nivells d'insulina, el pes corporal del pacient i el moviment del pacient també influeixen en el valor, i tenen també una rellevància important els algoritmes de reconstrucció radiològica i les variables d'atenuació utilitzades (21).

S'han realitzat diferents estudis per establir el poder predictiu del SUVmax per identificar disseminació de la malaltia als ganglis limfàtics del mediastí, establint-se diferents punts de tall compresos entre 2.5 a 5.3 (22-24). Cal puntualitzar que existeix una variabilitat entre diferents centres en aquesta determinació que oscil·la entre 10 i el 15% (25). Cerfolio i col·laboradors al 2007 per tal de poder millorar la reproductibilitat i homogeneïtzar els resultats obtinguts van proposar la utilització de la ratio entre el SUVmax del mediastí i el del tumor (26). En el seu estudi multicèntric van incloure 339 pacients que en la PET mostraven SUVmax del tumor primari i dels ganglis del mediastí (N2) superior a 2.5. Es van biopsiar mitjançant mediastinoscòpia i ecocobroncoscòpia transesofàgica per aspiració d'agulla fina (EUS-NA) els ganglis patològics per PET previ a la dissecció ganglionar. Es va concloure que quan la ratio era igual o superior a 0.56 hi havia un 94% de probabilitats de que fos maligne amb una sensibilitat del 94% i especificitat del 72% respectivament.

Posteriorment, s'han realitzat altres estudis amb resultats similars reforçant la utilització de la ratio com a predictor de disseminació mediastínica (27-29).

La PET és superior a la TAC en precisió diagnòstica en l'estadificació del mediastí amb una sensibilitat i especificitat de 84% i 89% respectivament (30). La sensibilitat disminueix en ganglis amb diàmetre menor comprés entre 7 i 10 mm.

La PET presenta un valor predictiu positiu (VPP) del 75%, ja que mesura activitat metabòlica dels teixits, i presenta falsos positius en altres lesions actives metabòlicament com a les malalties infeccioses o inflamatòries, sent obligada una prova semiinvasiva o invasiva que confirmi el diagnòstic (29).

La tècnica no està exempta de falsos negatius en l'estadificació mediastínica, que oscil·len entre el 15-30% en aquells casos amb alta sospita clínica (estadi III) però, disminueix fins al 5% en aquells tumors amb baixa sospita clínica (estadi I-II) (31).

En el cas de PET negatiu, només es recomana confirmació histològica prèvia la cirurgia en cas els següents casos: quan la TAC mostri ganglis mediastínics augmentats de tamany, en tumors centrals (en especial menció si contacta amb mediastí), en tumors amb baixa activitat metabòlica en la PET, en sospita de N1 i en aquells tumors de > 3 cm de tamany (32).

La limitació més important en la PET és la poca informació anatòmica que ofereix, sent quasi impossible poder diferenciar les diferents estacions ganglionars amb aquesta tècnica (19).

1.5.1.3. La PET-TAC

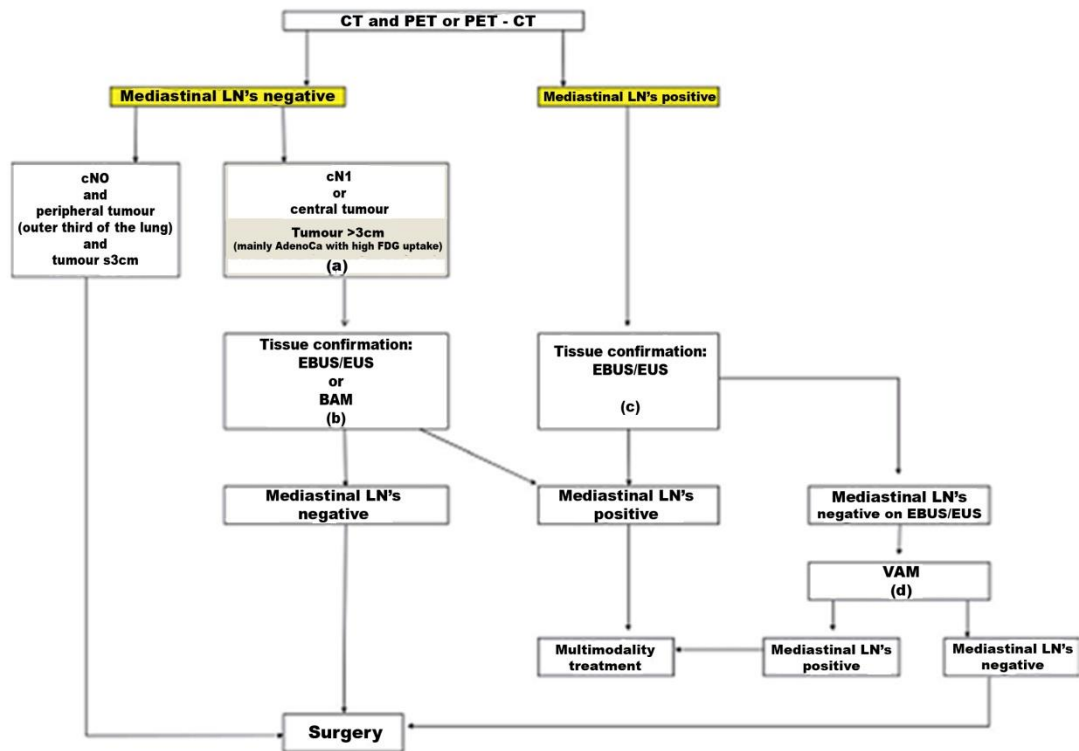
Al 2001 s'introdueix la PET-TAC que és una prova híbrida que permet combinar la informació anatòmica de la TAC juntament amb la informació metabòlica obtinguda de la PET, permetent un estudi més precís del mediastí. La tècnica és superior a la realització de la PET o la TAC per separat amb una sensibilitat i especificitat per N2 del 80-90% i 84-95% respectivament (20).

Al 2014 es va realitzar una revisió Cochrane per valorar la precisió de la tècnica per N2/N3. Es van incloure 45 estudis destacant una sensibilitat i especificitat al voltant del 80% però amb molta heterogeneïtat en resultats, el que feia que la precisió diagnòstica fos baixa (33). Per tant, d'acord amb les guies actuals, si el resultat és positiu cal fer proves invasives per confirmar l'afectació mediastínica. En el cas que sigui negatiu, la prova presenta un elevat valor predictiu negatiu (VPN) per descartar disseminació mediastínica en tumors perifèrics.

1.5.2 Tècniques semiinvasives

Les guies actuals recomanen confirmació histològica dels ganglis del mediastí encara que la PET-TAC sigui normal en el cas de que el tumor sigui central, hi hagi sospita de malaltia hiliar (N1), en tumors de mida > 3 cm sobretot en adenocarcinomes que presentin una limitada captació de FDG, situacions en les que la proporció de falsos negatius es més elevada (Figura 2) (20).

Es considera que en la majoria de tumors perifèrics de < 3 cm sense augment de mida dels ganglis limfàtics (hiliar i/o mediastínic) a la TAC i amb PET-TAC o PET negatiu es pot ometre la confirmació histològica del mediastí (20, 34).



- (a) : In tumours > 3 cm (manly in adenocarcinoma with high FDG uptake) invasive staging should be considered
- (b) : Depending on local expertise to adhere to minimal requeriments for staging
- (c) : Endoscopic techniques are minimally invasive and are the first choice if local expertise with EBUS/EUS needle aspiration is available
- (d) : Due to its higher NPV, in case of PET positive or CT enlarged mediastinal LN's, videoassisted mediastinoscopy (VAM) with nodal dissection or biopsy remain indicated when endoscopic staging is negative. Nodal dissection has an increased accuracy over biopsy

Figura 2. Guia ESTS de l'estadificació mediastínica (20).

Inicialment s'indica la realització d'una ecobroncoscòpia amb punció-aspiració transbronquial (EBUS-TBNA) que es pot combinar amb l'ultrasonografia endoscòpica digestiva amb punció aspirativa amb agulla fina (EUS-NA).

Ambdues tècniques redueixen toracotomies innecessàries i tenen una elevada sensibilitat (20, 32, 35). Cal destacar que són més cost-efectives i presenten menys complicacions que les tècniques invasives.

En el cas de negativitat en les proves semiinvasives es recomana realitzar mediastinoscòpia, ja que ambdues tenen una proporció de falsos negatius propera al 13-

15% (20). Cada una de les tècniques esmentades permet accedir a diferents territoris ganglionars, el que fa que en bona mesura siguin tècniques complementàries.

1.5.2.1 Ecobroncoscòpia amb punció-aspiració transbronquial (EBUS-TBNA)

Existeixen dos tipus d'ecobroncoscopis disponibles depenent del tipus de transductor utilitzat: L'EBUS lineal que permet orientar la punció guiada en temps real i l'EBUS radial que requereix retirar la sonda de visió prèviament a la biòpsia i per tant, no es dirigeix amb visió ultrasonogràfica directe el trajecte de l'agulla.

1.5.2.1.1 EBUS radial

L'EBUS radial data de principis dels anys noranta. Disposa d'una sonda radial que s'introdueix pel canal de treball del broncoscopi convencional i conté en la seva part distal un transductor d'ultrasons rotatori que emet freqüències de 12 a 20 MHz. La imatge ecogràfica obtinguda és circular en 360° i perpendicular a l'eix del broncoscopi. Aquesta tècnica permet visualitzar estructures de la paret traqueobronquial amb les seves capes i també ganglis mediastínic.

L'EBUS-TBNA radial proporciona informació de gran resolució que permet diferenciar entre compressió i invasió tumoral de la paret bronquial, identifica la profunditat de l'afectació del tumor i ajuda en la localització i diagnòstic de les lesions pulmonars perifèriques de petit tamany.

La sonda radial s'introdueix a través del broncoscopi, i un cop està localitzada la lesió, es retira la sonda deixant el catèter i es pot introduir l'agulla per la presa de mostres. Així doncs, no es pot fer un seguiment a temps real del mostreig.

1.5.2.1.2. EBUS lineal

Al 2002 es crea l'EBUS-TBNA lineal que integra en l'extrem distal del fibroncoscopi un transductor que emet ultrasons en paral·lel a una freqüència de 7.5 mHz o similar, permetent un camp visual sectorial de 50° a 90°. D'aquesta manera s'obté una major penetració en els teixits adjacents però menor poder de definició que l'EBUS radial.

Les imatges es poden obtenir directament amb la sonda o es disposa d'un globus a la punta del broncoscopi que un cop inflat amb sèrum fisiològic ajuda a millorar la imatge ecogràfica en suprimir la interfaç aèria entre el transductor i la superfície bronquial, quan aquesta existeix.

La imatge ecogràfica ajuda a determinar com és l'estructura a estudi en quant a dimensions, contingut i forma. Així mateix, incorpora un flux Doppler color que permet diferenciar les estructures vasculars.

La prova es realitza sota sedació o anestèsia convencional. El broncoscopi té una canal de treball de 2 mm per on s'inserta una agulla específica habitualment de 22G ecogènica. Un cop la punta està insertada i fixada, es crea succió per pressió negativa amb una xeringa al extrem proximal de l'agulla i es realitzen unes maniobres d'avançament i retrocés. Finalment es retira la succió i s'allibera l'agulla amb la mostra. Les complicacions derivades de la prova són poc freqüents i oscil·len entre el 0.03 al 1.79%, sent la principal complicació l'hemorràgia (0.73%) que s'autolimita la major part dels casos. També està descrit el pneumotòrax i el pneumomediastí, infecció, broncoespasme i laringoespasme (36).

L'EBUS-TBNA lineal permet avaluar adenopaties mediastíniques i hiliars, concretament en estacions ganglionars paratraqueals altes i baixes (4R/4L, 2R/2L, 3p), amb l'estació subcarinal (7), i hiliars (10R/10L, 11R/11L) (Figura 3 i Taula 4). La tècnica no té accessibilitat als territoris ganglionars aòrtics (5, 6), paraesofàgic (8) ni del lligament pulmonar (9). És la primera tècnica d'elecció per mostreig del mediastí. Diversos metaanàlisis han demostrat una excel·lent sensibilitat i especificitat de la tècnica, de 0.88-0.93 (95% IC, 0.79-0.94) i 1.00 (95% IC, 0.92-1.00) respectivament amb un VPN del 91% (rang, 83-96%). L'EBUS-TBNA, per tant, redueix la necessitat de la mediastinoscòpia en l'estadiatge mediastínic en el CP (34).

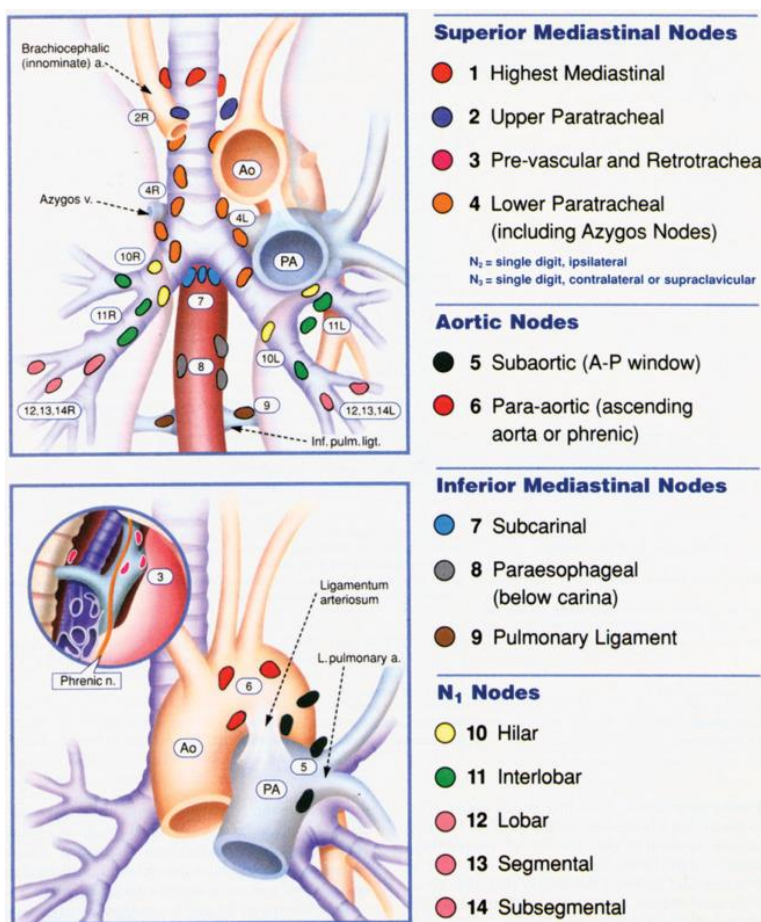


Figura 3. Mapa ganglionar pulmonar proposat per Mountain and Dresler (37)

Modalitat	Sensibilitat ^a	Estació mediastí superior (2, 4, 7)	Estació mediastí inferior (8, 9)	Estació mediastí AP (5, 6)	Estació hilar (10)	Estació interlobar (11)
EBUS	89	+	-	-	+	+
EUS	89	+	+	±	-	-
MED	81	+	-	+ ^b	±	-
VAM	89	+	-	+ ^b	±	-
EBUS+ EUS	91	+	+	±	+	+
EBUS + EUS+ MED	94	+	+	±	+	+
VATS	99	+	+	+	+	+

EBUS= Ecobroncoscop amb punció-aspiració transbronquial EUS= Ultrasonografia endoscòpica digestiva amb punció aspirativa amb agulla, MED=Mediastinoscòpia. AP= aortopulmonar; VAM= mediastinoscòpia videoassistida; VATS= cirurgia toràctica videoassistida ^aSensibilitat general no és específic per territoris ganglionars ^bNomés accessible per mediastinoscòpia cervical extensa, no per mediastinoscòpia tradicional

Taula 4. Proves diagnòstiques invasives i semiinvasives (32)

Tots els estudis han demostrat superioritat de l'EBUS-TBNA lineal sobre l'aspiració transbronquial convencional amb agulla cega presentant una major sensibilitat, especificitat i seguretat del procediment donat que es pot visualitzar i avaluar en tot moment l'estructura que es vol mostrejar, i efectuar-ne la seva punció a temps real.

L'avaluació del mediastí ha de ser minuciosa i sistemàtica de tot el territori ganglionar mediastínic (estacions 2, 4, 7) i hilar (10, 11). Es recomana punccionar els ganglis amb diàmetre menor superior a 5 mm independentment de les característiques ecogràfiques (38). És necessari iniciar les puncions en la localització ganglionar que impliqui un estadi més avançat, és a dir, les estacions contralaterals (N3) seguit de N2 i finalment N1, per tal d'evitar la contaminació de les estacions que implicarien un estadi més avançat si es mostregen després d'una estació positiva més propera al tumor.

Es recomana fer tres puncions de cada gangli que s'explori, i si es realitza estudi molecular se'n recomanen quatre. Si es disposa de citopatòleg en la sala que permeti

una avaluació citològica immediata (ROSE; en anglès *rapid on-site examination*) no es requeriran puncions addicionals si es demostra la presència de cèl·lules malignes (39).

La citologia estàndard i el bloc cel·lular obtingut en aquesta tècnica poden ser utilitzats per diagnòstic anatomopatològic, però també per estudi immunohistoquímic i determinacions moleculars.

S'han realitzat tres estudis prospectius que comparen EBUS-TBNA realitzats en centres d'expertesa i mediastinoscòpia convencional demostrant que els resultats són equivalents o fins i tot, s'obtenen més bons resultats en l'EBUS-TBNA (40-42). En una recent metaanàlisi extensa que inclou 10 estudis més heterogenis els resultats divergeixen. En aquesta metaanàlisi la sensibilitat d'ambdues tècniques és equivalent, en el cas de l'EBUS-TBNA 0.84 i de la mediastinoscòpia 0.86. La mediastinoscòpia va associar-se a més complicacions i a un menor nombre de falsos negatius. Els falsos negatius es van atribuir a regions inaccessibles (estació 5 i 6) i a una presa d'un nombre insuficient de biòpsies en les zones accessibles (43). Per tant, els resultats dependran de l'experiència de cada centre i la prevalença de l'afectació mediastínica en la població estudiada.

Les guies actuals recomanen realitzar la mediastinoscòpia ja que continua sent el *gold-standard* en els casos en que l'EBUS-TBNA mostri resultats negatius.

1.5.2.2 Ultrasonografia endoscòpica digestiva amb punció aspirativa amb agulla fina (EUS-NA)

La ultrasonografia endoscòpica digestiva amb punció aspirativa amb agulla fina (EUS-NA) permet avaluar els territoris paratraqueal esquerre (4L), subcarinal (7), subaòrtic

(5) i també al mediastí inferior, on hi ha els ganglis en la zona paraesofàgica (8) i el lligament pulmonar (9) (aquests darrers no són accessibles per EBUS-TBNA ni mediastinoscòpia). Es pot abordar també amb aquesta tècnica la glàndula suprarenal esquerra (Figura 3, Taula 4). La tècnica té una sensibilitat del 89-92%, especificitat 100% i VPN 80% pel CP (34, 44, 45).

La combinació de EBUS-TBNA lineal amb EUS-NA augmenta la sensibilitat al 93-96% i la precisió al 97% en l' estadiació ja que pot accedir a la majoria de les estacions ganglionars exceptuant la prevascular (3) i la paraaòrtica (6) (20, 34, 44). En pacients amb afectació adenopàtica en les zones paraesofàgica, mediastínica posterior o inferior és de gran utilitzat realitzar EUS-NA ja que l'EBUS-TBNA lineal no hi té accés. (Figura 4) (46).

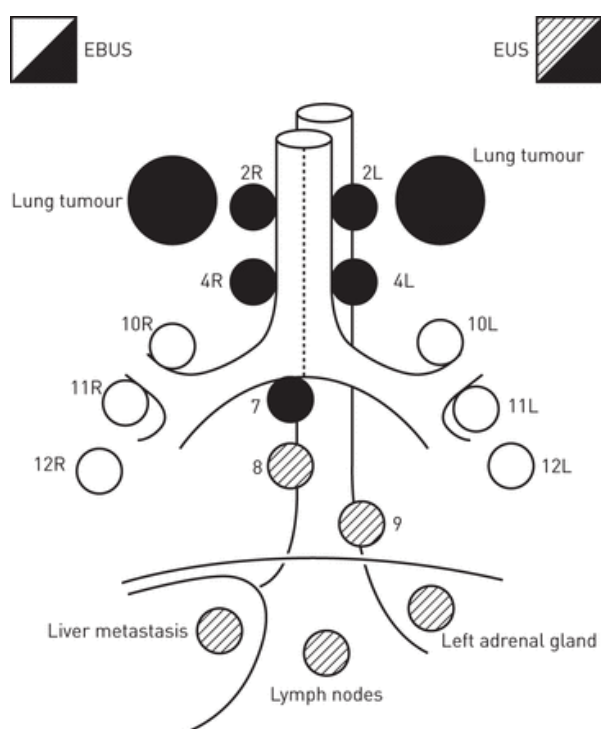


Figura 4. Mapa de regions ganglionars amb accessibilitat per EBUS-TBNA i EUS-NA (46).

Hwangbo i col·laboradors van avaluar en un estudi el paper de l'EUS-NA en aquells ganglis que no eren accessibles per EBUS-TBNA en 143 pacients. Van constatar que la combinació de les dues tècniques millorava la sensibilitat, el VPN i la precisió, fins el 91%, 96% i 97% respectivament (47).

Actualment, donat que els estudis realitzats han obtingut resultats heterogenis i no s'han realitzat estudis aleatoritzats, les guies actuals recomanen iniciar l'estudi del mediastí amb tècniques semiinvasives i si el resultat és negatiu, realitzar mediastinoscòpia per confirmació, com s'ha comentat prèviament (20).

1.5.3 Tècniques invasives

La mediastinoscòpia permet accés a les estacions ganglionars paratraqueals altes i baixes (2R/L, 4R/L), subcarinal anterior (7) i hiliars (10R/L). Hi han dos tipus de mediastinoscòpia, la mediastinoscòpia cervical estàndard i la mediastinoscòpia cervical extensa. Ambdues es realitzen sota anestèsia general. Es practica una cervicotomia transversa per on s'inserta el mediastinoscop que permetrà realitzar les biòpsies en les diferents estacions ganglionars.

Les noves guies estableixen que la mediastinoscòpia cervical estàndard és la tècnica d'elecció en cas de sospita de N2/N3 quan els resultats de les proves semiinvasives són negatius. Les taxes de morbiditat i mortalitat són baixes (0.08%-2%). En el procediment es requereix biopsiar sempre els territoris paratraqueals (4R/4L) i subcarinal (7). La sensibilitat oscil·la entre 72% i 89%, el VPN és de 91% i la precisió diagnòstica del 81% (19, 20, 36).

La mediastinoscòpia cervical extensa permet biopsiar, a més a més de les estacions descrites prèviament en la mediastinoscòpia cervical estàndard, les estacions ganglionars paraaòrtica i subaòrtica (5 i 6), mitjançant una incisió en el segon espai intercostal esquerre. La tècnica té especial indicació en tumors del lòbul superior esquerre que tenen un drenatge limfàtic a la finestra aortopulmonar, i sovint no tenen afectació a cap altre territori mediastínic. La sensibilitat oscil·la entre 75%-91% i el VPN entre 84%-91% però cal destacar que la tècnica suposa una complexitat afegida i es realitza en pocs centres (36).

Finalment la limfadenectomia per videomediastinoscòpia (VAMLA) i la limfadenectomia mediastínica transcervical extensa (TEMLA) són tècniques que permeten extirpar tots els ganglis limfàtics amb el seu teixit circumdant augmentant la precisió diagnòstica respecte la mediastinoscòpia. No obstant només es realitzen en centres especialitzats i tenen una taxa de complicacions més elevada (6-13%).

1.6 Marcadors moleculars

1.6.1 Alteracions genètiques

Múltiples mutacions somàtiques en oncogens, gens reparadors de DNA i gens supressors de tumors contribueixen en la transformació a cèl·lules cancerígenes, sent els més implicats en la carcinogènesis el EGFR, p53 i KRAS (48).

1.6.2 Alteracions epigenètiques

Les alteracions en l'epigenètica cel·lular són les modificacions que es produeixen en la cromatina que influeixen en l'expressió gènica sense alterar directament la seqüència del DNA. Existeixen tres processos epigenètics de regulació que són la metilació del

DNA, la regulació mediada per microRNA i les modificacions en les histones. Les alteracions en aquests processos de regulació poden afectar a oncogens i gens supressors.

La metilació del DNA es produeix a les zones promotores CpG en la regió 5' dels gens reguladors d'expressió. El procés està mediat per les DNA metiltransferases que mantenen la metilació i participen en a la replicació del DNA. La hipermetilació aberrant està relacionada amb la inactivació dels gens supressors de tumors i la hipometilació produeix inestabilitat en l'expressió genòmica. Les dues alteracions estan presents entre el 15-80% del casos de CP. Brock i col·laboradors van demostrar que la metilació de les regions promotores de quatre gens (TP16, CDH13, RASSF1A i APC) està relacionada amb la recurrència en pacients amb carcinoma no cèl·lula petita estadi I tractats quirúrgicament (49). Així en l'actualitat la metilació es considera marcador pronòstic, i s'està avaluant la seva utilitat com a diana terapèutica.

1.7 Estudis moleculars

Els marcadors predictius moleculars són mutacions impulsores que es poden utilitzar com indicadors de l'agressivitat del tumor i s'associen a la resposta a la quimioteràpia. Permeten seleccionar pacients que puguin respondre a un tractament biològic dirigit i han suposat un canvi del paradigma en el tractament del CP en estadis avançats.

En el cas de l'adenocarcinoma pulmonar es pot identificar una mutació en més del 60% del casos sent les més freqüents les de KRAS (35%), EGFR (15%) o una translocació dels gens EML4-ALK (5%). Estan descrites també mutacions en ROS1, cMET, BRAF i Her-2/neu (Figura 5). En l'actualitat les guies IASLC/ATS/ERS recomanen en aquest

tumor integrar la informació molecular per completar el diagnòstic i valorar el tractament dirigit (15).

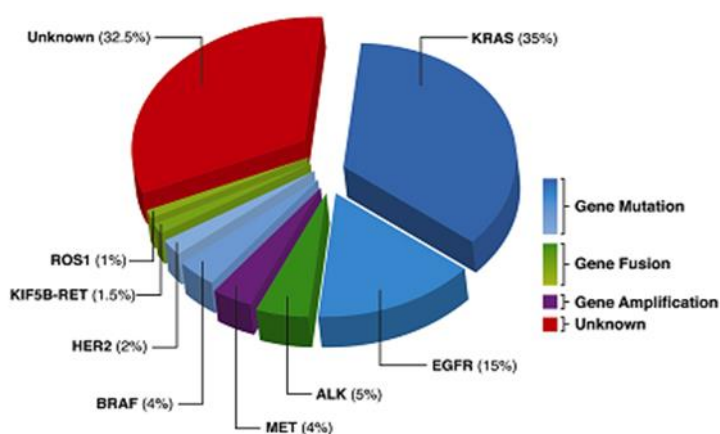


Figura 5. Alteracions genètiques moleculars en l'adenocarcinoma (15).

L'EGFR és una glucoproteïna transmembrana que conté un domini tirosina quinasa. Una mutació en el receptor de la proteïna dóna lloc a un augment de l'activitat del factor de creixement que conduirà a la síntesi de DNA i la proliferació cel·lular.

A l'administrar un inhibidor de la tirosin quinasa (TKI) aquesta activació s'interromp desencadenant apoptosi, sent un tractament diana efectiu. Aquesta mutació es presenta entre el 5-15% dels adenocarcinomes pulmonars. El tractament amb TKI produeix una resposta al voltant del 75 % dels casos (13).

L'ALK és també una proteïna transmembrana amb un receptor tirosina quinasa de la insulina. La fusió de l'ALK amb l'EML4, una proteïna citoplasmàtica involucrada en la formació de microtúbuls, produeix una inversió de la banda cromosòmica 2p23 originant activitat tirosina quinasa de manera permanent. Aquesta mutació s'identifica

entre el 4-7% dels casos de CP. Actualment hi ha inhibidors que utilitzen ALK com a diana terapèutica (13, 15).

Finalment, cal destacar que l'alteració genètica més freqüent en un 30% dels casos és l'activació de la via mediada per RAS, especialment a través de KRAS. KRAS codifica una proteïna implicada en la traducció de senyals regulant la proliferació cel·lular i la supervivència. Diversos estudis han demostrat que les mutacions en KRAS disminueixen la resposta dels TKI en pacients amb EGFR mutat. En l'actualitat no hi ha un tractament oncoespecífic enfront aquesta mutació, sent per tant, ara per ara, únicament un marcador de mal pronòstic.

HIPÒTESI

2. HIPÒTESI

Hipòtesi general

L'acurada estadificació del càncer de pulmó és bàsica per ajustar el tractament de manera adequada. Una avaluació més acurada de la informació que ens proporciona la PET, l'ús sistemàtic de l'EBUS-TBNA en la presa de mostres i finalment l'estudi epigenètic de les cèl·lules tumorals dels ganglis obtinguts mitjançant l'EBUS-TBNA pot millorar l'estadificació i per tant, comportar implicacions pronòstiques i predictives de resposta al tractament en la malaltia.

Les hipòtesis de cada treball son les següents:

1r treball

La utilització del SUVmax del mediastí obtingut per la PET fent servir punts de tall prèviament validats permet classificar amb precisió els pacients que presenten disseminació mediastínica en el càncer de pulmó. La variabilitat entre centres es pot minimitzar amb la utilització de paràmetres de la PET modificats amb aquest objectiu. Els resultats de la PET poden facilitar la selecció de procediments per l'estadificació posterior.

2n treball

L'estadificació sistemàtica per EBUS-TBNA en el càncer de pulmó minimitza la necessitat d'ampliar altres tècniques d'estadificació prequirúrgica. La localització del

tumor primari és un determinant en els falsos negatius de l'EBUS-TBNA en l'estadificació mediastínica del CP.

3r treball

La informació epigenètica en el càncer de pulmó es pot obtenir per EBUS-TBNA dels ganglis mediastínics afectats i té implicacions pronòstiques.

OBJECTIUS

3. OBJECTIUS

Objectiu general

Optimitzar la informació de les tècniques no invasives i semiinvasives en l'estadificació del càncer de pulmó.

Objectius específics

- 1.** Identificar en la PET predictors de malignitat mediastínica que permetin minimitzar la variabilitat entre centres i millorar la selecció de procediments per l'estadificació posterior.
- 2.** Identificar quins són els determinants dels falsos negatius de l'EBUS-TBNA relacionats amb el procediment i amb les característiques del tumor.
- 3.** Determinar la rendibilitat de l'EBUS-TBNA en la identificació de marcadors epigenètics en ganglis mediastínic malignitzats, i identificar-ne els relacionats amb pitjor supervivència en el CP.

PUBLICACIONES

4. PUBLICACIONS

A continuació es presenten els articles publicats que fonamenten la tesis doctoral:

Primer estudi

Serra M, Gallego M, Berna L, Montón C, Vigil L, Masdeu MJ, Fernández-Villar A, Botana M, Cordovilla R, García-Luján R, Cases E.

FDG-PET parameters predicting mediastinal malignancy in lung cancer

BMC Pulm Med. 2016; 16 (1): 177

Factor d'impacte: 2.43

Factor d'impacte acumulat de 5 anys: 2.61

Tercer quartil de l'especialitat

Segon estudi

Sanz-Santos J, Serra M, Gallego M, Montón C, Cosio B, Sauleda J, Fernández-Villar A, García-Luján R, de Miguel E, Cordovilla R, Varela G, Cases E, Andreo F, Monsó E.

Determinants of false-negative results in non-small-cell lung cancer staging by endobronchial ultrasound guided needle aspiration.

Eur J Cardiothorac Surg. 2015; 47 (4): 642-7

Factor d'impacte: 2.6

Factor d'impacte acumulat de 5 anys: 2.57

Segon quartil de l'especialita

Tercer estudi

Millares L, Serra M, Andreo F, Sanz-Santos J, Montón C, Grimau C, Gallego M, Setó L, Combalia N, Llatjós M, Escoda R, Castellà E, Monsó E.

Assessment of methylation status of locoregional lymph nodes in lung cancer using EBUS-NA.

Clin Exp Metastasis.2015; 32 (7): 637- 46

Factor impacte: 3.144

Factor d'impacte acumulat de 5 anys: 3.23

Segon quartil de l'especialitat

4.1. Primer estudi

“FDG-PET parameters predicting mediastinal malignancy in lung cancer”

Mireia Serra, Miguel Gallego, Luis Berna, Conchita Montón, Laura Vigil, Maria José Masdeu, Alberto Fernández-Villar, Maribel Botana, Rosa Cordovilla, Ricardo García-Luján, Enrique Cases.

FDG-PET parameters predicting mediastinal malignancy in lung cancer

Article publicat a BMC pulmonary medicine

BMC Pulm Med. 2016; 16 (1): 177

Antecedents. L'estadificació ganglionar mediastínica en el càncer de pulmó no cèl·lula petita (CPNCP) és decisiva per establir una correcta estadificació del tumor. El valor estandarditzat de la captació màxima (SUVmax) de la tomografia per emissió de positrons utilitzant la F-18 fluorodesoxiglucosa (FDG-PET) és una bona tècnica no invasiva per avaluar el mediastí, però els valors varien d'un centre a un altre. L'objectiu de l'estudi és identificar els predictors de malignitat mediastínica en la FDG-PET que permetin minimitzar la variabilitat entre centres i facilitar la selecció de tècniques de mostreig per l'estadificació posterior.

Mètode. Es va realitzar un estudi multicèntric incloent pacients amb CPNCP en que s'avaluà la disseminació mediastínica mitjançant una FDG-PET i una ecobroncoscòpia amb punció-aspiració transbronquial (EBUS-TBNA). En els casos en que l'EBUS-TBNA fou negatiu, es realitzà la dissecció ganglionar que és el *gold-standard*. S'avaluà la variabilitat entre centres i la capacitat predictiva dels diferents paràmetres de la FDG-PET amb capacitat d'identificar malaltia mediastínica. Finalment, s'analitzà la utilitat d'aquests en la selecció addicional de més proves de mostreig per l'estadificació del mediastí.

Resultats. Es van incloure 121 pacients amb CPNCP. La PET-FDG va mostrar captació hipermetabòlica en ≥ 1 estació mediastínica en 94 pacients (74%). La mitjana del SUVmax del tumor primari va ser 12.3 (DE 6.3) i la mediana del SUVmax de la captació més alta del mediastí va ser de 3.9 (Rang interquartil (2.4-7)). Els dos paràmetres descrits van mostrar variabilitat entre hospitals quan s'analitzaven com a valor absolut ($p=0.016$ i $p < 0.001$). Tanmateix, quan s'avaluava el SUVmax del mediastí expressat com a valor relatiu utilitzant una relació de divisió o de sostracció,

és a dir, SUVmax mediastí/SUVmax del tumor o SUVmax mediastí-SUVmax tumor, la variabilitat entre centres desapareix (SUVmax mediastí/SUVmax tumor, $p=0.083$; SUVmax mediastí-SUVmax tumor, $p=0.428$). El SUV max mediastí > 4 va ser predictor d'afectació mediastínica (OR 10.68, 95%IC 4.55-25.10) com també el SUVmax mediastí/SUVmax tumor > 0.4 (OR 6.62, 95%IC 2.98-14.69) amb una alta precisió diagnòstica confirmada a l'anàlisi ROC (AUC 0.77 IC 0.68-0.85, $p < 0.001$).

La sensibilitat i el VPN de l'EBUS-TBNA en l'obtenció de mostres per l'estudi del mediastí van ser inferiors al 90% tant en els pacients amb alta probabilitat de disseminació mediastínica com en els pacients en que aquesta probabilitat era baixa, segons el resultat del SUVmax.

Conclusions. El SUVmax mediastí i el quocient SUVmax mediastí/SUVmax tumor són bons predictors d'extensió tumoral en el CPNCP. El SUVmax mediastí/SUVmax no es veu influenciat per la variabilitat intercentres i té una precisió superior al 70% per la identificació de malignitat quan s'utilitza com a punt de tall el 0.4. La sensibilitat i el VPN de l'EBUS-TBNA varen ser inferiors al 90% independentment del resultat de la FDG-PET i per tant, cal realitzar altres tècniques complementàries quan el resultat és negatiu, a excepció de tumors de $< 3\text{cm}$ i SUVmax tumor/SUVmax mediastí < 0.4 en els que l'exploració del mediastí no aporta valor addicional.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

FDG-PET parameters predicting mediastinal malignancy in lung cancer



M. Serra Fortuny^{1,2*}, M. Gallego^{1,3}, Ll Berna¹, C. Montón^{1,4}, L. Vigil^{1,3}, M. J. Masdeu¹, A. Fernández-Villar⁵, M. I. Botana⁵, R. Cordovilla⁶, R. García-Luján^{3,7}, E. Cases⁸ and E. Monso^{1,2,3}

Abstract

Background: Staging of mediastinal lymph nodes in non-small cell lung cancer (NSCLC) is mandatory. The maximum Standard Uptake Value (SUVmax) obtained using F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) is the best non-invasive technique available for this evaluation, but its performance varies from center to center. The aim of the present study was to identify FDG-PET predictors of mediastinal malignancy that are able to minimize intercenter variability and improve the selection of subsequent staging procedures.

Method: A multicenter study of NSCLC patients staged through FDG-PET and endobronchial ultrasonography with needle aspiration (EBUS-NA) was performed using therapeutic surgery with systematic nodal dissection as gold standard. Intercenter variability and predictive power for mediastinal malignancy of different FDG-PET measures were assessed, as well as the role of these measures for selecting additional staging procedures.

Results: One hundred and twenty-one NSCLC patients, of whom 94 (72%) had ≥ 1 hypermetabolic spots in the mediastinum, were included in the study. Mean SUVmax of the primary tumor was 12.3 (SD 6.3), and median SUVmax of the highest hypermetabolic spots in the mediastinum was 3.9 (IQR 2.4-7). Variability of FDG-PET measures between hospitals was statistically significant ($p = 0.016$ and $p < 0.001$ respectively), but lost significance when SUVmax in the mediastinum was expressed as a ratio or a subtraction from the primary tumor (SUVmax mediastinum/tumor, $p = 0.083$; and SUVmax mediastinum - tumor, $p = 0.428$ respectively). SUVmax mediastinum/tumor showed higher accuracy in the ROC analysis (AUC 0.77 CI 0.68-0.85, $p < 0.001$), and showed predictive power for mediastinal malignancy when using a 0.4 cutoff (OR 6.62, 95%CI 2.98-14.69). Sensitivities and negative predictive values of clinical staging through EBUS-NA attained values ranging between 57% and 92% after FDG-PET, which improved with additional techniques when the tumor had a diameter > 3 cm and/or a SUVmax mediastinum/tumor ratio > 0.4 .

Conclusion: The SUVmax mediastinum/tumor ratio is a good predictor of regional tumor extension in NSCLC. This measure is not influenced by intercenter variability and has an accuracy of over 70% for the identification of malignancy when using a 0.4 cutoff.

Keywords: FDG-PET, F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography, Lung cancer, NSCLC, EBUS-NA, Endobronchial ultrasonography with needle aspiration

* Correspondence: mserra.ebre.ics@gencat.cat

¹Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain

²Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2016 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

An accurate lymph node evaluation is mandatory in patients with lung cancer (LC) who do not present distant metastasis at their first examination. The implementation of F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) has improved non-invasive LC staging, because this technique adds metabolic information to thoracic imaging and optimizes mediastinal sampling by improving targeting accuracy in comparison with computed tomography (CT) [1–7].

The maximum Standard Uptake Value (SUV_{max}) provides information on the metabolic activity of the primary tumor and its regional lymph nodes. It is usually increased in the mediastinum when lymph nodes show malignant infiltration, although high FDG uptake may also be observed in inflammatory diseases. Several studies have assessed the predictive power of SUV_{max} for identifying malignant extension of LC to lymph nodes in the mediastinum, and various cutoffs for mediastinal malignancy have been proposed, ranging from 2.5 to 5.3 [8–10]. The extensive use of these cutoffs, however, is limited by the variability in the SUV_{max} values recorded at different FDG-PET centers, which is reported to range between 10% and 15% [11, 12]. The use of ratios between SUV_{max} values in the mediastinum and the tumor has been proposed as a way of homogenizing the results obtained at different centers and allows the definition of cutoffs that may not be influenced by intercenter variability [13–15].

Although the sensitivity and specificity of imaging techniques for LC staging have improved with the introduction of FDG-PET, the technique lacks sufficient accuracy to guide treatment after the procedure, mainly because its sensitivity and negative predictive value (NPV) for malignancy have shown figures below 80% in most studies [6, 16–18]. Therefore, in accordance with current guidelines a biopsy is still needed to confirm lymph node involvement, except in peripheral lung cancers below 3 cm in diameter and negative results of imaging studies of the mediastinum in which case the probability of malignancy is very low [19–21]. Endoscopic techniques like endobronchial ultrasonography with needle aspiration (EBUS-NA) are used to confirm FDG-PET results. However, the NPV of this technique after FDG-PET has not been determined, and current guidelines recommend the performance of invasive techniques such as cervical mediastinoscopy after a negative EBUS-NA before therapeutic surgery, regardless of the FDG-PET imaging results.

The aim of the present study was to identify optimal predictors of mediastinal malignancy from a PET exam which are able to minimize the variability between hospitals and improve the selection of subsequent sampling procedures such as EBUS-NA. First, the variability

and predictive power of absolute and relative SUV_{max} values obtained from the primary tumor and the mediastinum by FDG-PET were assessed in a multicenter LC study; then, the sensitivity and NPV of EBUS-NA were calculated according with FDG-PET results.

Methods

Design and patients

A prospective, multicenter study including patients with a diagnosis of non-small cell lung cancer (NSCLC) was conducted at five university hospitals between 2010 and 2012. Patients with suspected NSCLC were referred by their general practitioner to one of the participating hospitals for diagnosis and staging. Non-invasive staging examinations included a CT scan of the lung, mediastinum and upper abdomen using a multidetector-row spiral CT scanner, considering nodes in the mediastinum as abnormal when their short-axis diameter was greater than 10 mm, and a FDG-PET in patients with no suspected distant metastasis at first examination. Non-surgical pathological staging was performed by EBUS-NA, and patients with an EBUS-NA procedure negative for malignancy in the mediastinum were staged by esophageal ultrasound with needle aspiration (EUS-NA) and/or cervical mediastinoscopy when their thoracic imaging suggested mediastinal malignancy and/or their primary tumor was central or over 3 cm in diameter [19, 20]. All staging procedures were performed 1-3 weeks after the first hospital visit, to proceed to treatment not later than one month after that visit, according with fast-track protocols for lung cancer. Patients with hemorrhagic diseases or coagulation disorders were excluded from staging by EBUS-NA. Operability was assessed by physical examination, blood tests and lung function. Only patients with a diagnosis of NSCLC who were staged by CT, FDG-PET and EBUS-NA and treated surgically when staging results were negative were included in the study. Therapeutic surgery with systematic nodal dissection was performed after EBUS and mediastinoscopy negative for malignancy, and was considered the gold standard for the present study. The research protocol was approved by the reference regional ethics committee for the project (Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, reference: FIS PS09/01612) and by the local ethics committees of all participating centers. Written informed consents were obtained from all participating patients.

F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography FDG-PET with a integrated CT equipment (FDG-PET/CT) (4 hospitals) or performed just after CT (1 hospital) (Phillips, Amsterdam, The Netherlands; or General Electric, Fairfield, Connecticut, United States of America), was used to stage the mediastinum at each hospital in patients with no suspected distant metastasis at first examination. Prior to

18 F-FDG administration, patients fasted for at least six hours and plasma glucose level was confirmed to be inferior to 175 mg/dL. The patient received intravenously standard activity 3,7 MBq of 18 F-FDG per kg of weight and rested 60 minute for the scheduled uptake period. FDG-PET images were acquired from mid-skull to the mid-thigh with the patient supine, reconstructed with a standard iterative algorithm, and reformatted into axial, coronal, and sagittal views. Administered activity, time of administration, and patient's body weight were recorded for calculation of maximum standardized uptake values (SUV max). Recovered images were interpreted by a nuclear medicine physician who evaluated both the appearance of the primary lung tumor and the hypermetabolic lymph nodes in the mediastinum. Standard uptake values of examined regions were assigned by the software of the equipment used in each hospital. To quantify the maximal metabolic activity of lymph nodes in the mediastinum their highest SUVmax was measured, as an absolute value, as a ratio between this value and the SUVmax of the primary tumor, and after the subtraction of this second value from this highest SUVmax in the mediastinum [13–15]. Homogeneity of FDG-PET between hospitals was assessed through comparisons of the SUVmax values of primary lung tumors and of lymph node regions with the highest SUVmax in the mediastinum, both as absolute and as relative values.

Cytopathologic staging

EBUS-NA was performed in an outpatient setting using a flexible bronchoscope with a linear scanning transducer (BFUC180F, Olympus Optical Co Ltd., Tokyo, Japan). The bronchoscope has a convex distal probe capable of producing linear parallel scans of the mediastinal and peribronchial tissues and a working channel suitable for the performance of NA under direct ultrasound guidance. Local anesthesia and sedation were achieved using topical lidocaine spray and intravenous midazolam, propofol and/or fentanyl in accordance with standard recommendations [22]. Regional lymph node stations of the mediastinum and hilar regions (stations 2, 4, 7, 10 and 11) were systematically imaged and measured, and all nodes with a short-axis diameter of 5 mm or more were sampled with a 22-gauge needle (NA-201SX-4022, Olympus Optical Co Ltd.).

Samples were categorized according to whether they had been extracted from a normal node, showing lymphocytes and no neoplastic cells, or from a metastatic node, with groups of neoplastic cells. Aspirates containing only bronchial or blood cells, non-diagnostic atypical cells or insufficient material were considered inadequate. Every identified node was sampled at least three times, unless rapid on-site evaluation performed by a pathologist during the procedure confirmed the adequacy of the sample after the first or the second aspiration [23, 24].

Patients with negative EBUS-NA results were staged through EUS-NA, in left-sided tumors with abnormal lymph nodes by CT and/or FDG-PET in mediastinal regions 7, 8 or 9 [25–28]. Samples obtained through this procedure were categorized with the same criteria used for EBUS-NA. Patients with negative results in all the endoscopic procedures underwent cervical mediastinoscopy in accordance with guidelines [19, 20]. Systematic nodal dissection was performed during therapeutic surgery as the gold standard procedure for mediastinal staging.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS statistical software package version 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Results obtained from categorical variables are expressed as absolute and relative frequencies, and results for continuous variables as means and standard deviations (SD) when the distribution was normal, or as medians and interquartile ranges (IQRs) when the distribution was not normal.

First, absolute SUVmax values for the primary tumor and the mediastinal node with highest FDG-PET uptake were measured, and the variability between hospitals assessed using one way ANOVA. Relative values of SUVmax in mediastinum (using SUVmax of the primary tumor as the reference) were calculated, both as a ratio (SUVmax mediastinum/SUVmax tumor) and as a subtraction (SUVmax mediastinum - SUVmax tumor), and the intercenter variability of these values was measured (one way ANOVA).

Second, the predictive power of absolute and relative SUVmax values for mediastinal malignancy was assessed, using pathology results as gold standard and applying logistic regression. The accuracies of different measures of SUVmax in the mediastinum were examined using ROC analyses and area under the curve (AUC). SUVmax cutoffs with maximal accuracy for the identification of mediastinal malignancy were defined, and their predictive powers for the identification of malignancy were calculated through univariate and multivariate logistic regression analyses. The results obtained in these analyses were expressed as crude and adjusted odds ratios (OR), with 95% confidence intervals (CI). All variables showing an association with the outcome variable ($p < 0.10$) in the univariate analysis were included in the multivariate models.

Finally, to determine the need for additional staging techniques after negative results in EBUS-NA, the sensitivity and NPV of this endoscopic technique for the diagnosis of mediastinal malignancy were assessed in patients at high and low risk according to their SUVmax values. Results were compared using the chi-square test. All tests used in the analyses were two-sided, and a p value of 0.05 or less was reported as statistically significant.

Results

One hundred and twenty-one patients from five hospitals with a diagnosis of NSCLC were enrolled in the study over two years. Their median age was 65.7 years; adenocarcinoma was the most frequent tumor (52.9%), and a FDG-PET showed one or more hypermetabolic lymph nodes in the mediastinum in 77.7% of patients. The mean SUVmax of the primary tumor was 12.3 (SD 6.3) and the median SUVmax of the mediastinal node with the highest FDG-PET uptake was 3.9 (IQR 2.4-7.0). Mediastinal malignancy was diagnosed in 65 patients (53.7%), with EBUS-NA being the procedure which attained this diagnosis most frequently. Mediastinal lymph node involvement was confirmed through systematic nodal dissection performed during therapeutic surgery in six patients with negative endoscopic procedures and cervical mediastinoscopies (Table 1).

Between-center FDG-PET variability in absolute SUVmax obtained from the tumor and the hypermetabolic

image with the highest FDG uptake in the mediastinum was statistically significant ($p = 0.016$ and $p < 0.001$ respectively; one way ANOVA) (Figs. 1a and 1b). This variability in the mediastinum values disappeared when the SUVmax of the image with highest FDG uptake was adjusted for the SUVmax of the tumor, either as a ratio (SUVmax mediastinum/tumor) or as a subtraction (SUVmax mediastinum - tumor) ($p = 0.083$ and $p = 0.428$ respectively; one way ANOVA) (Figs. 2a and 2b).

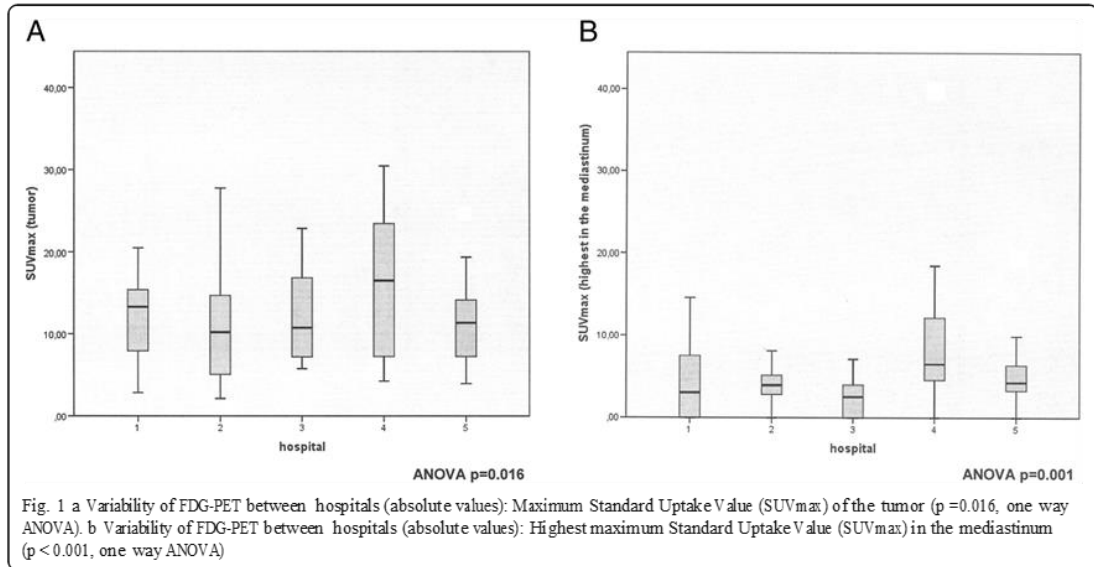
SUVmax of the primary tumor did not show predictive power for identifying mediastinal extension of the disease (OR 0.98, 95%CI 0.92-1.04), but SUVmax in the mediastinum was clearly associated with malignancy when attaining values above the median (3.9). Equivalent results were found for the median values of the ratio between SUVmax in the mediastinum and SUVmax of the tumor (0.4) and the subtraction of this latter value from the SUVmax in the mediastinum (-6.1) (Table 2). Areas under the curve at ROC analysis for SUVmax in the mediastinum (AUC 0.77 CI 0.69-0.86, $p < 0.001$) (Fig. 3a) and for the ratio between this value and the SUVmax of the tumor (AUC 0.77 CI 0.68-0.85, $p < 0.001$) (Fig. 3b) were equivalent, confirming that the two measures were equally useful. The result of subtracting the SUVmax of the tumor from the highest SUVmax in the mediastinum showed a lower figure, still statistically significant (AUC 0.74 CI 0.6-0.83, $p < 0.001$). Cutoffs of 4 for SUVmax in the mediastinum and of 0.4 for the ratio between the SUVmax in the mediastinum and the tumor showed similar sensitivities, specificities and accuracies over 70% for the identification of mediastinal malignancy (Table 3). Accordingly, these two measures of SUVmax in the mediastinum may be considered equivalent, with the advantage of a greater homogeneity between centers when using the SUVmax mediastinum/tumor ratio.

Younger age and adenocarcinoma type were predictors of mediastinal involvement in NSCLC. The observation of a single hypermetabolic image in the mediastinum during FDG-PET did not reach statistical significance as a predictor of mediastinal malignancy (OR 2.34, 95% CI 0.89-6.22), but multiple FDG-PET hypermetabolic lymph nodes were significantly associated with the spread of NSCLC to the mediastinum (OR 3.87, 95% CI 1.40-10.66). SUVmax in the mediastinum above 4 and SUVmax mediastinum/tumor ratio above 0.4 showed similar predictive power for mediastinal malignancy (OR 10.68, 95% CI 4.55-25.10 and OR 6.62, 95% CI 2.98-14.69 respectively) (Table 4), which did not change significantly after adjusting for age, uni- and multilevel positive FDG-PET in the mediastinum and type of tumor in the multivariate analysis (OR 10.81, 95% CI 4.32-27.07 and OR 5.75, 95% CI 2.49-13.29 respectively).

EBUS-NA confirms an extension of NSCLC to the mediastinum in more than 15% of the cases

Table 1 Patient characteristics (n = 121)

Sociodemographic data	
Age (years), mean (SD)	65.7 (9.2)
Gender (female), n (%)	17 (14.0)
Tumor characteristics	
Pathology, n (%)	
Squamous-cell carcinoma	46 (38.0)
Adenocarcinoma Large cell carcinoma Non-specified non-small cell lung cancer	64 (52.9)
	4 (3.3)
	7 (5.8)
Tumor size, n (%):	
≤ 3 cm	46 (38.0)
> 3 cm and ≤ 7 cm	57 (47.1)
> 7 cm	18 (14.9)
F-18 fluorodeoxyglucose Positron emission tomography (FDG-PET)	
SUVmax tumor, mean (SD)	12.3 (6.3)
Single hypermetabolic image in the mediastinum, n (%)	50 (41.3)
Multiple hypermetabolic images in the mediastinum, n (%)	44 (36.4)
SUVmax mediastinum, median (IQR)	3.9 (2.4-7.0)
Staging of the mediastinum	
Malignancy extended to mediastinal lymph nodes	65 (53.8)
Technique diagnosing mediastinal malignancy	
EBUS-NA	53 (43.8)
EUS-NA or mediastinoscopy	6 (5.0)
Surgical lymphadenectomy	6 (5.0)



independently of FDG-PET results in our study. Sensitivities and negative predictive values of EBUS-NA for the diagnosis of mediastinal malignancy, however, did not attain values above 90% for most of the subgroups categorized according to SUVmax in the mediastinum, with equivalent figures for SUVmax in the mediastinum and SUVmax mediastinum/tumor ratios ($p > 0.05$, chi square test) (Table 5). This finding supports the use of

additional staging techniques such as EUS-NA and/or cervical mediastinoscopy to achieve accurate mediastinal staging previous to therapeutic surgery. In tumors with a SUVmax below the cutoff and diameters of 3 cm or less, however, the use of additional techniques in clinical staging in our study did not increase the presurgical sensitivity and negative predictive value, with equivalent results when there is none

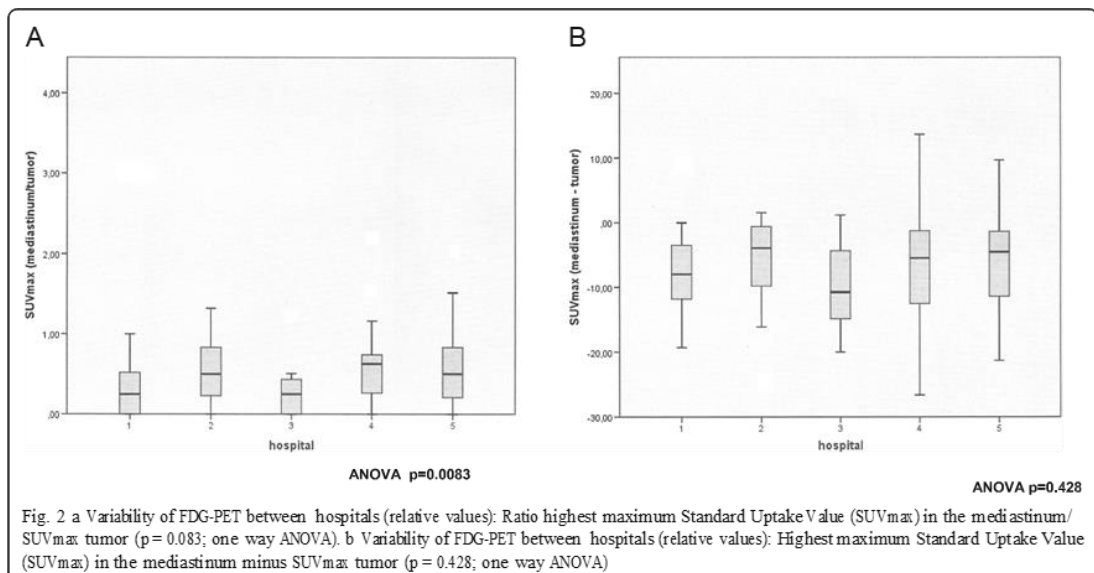


Table 2 SUVmax values as a predictor of mediastinal malignancy

		Quartile categories	OR (95% IC)	p
SUVmax tumor	11.4 (SD 5.3)		0.98 (0.92-1.04)	0.469
SUVmax mediastinum	3.9 (IQR 2.4 - 7.0)	1st Q (reference)	1	0.471
		2nd Q	0.67 (0.22-2.01)	0.007
		3rd Q	4.44 (1.49-13.26)	<0.001
		4th Q	18.00 (4.38-74.01)	
$\frac{SUV_{max}}{SUV_{max} \text{ Tumor}}$	0.4 (IQR 0.1 - 0.7)	1st Q (reference)	1	0.919
		2nd Q	1.06 (0.36-3.14)	0.012
		3rd Q	3.89 (1.35-11.21)	<0.001
		4th Q	18.52 (4.42-77.60)	
SUVmax Mediastinum minus SUVmax Tumor	[-6.1] (IQR [-11.7] - [-2.0])	1st Q (reference)	1	0.083
		2nd Q	2.58 (0.88-7.54)	0.016
		3rd Q	3.57 (1.17-10.04)	<0.001
		4th Q	23.15 (6.00-95.71)	

or one single hypermetabolic lymph node in the mediastinum, or multiple FDG-PET hot spots ($p > 0.05$, chi square test). These results suggest that in this clinical situation it may be possible to proceed to therapeutic surgery and systematic nodal dissection after a negative EBUS-NA exam.

Discussion

A highest SUVmax value in the mediastinum of over 4 proved to be a good predictor of mediastinal dissemination in patients with LC in our study. However, this FDG-PET measure showed variability between centers, a finding that limits its use a marker in staging for a specific hospital. This variability was corrected when the highest SUVmax value in the mediastinum was adjusted by the SUVmax of the primary tumor, either as a ratio

(SUVmax mediastinum/tumor) or as a subtraction (SUVmax tumor - mediastinum). The ratio between the SUVmax in the mediastinum and the primary tumor emerged as the best relative predictor of nodal involvement by LC when attaining values over 0.4, showing a similar accuracy to SUVmax in the mediastinum expressed as an absolute value, without its intercenter variability.

The presence of significant intercenter differences in SUVmax values obtained from FDG-PET in LC patients is confirmed in our study, that shows that these differences can be corrected if the SUVmax of the primary tumor is used to adjust mediastinal values. Intercenter variability in SUVmax in the tumor and mediastinum has been reported in previous studies, depending on the scanner, reconstruction protocols [11, 12], and time

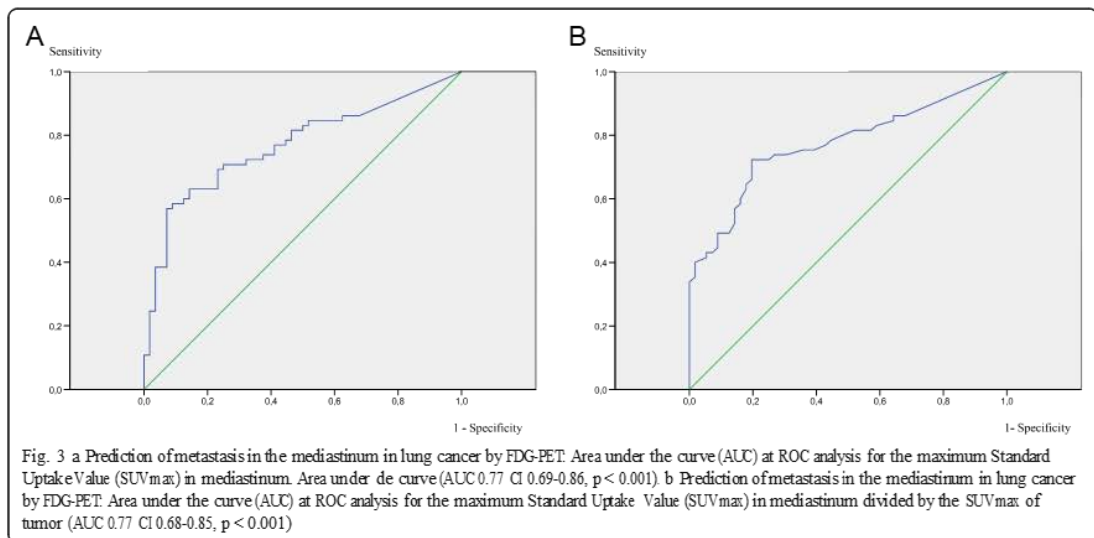


Table 3 Accuracy of cut-off SUVmax values for mediastinal malignancy, expressed as absolute value or as a ratio

	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
SUVmax mediastinum >4	72.3	80.4	81.0	71.4	76.0
$\frac{SUV_{max}}{SUV_{max} \text{ Tumor}} > 0.4$	70.8	73.2	75.4	68.3	71.9

between dose injection and imaging [14]. The use of the ratio between the SUVmax in the mediastinum and tumor (SUVmax mediastinum/tumor) was first proposed by Cerfolio and cols. as a way of correcting intercenter variability [13], and this relative value has been used successfully by other authors to identify mediastinal malignancy [14, 15]. Our study confirms the utility of the adjustment of SUVmax in the mediastinum using the SUVmax of the tumor, either as a ratio or as a subtraction, in order to avoid intercenter variability, allowing the comparison of results between centers.

The SUVmax mediastinum/tumor ratio emerged as the best predictor of mediastinal involvement in LC. This measure was not affected by intercenter variability, and attained a high AUC value, equivalent to the figure obtained by SUVmax when expressed as an absolute value and higher than the subtraction SUVmax mediastinum - tumor. The SUVmax mediastinum/tumor ratio showed an OR 6.62 (2.98-14.69) for mediastinal malignancy when above 0.4, similar to the OR of 10.68 (4.55-25.10) found for absolute values of SUVmax in the mediastinum when above 4. This SUVmax mediastinum/tumor ratio cutoff attained a sensitivity of 70.8 and an accuracy of 71.9% for the identification of malignancy, similar to the results achieved using absolute values. The cutoffs proposed in previous studies for SUVmax mediastinum/tumor ratios for attaining a sensitivity above 70% have ranged between 0.28 and 0.56 [13-15], and our results confirm that the use of a 0.4 cutoff, inside this range, attains a sensitivity above this figure. To attain

Table 4 Univariate analysis of predictors for mediastinal malignancy

	OR (CI)	p
Age	0.95 (0.92-0.99)	.029
Gender (women)	2.31 (0.76-7.02)	.140
Tumor size	0.81 (0.48-1.37)	.435
Adenocarcinoma	2.45 (1.18-5.10)	.017
Single hypermetabolic node	2.34 (0.89-6.22)	.086
Multiple hypermetabolic nodes	3.87 (1.40-10.66)	.009
SUVmax Mediastinum > 4	10.68 (4.55-25.10)	<.001
$\frac{SUV_{max}}{SUV_{max} \text{ Tumor}} > 0.4$	6.62 (2.98-14.69)	<.001

an equivalent sensitivity for the identification of malignancy, absolute SUVmax values in the mediastinum ranging between 2.5 and 5.3 have been proposed [8-10, 17], but they remain unsuitable for intercenter comparisons.

Adenocarcinoma type, younger age and multiple FDG-PET hypermetabolic lymph nodes, were significantly associated with extension to the mediastinum of NSCLC in the present study, but the predictive power of the SUVmax mediastinum/tumor ratio for malignant extension did not change after adjustment for these variables. However, in spite of its usefulness for the identification of mediastinal extension in LC, FDG-PET did not obtain an accuracy above 80%, and sampling of the lymph nodes in the mediastinum is required for the confirmation of positive imaging results and the identification of malignancy in patients who have negative FDG-PET exams but are at a high risk of regional extension [4, 5, 7, 17]. EBUS-NA is the first approach for mediastinal sampling after FDG-PET, and in the present study it increased the accuracy of clinical staging independently of the FDG-PET results. EBUS-NA only attained a sensitivity over 80% when FDG-PET value was above the cutoff, however, and showed a NPV below 70% in this subgroup of patients. These results are not high enough to obviate the need for additional staging procedures before surgery such as EUS-NA and mediastinoscopy in order to minimize understaging, except in patients with tumors with a diameter of 3 cm or below, where the NPV of clinical staging with EBUS-NA did not increase with additional sampling through EUS and/or mediastinoscopy. These findings support the recommendation in current guidelines of mediastinal sampling using EBUS-NA after FDG-PET in NSCLC [19, 20], and suggest that this endoscopic technique may be enough for presurgical staging in patients with lung tumors up to 3 cm in diameter, when the highest SUVmax mediastinum/tumor ratio was below 0.4.

Conclusion

SUVmax mediastinum and the SUVmax mediastinum/tumor ratio are both good predictors of mediastinal malignancy in NSCLC, and both show accuracies over 70% at values above 4 and 0.4 respectively. When SUVmax is measured as a ratio it is not influenced by intercenter variability, and allows comparisons between hospitals without additional adjustments. The presence of multiple FDG-PET hypermetabolic lymph nodes in the mediastinum predicts the regional extension of the tumor, but presents a much lower OR than SUVmax, and thus has a lower diagnostic power than the measurement of SUV. However, most FDG-PET results obtained in the mediastinum during LC staging would need to be

Table 5 Ebus sensitivity and negative predictive value according to FDG-PET results

	SUV Cut-off	Tumor size	n	Mediastinal malignancy at EBUS	EBUS-NA Sensitivity	EBUS-NA NPV	Mediastinal malignancy at EUS-NA or mediastinoscopy	Mediastinal malignancy at systematic nodal dissection
SUVmax mediastinum	≤4	≤3 cm	22	4 (18.2%)	57.1%	83.3%	0 (0%)	3 (13.6%)
	≤4	>3 cm	41	8 (19.5%)	61.5%	84.8%	1 (2.4%)	4 (9.7%)
	>4	all	58	41 (70.7%)	87.2%	64.7%	5 (8.6%)	1 (1.7%)
SUV ^{max} SUV ^{max} tumor	≤0.4	≤3 cm	15	4 (26.7%)	66.7%	81.8%	0 (0%)	2 (13.3%)
	≤0.4	>3 cm	45	10 (22.2%)	76.9%	91.4%	1 (2.2%)	2 (2.2%)
	>0.4	all	61	39 (63.9%)	84.8%	68.2%	5 (8.2%)	2 (3.3%)

confirmed through semi-invasive techniques, given that the predictive values of the technique remain below 90%. EBUS-NA increases the accuracy of FDG-PET, and may be enough for presurgical staging in small tumors with low SUVmax mediastinum/tumor values.

Abbreviations

AUC: Area under the curve; CT: computed tomography; EBUS-NA: Endobronchial ultrasonography with needle aspiration; EUS-NA: esophageal ultrasound with needle aspiration; FDG-PET: F-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography; IQR: interquartile range; NPV: negative predictive value; ROC: Receiver Operating Characteristic; SUVmax: maximum Standard Uptake Value

Acknowledgements

The authors acknowledge Michael Maudsley for the correction of the manuscript.

Funding

The study was funded by Ciber de Enfermedades Respiratorias - Ciberes, Fondo de Investigación Sanitaria-FEDER P112/02040, Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica - SEPAR and Fundació Catalana de Pneumologia.

Availability of data and materials

Raw data used in the present study were obtained from clinical records of participating patients and were included in a central database after anonymization according with confidentiality requirements. The dataset is under custody by the corresponding author and may be available after a requirement fulfilling the requirements reference ethics committee for approval.

Authors' contributions

Data collection was performed by SM, GM, BLI, MC, VL, MMI, FVA, BMI, CR, GLR and CE. SM and ME were responsible of the creation of the database and the analyses performed. SM, BLI and ME prepared the first version of the manuscript that was modified by GM, MC, VL, MMI, FVA, BMI, CR, GLR and CE. The final version was readed and approved by all coauthors.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

The research protocol was approved by the reference regional ethics committee for the project (Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, reference FIS PS09/01612) and by the local ethics committees of all participating centers (Hospital Universitari Parc Taulí Ethics Committee; Complejo Hospitalario Universitario de Vigo Ethics Committee; Complejo Asistencial de Salamanca Ethics Committee; Hospital Universitario 12 de Octubre Ethics Committee; Hospital Universitari La Fe de Valencia Ethics Committee). Written informed consents were obtained from all participating patients.

Author details

¹Hospital Universitari Parc Taulí, Sabadell, Spain. ²Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. ³Ciber de Enfermedades Respiratorias - Ciberes, Madrid, Spain. ⁴Health Services Research on Chronic Diseases Network- REDISEC, Madrid, Spain. ⁵Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo, Spain. ⁶Complejo Asistencial de Salamanca, Salamanca, Spain. ⁷Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain. ⁸Hospital Universitari La Fe, Valencia, Spain.

Received: 9 August 2016 Accepted: 24 November 2016

Published online: 08 December 2016

References

- Broderick S, Patterson G. Performance of integrated positron emission tomography/computed tomography for mediastinal nodal staging in non-small cell lung carcinoma. *Thorac Surg Clin*. 2013;23:193–8.
- Fischer B, Lassen U, Mortensen J, Larsen S, Loft A, Bertelsen A, Ravn J, Clementsen P, Ulrik L, Hogholm A, Larsen K, Rasmussen T, Keding S, Dirksen A, Gerke O, Skov B, Steffensen I, Hansen J, Vilmann P, Jacobsen G, Backer V, Maltbæk N, Pedersen J, Madsen H, Nielsen H, Højgaard L. Preoperative staging of lung cancer with combined PET-CT. *New England J Med*. 2009;361:32–9.
- Cerfolio R, Ojha B, Bryant A, Bass C, Bartalucci A, Mountz J. The Role of FDG-PET scan in staging patients with non-small cell carcinoma. *Ann Thorac Surg*. 2003;76:861–6.
- Cerfolio RJ, Buddhwardham O, Bryant A, Raghuvveer V, Mountz J, Bartolucci A. The accuracy of integrated PET/CT compared with dedicated PET alone for the staging of patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2004;78:1017–23.
- Harders SW, Madsen HH, Hjorthaug K, Arveschoug AK, Rasmussen TR, Meldgaard P, Hoejbjerg JA, Pilegaard HK, Hager H, Rehling M, Rasmussen F. Mediastinal staging in non-small-cell lung carcinoma: computed tomography versus F-18-fluorodeoxyglucose positron-emission tomography and computed tomography. *Cancer Imaging*. 2014;14:23.
- Pak K, Park S, Jeong Cheon G, Kang K, Kim I, Lee D, Lim E, Chung J. Update on nodal staging in non-small cell lung cancer with integrated positron emission tomography/computed tomography: A meta-analysis. *Annals Nuclear Med*. 2015;29(5):409–19.
- Cerfolio R, Ojha B, Bryant A, Bass C, Bartalucci A, Mountz J. The role of FDG-PET scan in staging patients with nodal cell carcinoma. *The Annals Thoracic Surgery*. 2003;76:861–6.
- Bryant A, Cerfolio R, Klemm K, Ojha B. Maximum Standard uptake value of mediastinal lymph nodes on integrated FDG-PET-CT predicts pathology in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2006;82:417–23.
- Hellwig D, Graeter TP, Ukena D, Groeschel A, Sybrecht G, Schaeffers H, Kirsch C. ¹⁸F-FDG PET for mediastinal staging of lung cancer: which threshold make sense? *J Nuclear Med*. 2007;48:1761–6.
- Lee BE, Redwine J, Foster C, Abella E, Lown T, Lau D, Follette D. Mediastinoscopy might not be necessary in patients with non-small cell lung cancer with mediastinal lymph nodes having a maximum standardized uptake value of less than 5.3. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(3):615–9.
- Adams MC, Tuckington TG, Wilson JM, Wong T. A systematic review of the factors affecting accuracy of SUV measurements. *Am J Roentgenol*. 2010;195:310–20.
- Westerterp M, Pruijm J, Oyen W, Hoekstra O, Paans A, Visser E, Van Lanschot J, Sloof G, Boellaard R. Quantification of FDG-PET studies using standardised uptake values in multi-centre trials: effects of image reconstruction,

- resolution and ROI definition parameters. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007;34:392–404.
13. Cerfolio R, Bryant A. Ratio of the maximum standardized uptake value on FDG-PET of the mediastinal (N2) lymph nodes to the primary tumor may be a universal predictor of nodal malignancy in patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:1826–30.
 14. Mattes MD, Moshchinsky AB, Ahsanuddin S, Rizk NP, Foster A, Wu AJ, Ashamalla H, Weber WA, Rimmer A. Ratio of Lymph Node to Primary Tumor SUV on PET/CT Accurately Predicts Nodal Malignancy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2015;16(6):e253–8.
 15. Iskesender I, Kadiogly S, Kosar A, Atasalhi A, Kit A. Is there any maximum standardised uptake value variation among positron emission and tomography scanners for lung cancer? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2011;12:965–9.
 16. Terán MD, Brock MV. Staging lymph node metastases from lung cancer in the mediastinum. *J Thoracic Dis.* 2014;6(3):230–6.
 17. Schmidt-Hansen M, Baldwin DR, Hasler E, Zamora J, Abraira V, Roqué I, Figuls M. PET-CT for assessing mediastinal lymph node involvement in patients with suspected resectable non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;11.
 18. Mingu SD. Diagnosis and Staging lung cancer involving the mediastinum. *Chest.* 2015;147(5):1401–12.
 19. De Leyn P, Dooms C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R, Tima A, Van Schil P, Venuta F, Waller D, Weder W, Zielinski M. 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):225–33.
 20. De Leyn P, Lardinois D, Van Schil P, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M, Waller D, Lerut T, Weder W. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *European J Cardio-thoracic Surg.* 2007;32:1–8.
 21. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, Harris LJ, Detterbeck FC. Methods for Staging Non-small Cell Lung Cancer. *Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians. Evidence-Based Clinical Practice Guidelines.* CHEST 2013 May; 143(5 Suppl):e211S–50S
 22. Du Rand IA, Baikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S, on behalf of the British Thoracic Society Bronchoscopy Guideline Group. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults. *Thorax.* 2013;68:ii–iv.
 23. Lee HS, Lee GK, Lee HS, Kim MS, Lee JM, Kim HK, et al. Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal staging of non-small cell lung cancer. How many aspirations per target lymph node station? *Chest.* 2008;134:368–74.
 24. Nayak A, Sugrue C, Koenig S, Wasserman PG, Hoda S, Morgenstern NJ. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspirate (EBUS-TBNA): A proposal for on-site adequacy criteria. *Diagn Cytopathol.* 2010;40:128–37.
 25. Sanz-Santos J, Serra M, Gallego M, Monton C, Cosío B, Salueda J, Fernández-Villar A, García-Luján R, Cordovilla R, Varela G, Cases E, Andreo F, Monsó E. Determinants of false-negative results in non-small-cell lung cancer staging by endobronchial ultrasound-guided needle aspiration. *European J Cardiothoracic Surg.* 2015;47(4):642–7.
 26. Wilmann P, Clementsen PF, Colella S, Siemsen M, De Leyn P, Dumonceau J, Herth F, Larghi A, Vazquez-Sequeiros E, Hassan C, Crombag L, Korevaar D, Korge L, Annema J. 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 European Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *Endoscopy.* 2015;47:545–59.
 27. Verhagen AF, Schuurbiens OCJ, Looijen-Salamon MG, Van der Heide SM, Van Swieten HA, Van der Heijden EHF. Mediastinal staging in daily practice: endosonography, followed by cervical mediastinoscopy. Do we really need both? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013;2013(17):823–8.
 28. Cerfolio R, Bryant A, Eloubeidi M, Frederick P, Minnich D, Harbour K, Dransfield M. The true false negative rates of esophageal and endobronchial ultrasound in the staging of mediastinal lymph nodes in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2010;90:427–34.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.2. Segon estudi

“Determinants of false-negative results in non-small-cell lung cancer staging by endobronchial ultrasound guided needle aspiration”

Jose Sanz-Santos, **Mireia Serra**, Miguel Gallego, Conchita Montón, Borja Cosío, Jaume Sauleda, Alberto Fernández-Villar, Ricardo García-Luján, Eduardo de Miguel, Rosa Cordovilla, Gonzalo Varela, Enrique Cases, Felipe Andreo, Eduard Monsó.

Article publicat a European Journal of Cardiothoracic Surgery

Eur J Cardiothorac Surg. 2015; 47(4): 642-7

Antecedents. L'ecobronscòpia amb punció-aspiració transbronquial (EBUS-TBNA) és una tècnica semiinvasiva utilitzada per l'estadificació mediastínica. La literatura mostra que el percentatge de falsos negatius de l'EBUS-TBNA és variable en estudis realitzats prèviament. L'objectiu d'aquest estudi és identificar quins són els determinants dels falsos negatius de la tècnica relacionats amb el procediment i amb les característiques del tumor.

Mètode. Es va realitzar un estudi prospectiu en pacients amb càncer de pulmó no cèl·lula petita (CPNCP) estadificats com a N0/N1 per EBUS-TBNA. En tots els pacients es va realitzar cirurgia terapèutica. Es va calcular la freqüència de falsos negatius en els ganglis mediastínic. Es van definir mitjançant regressió logística multivariant els determinants de falsos negatius relacionats amb el procediment i els relacionats amb les característiques del tumor avaluant si eren en territoris accessibles o no accessibles per EBUS-TBNA.

Resultats. Es varen identificar 23 falsos negatius en els 165 pacients inclosos en l'estudi (13.9%); d'aquests, 17 estaven localitzats en estacions accessibles per EBUS-TBNA (10.3%). Es va constatar que quan es realitzava un mostreig en tres estacions mediastíniques la seva prevalença era baixa (2.4%), en canvi era superior al 10% quan no s'assolia aquest requeriment (≤ 2 estacions ganglionars) ($p=0.043$). En l'anàlisi multivariant, els determinants de falsos negatius en els territoris accessibles per EBUS-TBNA varen ser la tomografia computeritzada (TAC) o la tomografia per emissió de positrons (PET) quan mostraven afectació mediastínica (OR 7.77, 95%IC 2.19-27.51, $p=0.001$) i l'extensió del mostreig mediastínic (3 estacions ganglionars) (OR 0.37, 95%IC 0.16-0.89, $p=0.026$). En canvi, en els territoris no accessibles per EBUS-TBNA, la ubicació del tumor era l'únic determinant, i es constatà una probabilitat més alta en els tumors localitzats en el pulmó esquerre (OR 10.1, 95%IC 1.17-87.52, $p=0.036$).

Conclusions. La presència de falsos negatius en EBUS-TBNA va ser del 15% en els pacients amb CPNCP quan es realitzava un mostreig de < 3 estacions ganglionars, però quan es realitzava un mostreig de les tres estacions mediastíniques la xifra de falsos negatius es reduïa al 3%. La reducció de falsos negatius es va associar a l'extensió del mostreig, per tant, l'obtenció de mostres representatives de les estacions laterotraqueals baixes i subcarinal es pot considerar un criteri de qualitat. En els territoris no accessibles per la tècnica, els falsos negatius es van associar únicament amb la localització del tumor, quan aquest s'ubicava en el pulmó esquerre.

Cite this article as: Sanz-Santos J, Serra M, Gallego M, Montón C, Cosío B, Sauleda J et al. Determinants of false-negative results in non-small-cell lung cancer staging by endobronchial ultrasound-guided needle aspiration. *Eur J Cardiothorac Surg* 2015;47:642–7.

Determinants of false-negative results in non-small-cell lung cancer staging by endobronchial ultrasound-guided needle aspiration[†]

José Sanz-Santos^{a,*}, Mireia Serra^{b,c}, Miguel Gallego^{b,d}, Concepción Montón^b, Borja Cosío^{d,e}, Jaume Sauleda^{e,d,f}, Alberto Fernández-Villar^g, Ricardo García-Luján^{d,h}, Eduardo de Miguel^{d,h}, Rosa Cordovillaⁱ, Gonzalo Varelaⁱ, Enrique Cases^j, Felipe Andreo^{a,c,d} and Eduard Monsó^{b,c,d}

^a Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

^b Hospital Universitari del Parc Taulí, Sabadell, Spain

^c Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

^d Ciber de Enfermedades Respiratorias–Ciberes, Bunyola, Spain

^e Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, Spain

^f Institut Universitari de Ciències de la Salut, Palma de Mallorca, Spain

^g Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Vigo, Spain

^h Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

ⁱ Complejo Asistencial de Salamanca, Salamanca, Spain

^j Hospital Universitari La Fe, Valencia, Spain

* Corresponding author. Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Carretera de Canyet, S/N. 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel: +34-934-978920; fax: +34-934-978843; e-mail: 34057jss@comb.cat (J. Sanz-Santos).

Received 7 March 2014; received in revised form 12 May 2014; accepted 15 May 2014

Abstract

OBJECTIVES: False-negative results of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in non-small-cell lung cancer staging have shown significant variability in previous studies. The aim of this study was to identify procedure- and tumour-related determinants of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration false-negative results.

METHODS: We conducted a prospective study that included non-small-cell lung cancer patients staged as N0/N1 by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration and undergoing therapeutic surgery. The frequency of false-negative results in the mediastinum was calculated. Procedure-related, first, and tumour-related, second, determinants of false-negative results in stations reachable and non-reachable by endobronchial ultrasound were determined by multivariate logistic regression.

RESULTS: False-negative endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration results were identified in 23 of 165 enrolled patients (13.9%), mainly in stations reachable by endobronchial ultrasound (17 cases, 10.3%). False-negative results were related to the extensiveness of endobronchial ultrasound sampling: their prevalence was low (2.4%) when sampling of three mediastinal stations was satisfactory, but rose above 10% when this requirement was not fulfilled ($P = 0.043$). In the multivariate analysis, abnormal mediastinum on computer tomography/positron emission tomography [odds ratio (OR) 7.77, 95% confidence interval (CI) 2.19–27.51, $P = 0.001$] and extensiveness of satisfactory sampling of mediastinal stations (OR 0.37, 95% CI 0.16–0.89, $P = 0.026$) were statistically significant risk factors for false-negative results in stations reachable by endobronchial ultrasound. False-negative results in non-reachable nodes were associated with a left-sided location of the tumour (OR 10.11, 95% CI 1.17–87.52, $P = 0.036$).

CONCLUSIONS: The presence of false-negative ultrasound-guided transbronchial needle aspiration results were observed in nearly 15% of non-small-cell lung cancer patients but in only 3% when satisfactory samples were obtained from three mediastinal stations. False-negative results in stations reachable by endobronchial ultrasound were associated with the extensiveness of sampling, and in stations out of reach of endobronchial ultrasound with left-sided tumours. These results suggest that satisfactory sampling of at least three mediastinal stations by EBUS-TBNA may be a quality criterion to be recommended for EBUS-TBNA staging.

Keywords: Non-small-cell lung cancer • Staging • Mediastinum • Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration • False negative

[†]Presented at the European Respiratory Society Annual Meeting, Barcelona, Spain, 7–11 September 2013.

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery. All rights reserved.

INTRODUCTION

Accurate staging of the mediastinum is crucial for the prognosis and treatment of patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) without evidence of distant metastases. Computer tomography (CT) and positron emission tomography (PET) are current standards for noninvasive mediastinal staging in these patients, but require pathological confirmation by invasive procedures when positive [1], and may give false-negative results in patients with large and/or central tumours [2]. Minimally invasive methods such as endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) are replacing surgical staging procedures in NSCLC; when these techniques demonstrate mediastinal involvement, no further confirmatory tests are required, because the likelihood of a false-positive result with these procedures is very low [3]. After a negative EBUS-TBNA, however, the use of subsequent staging techniques remains controversial because the negative predictive value of the technique has shown significant variability between studies [4, 5] and no minimal requirements for a satisfactory EBUS-TBNA procedure have been defined and validated. Accordingly, it has been claimed that EBUS-TBNA is not sufficiently reliable to categorically rule out metastatic involvement of the mediastinum, and secondary confirmatory procedures such as oesophageal ultrasonography and/or cervical mediastinoscopy are recommended when EBUS-TBNA procedures do not show mediastinal malignancy [1, 6].

The aims of our study were, first, to identify procedure-related, and, second, tumour-related determinants of false-negative results in EBUS-TBNA staging, using nodal dissection as the gold standard for the evaluation of the bronchoscopic procedure. A definition of the minimal requirements to be fulfilled by EBUS-TBNA in order to guarantee a low prevalence of false-negative results will allow a more accurate selection of patients requiring additional staging procedures before the indication of therapeutic surgery.

MATERIALS AND METHODS

Patients

A prospective, multicentre study including patients diagnosed with NSCLC considered operable after EBUS-TBNA was conducted in six university hospitals between 2010 and 2012. Patients with a suspicion of NSCLC were referred by their general practitioner to one of the participating hospitals for diagnosis and/or staging. Staging was performed by EBUS-TBNA in all NSCLC patients who did not show distant metastasis at the first examination. Patients with haemorrhagic diseases or coagulation disorders were excluded from staging by EBUS-TBNA. Noninvasive examinations previous to mediastinal sampling included CT scan of the lung, mediastinum and upper abdomen using multidetector-row spiral CT scanner and PET or PET/CT scan. Nodes in the mediastinum were considered abnormal when their short-axis diameter was >10 mm, and when they had an absolute maximum standardized uptake value (SUV_{max}) of ≥ 4.5 , and/or a ≥ 0.5 ratio of the SUV_{max} of the mediastinal lymph node to the SUV_{max} of the primary tumour [1]. Operability was assessed by physical examination, blood tests and pulmonary function tests, and patients considered physically unfit for surgery were excluded from the study. Patients with an EBUS-TBNA procedure negative for malignancy in the mediastinum were staged by cervical mediastinoscopy when their PET scan showed the mediastinum to be hypermetabolic. Therapeutic surgery with nodal dissection was performed after these staging techniques and was considered the gold standard for the

present study [7]. The research protocol was approved by the reference regional ethics committee for the project (Institut de Recerca en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, reference: FIS PS09/01612) and by the local ethics committees of all participating centres. Written informed consent was obtained from all participating patients.

Endobronchial ultrasound-guided needle aspiration

EBUS was performed in an outpatient setting using a flexible bronchoscope (BFUC180F, Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japan) with a distal probe capable of producing linear parallel scans of the mediastinal and peribronchial tissues and a working channel suited for the performance of TBNA under direct ultrasound guidance. Local anaesthesia and sedation were achieved using topical lidocaine spray and intravenous midazolam, propofol and/or fentanyl in accordance with standard recommendations [8]. Mediastinal and lobar nodes with a short-axis diameter of 5 mm or more identified during the procedure were targeted under direct ultrasound visualization with a 22-gauge cytology needle specially designed for EBUS-TBNA (NA-201SX-4022, Olympus Optical Co., Ltd). The needle was guided beyond the bronchoscope channel and then pushed forwards from the sheath and inserted into the tracheal or bronchial wall under ultrasound guidance. Once the needle tip was inside the target, negative pressure was maintained with a syringe at the proximal end of the catheter while the needle was pushed forth and back, releasing the suction when removed from the target structure. Samples were labelled according to whether they had been extracted from a normal node, showing lymphocytic cells and no neoplastic cells, or from a metastatic node, with groups of neoplastic cells. Aspirates containing only bronchial or blood cells, non-diagnostic atypical cells or insufficient material were considered inadequate. Every identified node was sampled three times, unless rapid on-site evaluation performed by a pathologist during the procedure confirmed the adequacy of the sample after the first or the second aspiration [9, 10].

Pathology

The aspirated material in the needle was recovered and the specimens were placed on slides and fixed with 95% ethanol. The slides were stained for 1 min with haematoxylin when rapid on-site evaluation was performed during the procedure. Papanicolaou staining with orange A and eosin was done later in the pathology laboratory. The cytologist classified satisfactory nodal samples as 'normal tissue negative for malignancy' when the sample contained 40 lymphocytes per high-power field in cellular areas of the smear and/or clusters of pigmented macrophages and no neoplastic cells, or as 'metastatic' when recognizable groups of malignant cells were present [11]. Nodes containing only isolated dysplastic, bronchial or blood cells were considered as non-representative of the targeted structure, and were classified as inadequate. Cell blocks were obtained and processed from the specimens recovered whenever extra material was available after the preparation of a minimum of four slides.

Surgical staging

Patients with negative EBUS-TBNA underwent cervical mediastinoscopy when their PET scan showed the mediastinum to be

abnormal. Cervical mediastinoscopy was performed based on the recommendations of the European Society of Thoracic Surgeons and included station 4R, 4L and 7 samplings regardless of nodal size [1]. Nodal dissection was performed in patients undergoing therapeutic thoracotomy following the recommendations of the Bronchogenic Carcinoma Cooperative Group of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery [12].

Statistical analysis

Data were entered into a database and analysed using SPSS software, version 18.0 [Chicago, IL, USA]. Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies, continuous variables as means and standard deviations (SDs), and non-normally distributed data as medians and interquartile ranges (IQR). Patients with an EBUS-TBNA procedure attaining satisfactory sampling of at least one mediastinal station were included in the analysis, and false-negative EBUS-TBNA results were calculated using nodal dissection as the gold standard, except in patients with cervical mediastinoscopy showing mediastinal malignancy. The number of mediastinal stations satisfactorily sampled by EBUS-TBNA was calculated, and related to false-negative figures, repeating this analysis for false-negative results in mediastinal stations reachable by EBUS-TBNA, after the exclusion of false-negative results found in non-reachable stations (two-sided χ^2 test). The frequency of false-negative results in the mediastinum was similarly calculated for the non-reachable stations, and related to the number of mediastinal stations satisfactorily sampled (two-sided χ^2), assessing also the relationship between the appearance of false-negative results in these out-of-reach stations and the localization of the tumour in the lung (Fisher's exact test).

Firstly, as the main objective, the extensiveness of EBUS-TBNA sampling of mediastinal stations (2R, 2L, 4R, 4L and 7), measured as the number of stations with a minimum of one satisfactorily sampled node (sample containing adequate cytological material) was calculated by bivariate logistic regression as a procedure-related determinant of false-negative results. Secondly, tumour determinants of false-negative results (size, tumour location, histology and mediastinal extension according to CT and/or PET) were similarly calculated. All procedure- and tumour-related determinants of false-negative results with a bivariate association ($P < 0.10$) were included in a multivariate logistic model, including the centre as a covariate, to identify factors significantly associated with false-negative results in stations reachable and non-reachable by EBUS-TBNA. Results were expressed as crude and adjusted odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CI). A P value of ≤ 0.05 was reported as statistically significant for all statistical tests.

RESULTS

Participating hospitals identified 181 patients with operable NSCLC. Sixteen of them were excluded for further analysis due to inadequate sampling of all EBUS-TBNA targeted nodes. One hundred and sixty-five patients with an EBUS-TBNA procedure showing normal nodes negative for malignancy in at least one mediastinal station were included in the study, 69 of them (41.8%) with enlarged nodes on CT and/or high uptake of fluorodeoxyglucose in the mediastinum on CT/PET (Table 1).

EBUS-TBNA obtained adequate samples from a median of 2 (IQR 1–2) targeted mediastinal stations, and achieved adequate

Table 1: Patient characteristics (n = 165)

Age (years), mean (SD)	65.7 (9.2)
Gender (female), n (%)	10 (6.1)
Tumour location, n (%)	
Right upper-middle lobe	81 (49.1)
Right lower lobe	22 (13.3)
Left upper lobe	37 (22.4)
Left lower lobe	25 (15.2)
Tumour size (cm), n (%)	
≤ 3	59 (35.8)
$>3-5$	93 (56.3)
>5	13 (7.9)
Abnormal mediastinum ^a , n (%)	69 (41.8)
Pathology, n (%)	
Squamous-cell carcinoma	72 (43.6)
Adenocarcinoma	78 (47.3)
Non-specified non-small-cell lung cancer	15 (9.1)
Surgical gold standard, n (%)	
Single cervical mediastinoscopy	6 (3.6)
Nodal dissection	138 (83.6)
Cervical mediastinoscopy + nodal dissection	21 (12.7)
Nodal dissection (n = 159)	
Resected nodes, median (IQR)	12 (6–18)
≥ 6 nodes resected, n (%)	127 (79.9)
Dissected mediastinal nodes	
Dissected mediastinal nodes	7 (3–13)
Dissected mediastinal stations (≥ 1 node)	3 (2–3)
Systematic mediastinal dissection ^b , n (%)	86 (54.1)

^aAccording to computed tomography and/or positron emission tomography (mediastinal node >10 mm short axis and/or SUVmax >4.5 and/or ratio SUVmax mediastinal node/SUVmax primary tumour >0.5) [8].
^b ≥ 3 mediastinal stations including a subcarinal station [9].

sampling of three mediastinal stations in 41 patients (24.8%) (Table 2). Pathological staging after surgery identified mediastinal malignancy in 23 of the participants, which were accordingly considered as false-negative EBUS-TBNA procedures (13.9%). Two patients presented with metastasis in more than one mediastinal station (one patient in Stations 4R and 2R and the other patient in Stations 5, 7 and 9). False-negative results were observed mainly in stations reachable by EBUS-TBNA (17 cases, 10.3%), and less often in stations beyond the reach of EBUS-TBNA (7 cases, 4.2%). False-negative results were identified by cervical mediastinoscopy and by nodal dissection in 6 and 17 patients, respectively, nearly half of them in stations beyond the reach of EBUS-TBNA and cervical mediastinoscopy (Table 2).

False-negative results were clearly related to the extensiveness of EBUS-TBNA sampling. Their prevalence was low (2.4%) when EBUS-TBNA attained a satisfactory sampling of three mediastinal stations, but rose above 10% when satisfactory sampling was attained in only one or two stations ($P = 0.043$, χ^2 test) (Table 3). Considering false-negative results in stations reachable and non-reachable by EBUS-TBNA independently, this inverse relationship between the extensiveness of EBUS-TBNA sampling and false-negative results was only found for results obtained in reachable stations ($P = 0.038$, χ^2 test). False-negative results in non-reachable stations were independent of the extensiveness of EBUS-TBNA sampling and were related to tumour location. Six of 7 cases (85.7%) with false-negative results in stations non-reachable by EBUS-TBNA were observed in tumours in the left lung, both in the upper (n = 2) and the lower lobe (n = 4) (Fig. 1). The difference

Table 2: EBUS-TBNA (n = 165)

Post-surgical staging, n (%)	
N0	126 (76.4)
N1	16 (9.7)
N2 unilevel	21 (12.7)
N2 multilevel	2 (1.2)
False-negative N2, n (%)	23 (13.9)
Station with a false-negative N2 result, n ^a	
Station reachable by EBUS	17
2R	1
4R	8
7	9
Station non-reachable by EBUS	7
5	4
9	4
EBUS laterotracheal stations sampling (right, left and subcarinal) ^b	
Laterotracheal stations with representative samples, median (IQR)	2 (1-2)
Representative sampling of three mediastinal stations, n (%)	41 (24.8)
Representative sampling of two ipsilateral mediastinal stations, n (%)	45 (27.3)
Representative sampling of one ipsilateral mediastinal station, n (%)	79 (47.9)

^aMultilevel malignancy in mediastinal nodes in 2 patients (one patient with Stations 2R and 4R involved, the other with Stations 5, 7 and 9 involved).

^bRight laterotracheal = 2R and/or 4R, left laterotracheal = 2L and/or 4L.

Table 3: False-negative results according to EBUS-TBNA sampling and representativeness

	False-negative results in mediastinal stations			P-value
	Number of mediastinal stations with adequate samples			
n	3	2 Ipsilateral	1 Ipsilateral	
False negative	41	45	79	-
In all stations	1 (2.4)	7 (15.6)	15 (19.0)	0.043
In reachable stations	0 (0)	7 (15.6)	10 (12.7)	0.038
In non-reachable stations	1 (2.4)	0 (0)	6 (7.6)	0.105

with respect to right-sided tumours was statistically significant (P = 0.012, Fisher's exact test).

The assessment of determinants of false-negative results in NSCLC staging by EBUS-TBNA in a multivariate model adjusted for centre confirmed the presence of different patterns for stations reachable and unreachable by EBUS-TBNA. Statistically significant risk factors for false-negative results in stations reachable by EBUS-TBNA were an abnormal mediastinum on CT/PET (OR 7.77; 95% CI 2.19-27.51, P = 0.001) and the extensiveness of satisfactory sampling of mediastinal stations (OR 0.37, 95% CI 0.16-0.89, P = 0.026). However, in non-reachable nodes, these determinants were not associated with false-negative results; in this case, the location of the tumour was the only criterion, with a higher risk in left-sided tumours (OR 10.11, 95% CI 1.17-87.52, P = 0.036) (Table 4).

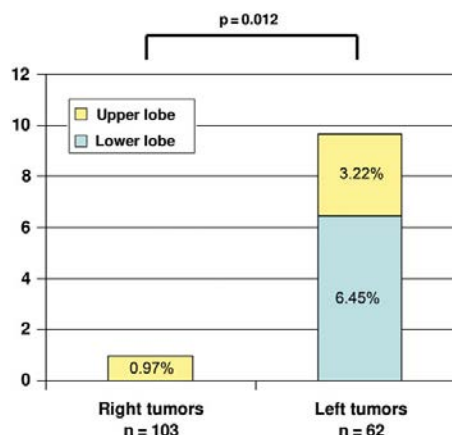


Figure 1: Prevalence of false-negative results in nodes out of reach of EBUS-TBNA according to the location of the primary tumour in the lung (P = 0.012).

DISCUSSION

In our study, false-negative EBUS-TBNA results for mediastinal staging were observed in nearly 15% of patients. Most false negatives were obtained in stations reachable by the technique. EBUS-TBNA obtained satisfactory samples from three mediastinal stations in a quarter of the patients, who showed a prevalence of false-negative results below 3%. False negatives in stations reachable by EBUS-TBNA were clearly related to the extensiveness of sampling, and rose above 10% when nodal sampling obtained satisfactory samples from fewer than three mediastinal stations. This relationship between the extensiveness of EBUS-TBNA sampling and false-negative results was not found in stations beyond the reach of EBUS-TBNA, where the only factor influencing the frequency of false-negative results was the location of the tumour in the left lung. These determinants of false-negative results in stations reachable and unreachable by EBUS-TBNA were confirmed in the multivariate analysis.

We found that EBUS-TBNA achieves satisfactory sampling of three mediastinal stations in one-quarter of patients, and that when this extensiveness is attained; the prevalence of false-negative results is below 5%. Minimally invasive staging by EBUS-TBNA is now a standard approach for NSCLC; however, no requirements for guaranteeing a low frequency of false-negative results have been defined, and the regular use of additional staging procedures before therapeutic surgery after a negative EBUS-TBNA is recommended in current guidelines [6]. Quality standards for cervical mediastinoscopy require that the procedure should achieve sampling of, at least, both lower paratracheal and subcarinal stations (4R, 4L and 7) in order to be considered representative [1], and a similar approach has been proposed for EBUS-TBNA [13, 14]. Our results support the use of this quality criterion in EBUS-TBNA sampling. We found that the prevalence of false negatives surpasses 10% when sampling is satisfactory in only one or two mediastinal stations, thus confirming the need for additional staging procedures in this situation. A number of studies have assessed the potential benefit of adding a mediastinoscopy after a negative EBUS-TBNA, most of them retrospective [15-17].

Table 4: Risk factors for false-negative N2

Characteristics	Reachable nodes				Non-reachable nodes			
	Univariate		Multivariate		Univariate		Multivariate	
	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)	P-value
Age	1.02 (0.96–1.08)	0.453	–	–	1.01 (0.93–1.10)	0.866	–	–
Gender (female versus male)	0.96 (0.11–8.12)	0.974	–	–	2.76 (0.30–25.44)	0.370	–	–
Tumour size (>3 vs ≤3 cm)	1.92 (0.60–6.19)	0.273	–	–	0.73 (0.16–3.39)	0.690	–	–
Tumour localization (left versus right)	0.66 (0.22–1.99)	0.465	–	–	10.93 (1.28–93.07)	0.029	10.11 (1.17–87.52)	0.036
Abnormal mediastinal nodes ^a	5.34 (1.66–17.18)	0.005	7.77 (2.19–27.51)	0.001	0.54 (0.10–2.89)	0.474	–	–
Pathology (adenocarcinoma versus other NSCLC)	1.02 (0.37–2.78)	0.973	–	–	1.55 (0.34–7.16)	0.573	–	–
Number of stations sampled and representative (3 vs ≤2)	0.50 (0.24–1.05)	0.067	0.37 (0.16–0.89)	0.026	0.37 (0.10–1.39)	0.141	–	–

^aEnlarged on CT scan and/or hypermetabolic on PET/CT mediastinal nodes.

Clinical trials focusing on this issue have concluded that combining EBUS-TBNA and mediastinoscopy resulted in an improvement of the diagnostic yield that is cost-effective [18–21]. Our results support this approach, since the addition of cervical mediastinoscopy after an unsatisfactory EBUS-TBNA in patients with an abnormal mediastinum on the PET scan significantly reduced false-negative results in reachable nodes in our study to nearly 5%.

False-negative results in stations out of reach of EBUS-TBNA had prevalence rates below 5% in our study and, as expected, did not depend on the extensiveness of EBUS-TBNA sampling. In contrast, the false-negative results in these stations were clearly associated with location of the tumour in the left lung. Most of our false-negative results in EBUS-TBNA non-reachable stations 3, 5, 6, 8 and 9 appeared in patients with upper and lower left tumours, suggesting that additional staging procedures are needed in these patients regardless of tumour size and type. Our results are in agreement with several studies that have demonstrated an increase in the diagnostic yield of EBUS-TBNA when used in combination with endoscopic ultrasound-guided needle aspiration, which is able to target malignant nodes in Stations 5, 8 and 9 [19, 20, 22, 23]. Similar results have been reported with the sampling of paraoesophageal stations by means of EBUS-TBNA, locating the device in the oesophagus [24, 25]. Our results suggest that this approach may be especially important in left-sided tumours.

Apart from variables related to the procedure and the tumour, certain other factors can increase the risk of nodal metastases in the mediastinum after a negative EBUS-TBNA. In our study, patients with abnormal mediastinum on either CT or PET scan were more likely to present false-negative results and, in this situation, complementary staging techniques will be needed after a negative EBUS-TBNA procedure before surgery.

All studies including a combination of staging methods have shown better results with a combined approach compared to each single method [19, 20] but a rationale for NSCLC staging needs to be established in order to avoid unnecessary explorations. In this setting, it is essential to identify which subgroups of patients would benefit from additional staging procedures before surgery, and which techniques will be most useful for each patient. Our results support the use of additional procedures like cervical mediastinoscopy in patients with a negative EBUS-TBNA procedure that has not attained a satisfactory sampling of three mediastinal stations, and favour the use of complementary staging techniques as endoscopic ultrasound to reach paraoesophageal

and perivascular stations in left-sided tumours. This approach, if confirmed in additional studies, may simplify the staging procedure in lung cancer patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors want to thank Laia Setó, Manuel Núñez and Maribel Botana who helped in acquiring data.

Funding

This work was supported by the Spanish government (grant number: FIS PS09/01612, Programa Corporativo de Investigación en Cáncer de Pulmón del Ciber de Enfermedades Respiratorias–Ciberes) and the Spanish Society of Pulmonology (Programa Integrado de Investigación en Oncología de SEPAR).

Conflict of interest: none declared.

REFERENCES

- [1] De Leyn P, Lardinois D, Van Shil PE, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M et al. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:1–8.
- [2] Herth FJF, 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;133:887–91.
- [3] Sanz-Santos J, Andreo F, Serra P, Llatjós M, Castellà E, Astudillo J et al. False positive endobronchial ultrasound-guided real-time transbronchial needle aspiration secondary to bronchial carcinoma in situ at the point of puncture: a case report. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;7:74.
- [4] Varela-Lema L, Fernández-Villar A, Ruano-Ravina A. Effectiveness and safety of endobronchial ultrasound-transbronchial needle aspiration: a systematic review. *Eur Respir J* 2009;33:1156–64.
- [5] Adams K, Shah PL, Edmonds L, Lim E. Test performance of endobronchial ultrasound and transbronchial needle aspiration biopsy for mediastinal staging in patients with lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Thorax* 2009;64:757–62.
- [6] Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis M, Gould MK, Tanoue LT 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:e211–50.

- [7] Rami-Porta R, Wittekind C, Goldstraw P. Complete resection in lung cancer surgery: proposed definition. *Lung Cancer* 2005;49:25–33.
- [8] Du Rand JA, Blaikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S. On behalf of the British Thoracic Society Bronchoscopy Guideline Group. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults. *Thorax* 2013;68:11–144.
- [9] Lee HS, Lee GK, Lee HS, Kim MS, Lee JM, Kim HK et al. Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal staging of nonsmall cell lung cancer. How many aspirations per target lymph node station? *Chest* 2008;134:368–74.
- [10] Nayak A, Sugrue C, Koenig S, Wasserman PG, Hoda S, Morgenstern NJ. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspirate (EBUS-TBNA): a proposal for on-site adequacy criteria. *Diagn Cytopathol* 2010;40:128–37.
- [11] Alsharif M, Andrade RS, Groth S, Stelow EB, Pambuccian SE. 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* 2008;130:434–43.
- [12] GCCB-S (Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogenico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica). Intraoperative lymph node staging in bronchogenic carcinoma surgery. Consensus report. *Arch Bronconeumol* 2001;37:495–503.
- [13] Block MI. Endobronchial ultrasound for lung cancer staging: how many stations should be sampled? *Ann Thorac Surg* 2010;89:1582–7.
- [14] Sanz-Santos J, Andreo F, Castellà E, Llatjós M, de Castro PL, Astudillo J et al. Representativeness of nodal sampling with endobronchial ultrasonography in non-small-cell lung cancer staging. *Ultrasound Med Biol* 2012;1:62–8.
- [15] Verhagen AF, Schuurbiens OCJ, Looijen-Salamon MG, Van der Heide SM, Van Swieten HA, Van der Heijden EHF. Mediastinal staging in daily practice: endosonography, followed by cervical mediastinoscopy. Do we really need both? *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2013;17:823–8.
- [16] Cerfolio RJ, Bryant AS, Eloubeidi MA, Frederick PA, Minnich DJ, Harbour KC et al. The true false negative rates of esophageal and endobronchial ultrasound in the staging of mediastinal lymph nodes in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2010;90:427–34.
- [17] Defranchi SA, Edell E, Daniels CE, Prakash UBS, Seanson KL, Utz JP et al. Mediastinoscopy in patients with lung cancer and negative endobronchial ultrasound guided needle aspiration. *Ann Thorac Surg* 2010;90:1753–8.
- [18] Ernst A, Anantham D, Eberhardt R, Krasnik M, Herth FJF. Diagnosis of mediastinal adenopathy. Real-time endobronchial ultrasound guided needle aspiration versus mediastinoscopy. *J Thorac Oncol* 2008;3:577–82.
- [19] Annema JT, van Meerbeeck JP, Rintoul RC, Dooms C, Descheppe E, Dekkers OM et al. Mediastinoscopy vs endosonography for mediastinal nodal staging of lung cancer: a randomized trial. *JAMA* 2010;304:2245–52.
- [20] Szlubowski A, Zielinski M, Soja J, Annema JT, Sosnicki W, Jakubiak M et al. A combined approach of endobronchial and endoscopic ultrasound-guided needle aspiration in the radiologically normal mediastinum in non-small-cell lung cancer staging—a prospective trial. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:1175–9.
- [21] Sharples LD, Jackson C, Wheaton E, Griffith G, Annema JT, Dooms C et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of endobronchial and endoscopic ultrasound relative to surgical staging in potentially resectable lung cancer: results from the ASTER randomized trial. *Health Technol Assess* 2012;16:1–75. iii–iv.
- [22] Vilmann P, Krasnik M, Larsen SS, Jacobsen GK, Clementsen P. Transesophageal endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration (EUS-FNA) and endobronchial ultrasound-guided transbronchial fine-needle aspiration (EBUS-TBNA) biopsy: a combined approach in the evaluation of mediastinal lesions. *Endoscopy* 2005;37:833–9.
- [23] Rintoul RC, Skwarski KM, Murchinson JT, Wallace WA, Walker WS, Penman ID. Endobronchial and endoscopic ultrasound-guided real-time fine-needle aspiration for mediastinal staging. *Eur Respir J* 2005;25:416–21.
- [24] Hwangbo B, Lee GK, Lee HS, Lim KY, Lee SH, Kim HY et al. Transbronchial and transesophageal fine-needle aspiration using an ultrasound bronchoscope in mediastinal staging of potentially operable lung cancer. *Chest* 2010;138:795–802.
- [25] Herth FJF, Krasnik M, Kahn N, Eberhardt R, Ernst A. Combined endoscopic-endobronchial ultrasound-guided fine-needle aspiration of mediastinal lymph nodes through a single bronchoscope in 150 patients with suspected lung cancer. *Chest* 2010;138:790–4.

THORACIC

4.3. Tercer estudi

Assessment of methylation status of locoregional lymph nodes in lung cancer using EBUS-NA.

Laura Millares, **Mireia Serra**, Felipe Andreo, Jose Sanz-Santos J, Conchita Montón, Carles Grimau, Miguel Gallego, Laia Setó, Neus Combalia, Mariona LLañós, Rosa Escoda, Eva Castellà, Edurad Monsó.

Article publicat a Clinical and Experimental Metastasis

Clin Exp Metastasis.2015; (7): 637-46. doi: 10.1007/s10585-015-9733-2

Antecedent. La hipermetilació de la zona promotora dels gens supressors de tumors està associada amb la carcinogènesi del càncer de pulmó. L'ecobroncoscòpia amb punció-aspiració transbronquial (EBUS-TBNA) és un mètode semiinvasiu que permet obtenir blocs cel·lulars dels ganglis que es poden utilitzar per anàlisi epigenètic. L'objectiu de l'estudi és determinar si l'EBUS-TBNA és una bona tècnica per obtenir material per estudi epigenètic i establir la relació entre l'estat de metilació dels gens p16, DAPK, RASSF1a, APC i CDH13 en els ganglis obtinguts per EBUS-TBNA, l'estadificació i el pronòstic de la malaltia.

Mètode: Es realitzà un estudi que analitzà l'estat de metilació dels gens DAPK, p16, RASSF1a, APC i CDH13 obtinguts per bloc cel·lular mitjançant EBUS-TBNA en pacients amb càncer de pulmó. S'evaluà la relació de la metilació d'aquests gens amb l'estadificació i la supervivència de la malaltia.

Resultats: Es van incloure 85 pacients amb edat mitjana de 67 (DE 8) anys. L'EBUS-TBNA va permetre diagnosticar invasió mediastínica en 63 casos (74%). Es van detectar 10 casos de pacients afectats de càncer de pulmó cèl·lula petita (CPCP) i 53 casos de càncer de pulmó no cèl·lula petita (CPNCP). En 43 ganglis afectats per cèl·lules neoplàsiques (67%) es va observar metilació de ≥ 1 gen. La metilació de RASSF1a es va associar amb càncer de pulmó cèl·lula petita (CPCP). Per altra banda, la metilació de APC i/o p16 es va relacionar amb estadificació més avançada en pacients amb CPNCP així com pitjor supervivència als sis mesos ($p=0.019$, test log-Rank), que es va mantenir després d'ajustar per edat i subtipus histològic de tumor (HR=6.95%, 95% IC [1.8-19.5], $p=0.003$, regressió Cox).

Conclusions: L'EBUS-TBNA amb bloc cel·lular és una bona tècnica per obtenir material per anàlisi epigenètic i permet identificar patrons de metilació associats a pitjor supervivència. La metilació dels gens APC i p16 en pacients amb CPNCP està associada amb estadificació avançada i pitjor supervivència als sis mesos.

DISCUSSIÓ

5. DISCUSSIÓ

El CP no només és la neoplàsia més prevalent sinó també la primera causa de mort per càncer a nivell mundial. Així, en aquest tipus de càncer és especialment important no només fer un diagnòstic precoç, sinó també poder fer una estadificació correcta i minuciosa per obtenir la informació necessària sobre l'extensió de la malaltia, tan a nivell local com a distància, i així indicar el tractament correcte i estimar el seu pronòstic.

L'abordatge dels ganglis del mediastí per confirmar si presenta disseminació de la malaltia és crucial quan no hi ha afectació a distància, i és el factor pronòstic més important. Actualment, les tècniques no invasives i semiinvasives són una eina essencial pel diagnòstic i l'estadificació mitjançant la classificació TNM. A més, en els últims anys, s'ha començat a investigar molt en l'obtenció de marcadors predictius moleculars que ens aportin informació del pronòstic i permetin fer un tractament més dirigit en estadiatges avançats.

A continuació es discuteixen els resultats dels tres estudis per separat.

5.1. Predictors de malignitat mediastínica a PET en càncer de pulmó.

La PET és una tècnica no invasiva que permet detectar mitjançant un radiofàrmac marcat amb positrons l'activitat de les cèl·lules neoplàsiques i per tant, proporciona informació metabòlica essencial dels territoris ganglionars. A principis del 2001, es va descriure la PET-TAC que integra la informació metabòlica de la PET amb la informació anatòmica que proporciona la TAC. La tècnica té falsos positius (20-24%)

en aquells processos d'increment de la glicòlisis (malalties inflamatòries, antracosis, infeccions) i tampoc és exempta de falsos negatius. La interpretació de la prova es realitza de manera subjectiva amb una anàlisi visual i semiquantitativa determinant el valor estandarditzat de captació màxima (SUVmax) que es defineix pel quocient entre la concentració del radiofàrmac en el tumor i la dosis injectada dividida pel pes corporal.

El SUVmax dels territoris ganglionars és un bon predictor de disseminació mediastínica, i s'han utilitzat per això punts de tall entre 2.5 a 5.3 (22, 23). En el nostre treball multicèntric, vam determinar que el millor punt de tall del SUVmax del mediastí com a predictor era 4, i amb ell s'assolia una precisió i VPN superior al 70% per a la identificació de metàstasis ganglionars. Tanmateix, el SUVmax del mediastí presentava variabilitat entre els diversos centres adscrits a l'estudi.

Estudis previs han demostrat que la variabilitat entre centres és al voltant del 10-15% i es produeix per dos tipus de factors, els biològics i els tecnològics. Entre els biològics cal mencionar els nivells de glucosa i insulina en sang, el percentatge de teixit adipós, el moviment respiratori o l'interval de temps entre l'administració del radiofàrmac i l'obtenció de la imatge. Per altra banda entre els tecnològics cal citar la variabilitat entre els escàners, els paràmetres de reconstrucció o els errors de calibració entre altres (25).

Per tal d'homogeneïtzar resultats entre centres i per tant poder comparar resultats, alguns autors (26-28) proposen determinar la ratio entre SUVmax mediastí i el SUVmax del tumor. En la nostra sèrie, un quocient SUVmax mediastí/SUVmax tumor superior a 0.4 era predictor d'invasió neoplàsica (OR 6.62, 95% IC 2.98-14.69) amb una sensibilitat del 70.8% i precisió del 71.9%, similar a l'obtinguda quan el SUVmax

mediastí era superior a 4 (OR 10.68, 95% IC 2.98-14.69). La utilització d'aquesta primera variable va suprimir l'efecte de variabilitat intercentre, i per tant, la fa especialment recomanable en estudis multicèntrics. Els resultats estan en la línia dels exposats prèviament pel grup de Cerfolio, i posteriorment per Iskender (28), amb punts de talls proposats de 0.56 i 0.49, respectivament. En el nostre treball, la captació de més d'un territori al mediastí va ser predictor d'afectació mediastínica però tenia menys potència que els paràmetres descrits anteriorment. Cal mencionar que donat que els resultats del VPN i la precisió de la tècnica no van ser superiors al 80% es precisa confirmació histològica, tal i com està descrit en publicacions prèvies sobre el tema.

En el nostre estudi, l'EBUS-TBNA va ser la tècnica semiinvasiva més utilitzada pel mostreig mediastínic. La tècnica va ser positiva en més d'un 10% dels casos en que el PET no mostrava captació en el mediastí. La sensibilitat i el VPN del EBUS-TBNA no van ser superiors al 80% en el nostre estudi i per tant, els resultats fan recomanable realitzar altres proves complementàries com l' EUS-NA o la medistinoscòpia per a completar l'estadificació si l'EBUS-TBNA és negatiu. En la nostra experiència, únicament en els tumors de menys de 3 cm de diàmetre i en els que la PET presenti una captació per sota del punt de tall establert es pot prescindir de realitzar altres tècniques per l'estadificació, ja que aquestes no augmenten la sensibilitat ni el VPN prequirúrgic en aquesta situació, resultats en la línia del recomanat en les guies clíniques d'estaficació.

5.2. Determinants de resultats falsos negatius en el CPNCP estadificats per EBUS-TBNA

Les tècniques semiinvasives són les tècniques d'elecció inicials que permeten la presa de mostres citològiques en cas de sospita d'afectació mediastínica. L'EBUS-TBNA lineal accedeix als mateixos territoris ganglionars que la mediastinoscòpia (2R, 2L, 4R, 4L i 7) i també en regions hiliars i interlobars (10R, 10L, 11R, 11L). Si la prova confirma disseminació mediastínica no cal realitzar més tècniques ja que es pot considerar exempta de falsos positius. No obstant, en cas de que la prova sigui negativa i hi hagi sospita de N2 oculta, donat que hi ha variabilitat entre estudis del VPN (60%-99%), les guies recomanen realitzar una mediastinoscòpia atès que, continua sent el *gold-standard*.

L'EBUS-TBNA lineal es va descriure a principis del 2002 i els primers estudis que van evaluar els falsos negatius de la tècnica donaren xifres que oscil·làven entre el 24 i 28% (50, 51). En el nostre treball multicèntric, es van evaluar els falsos negatius de N2 en pacients amb càncer de pulmó estadificats com a N0/N1 per EBUS-TBNA, i en tots ells es va realitzar confirmació histològica quirúrgica. Es va obtenir una proporció de falsos negatius del 13.9%. Aquest resultat, disminuïa fins al 10.3%, quan s'evaluaven únicament els falsos negatius en els territoris accessibles per l'EBUS-TBNA. Aquestes conclusions són comparables amb alguns treballs recents (20).

Només en un 24.8% dels pacients es va aconseguir fer un mostreig ganglionar equivalent al mínim requerit per la mediastinoscòpia, reduint-se en aquests casos els

falsos negatius fins al 3%. En aquells pacients en que només es puncionaven entre 1 o 2 territoris, els falsos negatius eren superiors al 10%.

En el moment de realitzar el segon estudi objecte d'aquesta tesi, la guia de l' ACCP i la ESTS establien com a requeriment mínim en la mediastinoscòpia l'avaluació i la dissecció sistematitzada de les estacions ganglionars paratraqueals i subcarinal. No obstant, no existia un clar consens en l'EBUS-TBNA. Tanmateix, alguns estudis ja apuntaven que calia abordar les mateixes estacions que en la mediastinoscòpia per tal de millorar el VPN (52, 53).

Els nostres resultats reforcen la importància de fer un abordatge sistemàtic de les estacions mediastíniques (4R, 4L i 7) per tal de minimitzar els falsos negatius. Posteriorment al nostre treball, al 2014 es va realitzar la revisió de les guies del 2007, on ja s'estableix que la tècnica ha d'explorar i puncionar els ganglis amb un diàmetre menor ≥ 5 mm com a mínim en les estacions mediastíniques 2, 4 i 7, obtenint així un VPN $> 90\%$ (20).

En la nostra sèrie de pacients, els falsos negatius en les zones no abordables per EBUS-TBNA van ser inferiors al 5% i estaven relacionats amb la localització del tumor en el pulmó esquerre, així doncs, seria recomanable realitzar una tècnica complementària per abordar el mediastí quan l'EBUS-TBNA és negatiu en aquests casos.

Està descrit en la literatura que els tumors en el bronqui lobar superior esquerre metastatitzen a la finestra aortopulmonar (regió 5 i 6), i per tant, requereixen de tècniques addicionals (54, 55). L'EUS-NA permet accedir a les estacions 5, 8 i 9 que ni l'EBUS-TBNA ni la mediastinoscòpia poden abordar (20, 35, 44). La combinació de

EBUS-TBNA i EUS-NA ha demostrat un augment de la sensibilitat i especificitat del 86% i 100% respectivament en un metaanàlisi basat en 8 estudis (56). Així, si es combinen les tècniques el VPN oscil·la entre 93-96% (47, 57). Tanmateix, els resultats dels estudis són variables i no s'han realitzat estudis aleatoritzats i per tant les guies recomanen iniciar l'estadificació amb tècniques semiinvasives i en cas de resultat negatiu realitzar una mediastinoscòpia. L'estudi presentat permet discernir que la utilització de tècniques addicionals d'estadificació és especialment important en els tumors esquerres, i podria ser innecessari en els tumors drets explorats amb estadificació sistemàtica per EBUS-TBNA.

5.3. Estat de metilació mitjançant EBUS-TBNA dels ganglis locorregionals.

Els canvis epigenètics són modificacions en l'expressió dels gens que no s'acompanyen d'alteracions en la seqüència del DNA. Aquests mecanismes estan relacionats amb la desregulació d'oncogens, gens supressors de tumors i gens reparadors del DNA. El mecanisme epigenètic més estudiat és la metilació del DNA, que es produeix en les illes CpG que estan localitzades en les regions promotores dels gens reguladors d'expressió relacionats amb la carcinogènesi. S'observa entre el 15 i 80% del CP, amb diversos gens implicats.

L'EBUS-TBNA, que permet obtenir bloc cel·lular del material dels ganglis mediastínic punccionats, va ser en més del 50% de casos la única tècnica disponible per realitzar l'anàlisi epigenètic en el nostre estudi. La realització de bloc cel·lular ja s'ha demostrat en estudis previs que és una tècnica bona per realitzar estudis moleculars per detectar mutacions, no inferior a la mediastinoscòpia o la biòpsia mitjançant la broncoscòpia

(57). En el nostra experiència, la metilació d'un o més gens es va observar en més de 60% de les mostres obtingudes, fins i tot en dos ganglis en que l'EBUS-TBNA va ser negatiu, casos en que es pot assumir que hi havia disseminació de cèl·lules de carcinoma al gangli, que no va ser objectivada en l'examen citològic. Els resultats obtinguts, apunten que la tècnica endoscòpica permet obtenir bon material per estudis moleculars sobretot en aquells pacients en que es descarta realitzar proves invasives.

La metilació del gen RASSF1a es va associar en més del 90% de les mostres a carcinoma cèl·lula petita, tal i com està descrit en publicacions prèvies. Finalment, hi ha diversos estudis descrits en la literatura que mostren que la metilació de gens està associada a pitjor supervivència (59-62). En el nostre treball, la metilació dels gens APC i p16 es va detectar en estadis més avançats de la malaltia (estadi IIIB-IV) i va estar relacionada amb una pitjor supervivència als sis mesos (HR=6, IC95% [1.8-19.5], p=0.003).

En conclusió la present tesi ajuda respondre algunes preguntes sobre la importància de poder fer un estudi més acurat de les tècniques no invasives i semiinvasives que permetin millorar el maneig de malalts amb càncer de pulmó. En la PET el SUVmax mediastí/SUVmax tumor primari és un un paràmetre molt valuós quan és superior a 0.4 ja que no només és predictor d'afectació tumoral al mediastí sinó que també ens permet comparar resultats entre altres centres. En quan a l'EBUS-TBNA, és molt important fer un mostreig adequat de les estacions mediastíniques laterotraqueals i subcarinal per garantir la qualitat de l'exploració, i, en aquells tumors primaris en localització al pulmó esquerre, valorar realitzar EUS-NA i/o mediastinoscòpia com a tècnica complementària per tal de minimitzar falsos negatius en l'estadificació del mediastí. Finalment,

mitjançant l'EBUS-TBNA es pot obtenir suficient material dels ganglis mediastínic per poder valorar si presenten metilació dels gens APC i p16, el que indicaria pitjor pronòstic de la malaltia.

CONCLUSIONS

6. CONCLUSIONS

- El SUVmax del mediastí > 4 i el SUVmax mediastí/SUVmax tumor > 0.4 són predictors d'afectació tumoral mediastínica en la PET. El SUVmax mediastí/SUVmax tumor és el paràmetre que ens permet comparar resultats entre centres. Independentment del resultat de la PET, la sensibilitat i el VPN de l'EBUS-TBNA són inferiors a 90% i per tant, és necessari realitzar altres proves complementàries si el resultat de l'EBUS-TBNA és negatiu, a excepció de tumors de $< 3\text{cm}$ i SUVmax tumor/SUVmax mediastí < 0.4 .
- Els falsos negatius en l'EBUS-TBNA s'observen en un 15% però disminueixen fins el 3% quan en els territoris accessibles per la tècnica es realitza un mostreig adequat de les dues regions laterocervicals baixes i de la regió subcarinal. La característica tumoral relacionada amb els falsos negatius de l'EBUS-TBNA en zones no accessibles per la tècnica és la localització del tumor en el pulmó esquerre.
- La metilació dels gens APC i p16 en les mostres obtingudes per EBUS-TBNA en pacients amb CPNCP està associat amb estadis avançats i pitjor supervivència als sis mesos.

LÍNIÉS DE FUTUR

7. LÍNIES DE FUTUR

La tesi doctoral demostra la importància dels estudis no invasius i semiinvasius per estadificar correctament el CP a fi d'evitar en molts casos procediments més invasius amb elevats costos i morbiditats associades.

Els resultats obtinguts impliquen que en la PET utilitzar el paràmetre SUVmax mediastí/SUVmax tumor enlloc del SUVmax del mediastí permet comparar resultats entre centres. No obstant, s'ha de continuar en la recerca de nous paràmetres en la tècnica, que obtinguin millor precisió diagnòstica per tal de poder prescindir de tècniques semiinvasives i invasives del mediastí. En el cas de tumors localitzats en el pulmó esquerre, cal plantejar realitzar de manera sistemàtica EBUS-TBNA i EUS-NA per tal de minimitzar els falsos negatius, i avaluar si amb la utilització combinada de les dues tècniques es pot prescindir de la mediastinoscòpia. La implementació de l'anàlisi sistemàtic de la metilació dels gens p16 i APC en les mostres dels ganglis mediastínic patològics obtinguts per EBUS-TBNA té rendibilitat confirmada, i cal veure si permetrà identificar un grup de pacients en els que pot estar indicat la utilització de teràpies específiques, un cop vist que la positivitat d'aquest marcador té mal pronòstic.

L'experiència en l'estudi de metilació de gens, hauria de ser d'utilitat per avaluar nous biomarcadors obtinguts mitjançant EBUS-TBNA que permetin realitzar un tractament oncodirigit més personalitzat.

BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

1. De la Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA. Lung cancer: Epidemiology, Etiology and Prevention. Clin Chest Med. 2011; 32 (4): 605-44.
2. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF et al. The global burden of cancer 2013. JAMA oncol. 2015; 1 (4): 505-27.
3. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer. 2013; 49 (6): 1374-403.
4. International Agency for Research in Cancer (IARC). Research Cancer Statistics Resources. Databases. Globocan 2012.
5. Hernandez J, Andreo F, Cabezas E, Calatayud J, Cilleruelo A, Congregado M et al. Epidemiología del cáncer de pulmón en España. Clínicas Respiratorias SEPAR. Monografía 4.[internet]. Editorial Respira; 2016. Pàgina 1-12. Disponible en: https://issuu.com/separ/docs/monografia_4_cancer_de_pulm_n.
6. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. Int J Cancer. 2002; 97 (1): 72-81.
7. Alberg AJ, Brock MV, Ford JG, Samet JM, Spivack SD. Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of

Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 2013; 143 (Suppl 5): e1S-29S.

8. Spyratos D, Zarogoulidis P, Porpodis K, Tsakiridis K, Machairiotis N, Katsikogiannis N et al. Occupational exposure and lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013; 5 (Suppl 4): S440-5.
9. Dela Cruz Ch, Tanoue L, Matthay R. Lung cancer: epidemiology, etiology and prevention. *Clin Chest Med*. 2011; 32 (4): 605-44.
10. Lissowska J, Foretova L, Dabek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control*. 2010; 21(7): 1091-104.
11. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB 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): 1243-60.
12. Govindan R, Page N, Morgensztern D, Read W, Tierney R, Vlahiotis A et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results data bases. *J Clin Oncol*. 2006; 24 (28): 4539-44.

13. Zheng M. Classification of pathology of lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016; 25(3): 447-68.
14. Travis W. Pathology and Diagnosis of neuroendocrine tumors: lung neuroendocrine. *Thorac. Surg Clin.* 2014; 24 (3) 257-266.
15. Kerr KM. Clinical Relevance of the new IASLC/ERS/ATS adenocarcinoma classification. *J Clin Pathol.* 2013; 66 (10): 832–838.
16. Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer* 2014; 120 (18): 2883-92.
17. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of Malignant Tumours. *J Thorac Oncol* 2007; 2 (89): 694–705.
18. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eight Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest.* 2017; 151 (1): 193-203.
19. 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 (5 Suppl): e211S-e250S.

20. De Leyn P, Doooms C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R et al. Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014; 45 (5): 787-98.
21. Cerfolio RJ, Bryant AS. The role of integrated positron emission tomography-computerized tomography in evaluating and staging patients with non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 19(3): 192-200.
22. Bryant AS, Cerfolio RJ, Klemm KM, Ojha B. Maximum Standard uptake value of mediastinal lymph nodes on integrated FDG-PET-CT predicts pathology in patients with non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2006; 82 (2): 417–22.
23. Hellwig D, Graeter TP, Ukena D, Groeschel A, Sybrecht GW, Schaefers HJ et al. ^{18}F -FDG PET for mediastinal staging of lung cancer: which threshold make sense? *J Nuclear Med*. 2007; 48 (11): 1761–6.
24. Lee BE, Redwine J, Foster C, Abella E, Lown T, Lau D et al. Mediastinoscopy might not be necessary in patients with non-small cell lung cancer with mediastinal lymph nodes having a maximum standardized uptake value of less than 5.3. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008; 135 (3): 615–9.
25. Adams MC, Turkington TG, Wilson JM, Wong T. A systematic review of the factors affecting accuracy of SUV measurements. *Am J Roentgenol*. 2010; 195 (2): 310–320.

26. Cerfolio R, Bryant A. Ratio of the maximum standardized uptake value on FDG-PET of the mediastinal (N2) lymph nodes to the primary tumor may be a universal predictor of nodal malignancy in patients with nonsmall-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2007; 83 (5): 1826–30.
27. Mattes MD, Moshchinsky AB, Ahsanuddin S, Rizk NP, Foster A, Wu AJ et al. Ratio of lymph node to primary tumor SUV on PET/CT accurately predicts nodal malignancy in non-small-cell lung cancer. *Clin lung cancer.* 2015; 16 (6): e253–8.
28. Iskender I, Kadioglu SZ, Kosar A, Atasalihi A, Kir A. Is there any maximum standardised uptake value variation among positron emission and tomography scanners for lung cancer? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2011; 12 (6): 965–969.
29. Liu Y, Tang Y, Xue Z, Yang P, Ma K, Ma G et al. Ratio of lymph node to primary tumor SUVmax multiplied by maximal tumor diameter on positron emission tomography/integrated computed tomography may be a predictor of mediastinal lymph node malignancy in lung cancer. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95 (46): e5457.
30. De Leyn P, Lardinois D, Van Schil PE, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M et al. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007; 32 (1): 1-8.
31. Detterbeck FC, Falen S, Rivera MP, Halle JS, Socinski MA. Seeking a home for a PET, part 2: Defining the appropriate place for positron emission tomography

- imaging in the staging of patients with suspected lung cancer. *Chest*. 2004; 125 (6): 2300-8.
32. Murgu SD. Diagnosing and staging lung cancer involving the mediastinum. *Chest*. 2015; 147 (5): 1401-1412.
 33. Schmidt-Hansen M, Baldwin DR, Hasler E, Zamora J, Abaira V, Roqué I Figuls M. PET-CT for assessing mediastinal lymph node involvement in patients with suspected resectable non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014; 13 (11): CD009519.
 34. Dooms C, Muylle I, Yserbyt J, Ninane V. Endobronchial ultrasound in the management of nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev*. 2013; 22 (128): 169-77.
 35. Stamatis G. Staging of lung cancer: The role of noninvasive, minimally invasive and invasive techniques. *Eur Respir J*. 2015; 46 (2): 521-531.
 36. Villar F, Muguruza I, Belda J, Miguel P, Sánchez J, Barreiro E et al. Recomendaciones SEPAR de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. *Arch Bronconeumol*. 2016; 52 (Supl 1): 2-62.
 37. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. 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): 568-77.

38. 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(8): 1271-7.
39. Vander Heijden EH, Casal RF, Trisolini R, Steinfort 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 (6): 500-17.
40. Yasufuku K, Pierre A, Darling G, de Perrot M, Waddell T, Johnston M 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.
41. Ernst A, Anantham D, Eberhardt R, Krasnik M, Herth FJ. Diagnosis of mediastinal adenopathy-real-time endobrochial ultrasound guided needle aspiration versus mediastinoscopy. *J Thorac Oncol*. 2008; 3 (6): 577-82.
42. Um SW, Kim HK, Jung SH, Han J, Lee KJ, Park HY et al. Endobronchial ultrasound versus mediastinoscopy for mediastinal nodal staging of non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015; 10 (2): 331-7.

43. 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): 757-66.
44. Hegde MD, Liberman M. Mediastinal staging: Endosonography ultrasound lymph node biopsy or mediastinoscopy. *Thorac Surg Clin*. 2016; 26 (3): 243-249.
45. Liberman M, Duranceau A, Grunenwald E et al. Initial experience with a new technique of endoscopic and ultrasonographic access for biopsy of para-aortic (station 6) mediastinal lymph nodes without traversing the aorta. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012; 144 (1): 81-6.
46. Vilman P, Clementsen PF, Colella S, Siemsen M, De Leyn P, Dumonceau J et al. Combined endobronchial and oesophageal 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). *Eur Respir J*. 2015; 46 (1): 40-60.
47. Hwangbo B, Lee GK, Lee HS, Lim KY, Lee SH, Kim HY 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.

48. Ding L, Getz G, Wheeler A, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*. 2008; 455 (7216): 1069-75.
49. Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358(11): 1118-28.
50. Cerfolio R, Bryant AS, Eloubeidi MA, Frederick PA, Minnich DJ, Harbour KC et al. The true false negative rates of esophageal and endobronchial ultrasound in the staging of mediastinal lymph nodes of patients with non-small cell lung cancer. *Annals Thoracic Surgery*. 2010; 90 (2): 427-34.
51. Zhang R, Mietzen C, Krüger M, Wiegmann B, Golpon H, Dettmer S et al. Endobronchial ultrasound guided fine needle aspiration versus transcervical mediastinoscopy in nodal staging of non small cell lung cancer: a prospective comparison study. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2012; 7:51.
52. Sanz-Santos J, Andreo F, Castellà E. Representativeness of nodal sampling with endobronchial ultrasonography in non-small cell lung cancer staging. *Ultrasound Med Biol*. 2012; 38 (1): 62-8.
53. Mark I, Block MD. Endobronchial ultrasound for lung cancer staging: how many stations should be sampled? *Ann Thorac Surg*. 2010; 89 (5): 1582-7.

54. Cerfolio R, Ayesha B. Distribution and likelihood of lymph node metastasis based on the lobar location of nonsmall-cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2006; 81 (6): 1969-73.
55. Rusch V, Crowley J, Ciroux D, Goldstraw P, Im JG et Tsuboi M. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N descriptors in the Forthcoming seventh Edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2 (7): 603-12.
56. Zhang R, Ying K, Shi 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): 1860-7.
57. Liberman M, Sampalis J, Duranceau A, Thiffault V, Hadjeres R, Ferraro P. et al. Endosonographic mediastinal lymph node staging of lung cancer. *Chest* 2014; 146 (2): 389-397.
58. 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 (11): 1438-1444.
59. Gu J, Berman D, Lu C, Wistuba II, Roth JA, Frazier M et al. Aberrant promoter methylation profile and association with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (24): 7329-38.

60. Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC et al. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001; 61 (8): 3419-24.
61. Toyooka S, Suzuki M, Maruyama R, Toyooka KO, Tsukuda K, Fukuyama Y et al. The relationship between aberrant methylation and survival in non-small cell lung cancers. *Br J Cancer.* 2004; 91 (4): 771-4.
62. Wang J, Lee JJ, Wang L, Liu DD, Lu C, Fan YH et al. Value of p16INK4a and RASSF1A promoter hypermethylation in prognosis of patients with respectable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (18 Pt 1): 6119-25.