



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Ecobroncoscopia y Mediastino: Ampliando Horizontes

Roberto Martín de León

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Clínic  
Barcelona**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## **TESIS DOCTORAL**

---

### **ECOBRONCOSCOPIA Y MEDIASTINO: AMPLIANDO HORIZONTES**

Memoria de tesis doctoral presentada por

**Roberto Martín de León**

para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de  
Barcelona.

#### **Dirigida por**

Dr. Carles Agustí García-Navarro

Dra. Carmen M<sup>a</sup> Lucena Pozo

Unidad de Endoscopia Respiratoria. Servicio de Neumología. Institut Clínic  
Respiratori. Hospital Clínic Barcelona.

#### **Tutor**

Dra. Noemí Reguart Aransay

Unidad de Cáncer de Pulmón. Servicio de Oncología Médica. Institut de  
Malalties Hemato-oncològiques. Hospital Clínic Barcelona.

**Programa de Doctorado de**

**Medicina e Investigación Traslacional**

**Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud**

**Universidad de Barcelona**

Abril 2024



*A María y Elena,  
por ser el motor que impulsa mi vida*



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría empezar agradeciendo a mis directores, el Dr. Carlos Agustí y la Dra. Carmen Lucena. Gracias por haberme mostrado uno de los campos más bonitos de la Neumología y por despertar en mi la pasión por esta especialidad. Habéis sido unos maestros ejemplares y unos increíbles mentores en este periodo de formación. Me habéis enseñado todo lo que sé y me siento muy orgulloso de haber formado parte de vuestro equipo durante estos años.

Gracias a la Dra. Cristina Teixidó por su tiempo, dedicación y paciencia. Sin ella no habría sido posible sacar adelante todo el trabajo “no visible” y que ha permitido que esta tesis adquiriera la potencia científica que tiene.

A Sara y Ainhoa, por su cariño y enseñanza. Gracias por haberme acompañado durante estos años y por vuestros sinceros consejos. Espero que en esa cocina siempre haya espacio para una taza de café más.

Agradecer a todo el servicio de Neumología del Hospital Clínic, desde mis coRs hasta los jefes, sin olvidar a todos los especialistas y consultores que considero conforman un servicio excepcional y que me han permitido formarme como Neumólogo y de los que tanto he aprendido.

A la Unidad de Tumores Torácicos del Hospital Clínic sin los cuales esta tesis no habría salido adelante. Gracias a todos por haberme enseñado tanto de cada uno de los campos que lo conforman.

A mis amigos de siempre y a los nuevos, en particular a Héctor y Roxy, por haber sido mis compañeros y familia durante estos años. Gracias por haber aguantado mis penas y por haber compartido mis alegrías.

A toda mi familia, en particular a los “catalanes” por haberme adoptado desde el principio y haber hecho que durante toda mi etapa en Barcelona nunca me haya sentido sólo, teniendo siempre la casa abierta y con un sitio reservado para mí.

A mis padres, mis hermanos y cuñada, por el amor incondicional que me tienen y yo les tengo. Por hacer de mí la persona que soy y por ser mi apoyo siempre. Gracias padres por guiarme siempre en mis decisiones y por enseñarme lo

valiosa que es la vida. Sois mi ejemplo a seguir, estoy orgulloso de teneros como padres.

Y por supuesto a mi mujer María y a mi hija Elena. Gracias por llegar a mi vida y hacer de mí una mejor persona. Gracias por todos los momentos vividos y por tu cariño, tu apoyo incondicional y tu disposición. Sin ti no lo habría conseguido.

**A todos, muchas gracias.**

## **FINANCIACIÓN**

La presente tesis ha sido avalada por dos becas concedidas por el Hospital Clínic de Barcelona y por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) respectivamente, lo que ha permitido financiar y desarrollar los diferentes proyectos de investigación que la componen.

- Beca Proyecto de Investigación de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Nº de proyecto: 515/2017. Categoría: General. Investigador principal: Roberto Martín de León. Año: 2017.
- Premio fin de residencia “Emili Letang” del Hospital Clínic de Barcelona. Investigador principal: Roberto Martín de León. Año: 2018.



---

**INDICE DE CONTENIDO**

<b>1. PRESENTACIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
2.1. CÁNCER DE PULMÓN.....	7
2.1.1. <i>Epidemiología</i> .....	7
2.1.2. <i>Etiología</i> .....	8
2.1.2.1. Tabaco.....	8
2.1.2.2. Carcinógenos laborales y ambientales.....	8
2.1.2.3. Amianto.....	8
2.1.2.4. Radón .....	8
2.1.2.5. Combustión de biomasa .....	8
2.1.2.6. Contaminación atmosférica y gases de combustión diésel .....	8
2.1.2.7. Otros factores .....	9
2.1.3. <i>Patogenia</i> .....	9
2.1.4. <i>Clasificación histológica</i> .....	10
2.1.5. <i>Manifestaciones clínicas</i> .....	10
2.1.6. <i>Diagnóstico</i> .....	10
2.1.6.1. Pruebas radiológicas .....	11
2.1.6.1.1. Radiografía de tórax.....	11
2.1.6.1.2. Tomografía computarizada (TC) de tórax .....	11
2.1.6.1.3. Tomografía por emisión de positrones (PET).....	12
2.1.6.1.4. Ecografía torácica (ET) .....	13
2.1.6.1.5. Resonancia Magnética (RM) .....	13
2.1.6.2. Procedimientos endoscópicos .....	13
2.1.6.3. Procedimientos quirúrgicos .....	14
2.1.6.4. Procedimientos para el diagnóstico de metástasis.....	14
2.1.7. <i>Estadificación</i> .....	14
2.1.8. <i>Tratamiento</i> .....	18
2.2. ECOBRONCOSCOPIA (EBUS-TBNA) .....	22
2.2.1. <i>Definición</i> .....	22
2.2.2. <i>Aspectos técnicos</i> .....	22
2.2.3. <i>Indicaciones</i> .....	23
2.2.3.1. Diagnóstico y estadificación del CPCNP .....	23
2.2.3.2. Linfadenopatías mediastínicas no neoplásicas .....	23
2.2.3.3. Papel del EBUS en síndromes linfoproliferativos .....	24
2.2.4. <i>Limitaciones</i> .....	24
2.2.5. <i>Complicaciones</i> .....	25
2.2.6. <i>Ampliando horizontes del EBUS-TBNA</i> .....	25
2.2.6.1. Utilidad en situaciones clínicas especiales .....	26
2.2.6.2. Utilidad en la era de la terapia dirigida .....	26
2.2.6.3. Rentabilidad en neoplasia pulmonares extratorácicas .....	27
<b>3. FUNDAMENTOS DE LA TESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>

<b>5. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>97</b>

## **ABREVIATURAS**

Ácido desoxirribonucleico (ADN)

Ácido ribonucleico (ARN)

Adenopatías hilio-mediastínicas (AHM)

Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC)

Cáncer de pulmón (CP)

Carcinoma de células pequeñas (CCP)

Carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP)

Ecografía transtorácica (ETT)

Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Fluorodeoxiglucosa (FDG)

Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Inmunohistoquímico (IHQ)

Inmunoterapia (IT)

Ligando 1 de muerte programada (PD-L1)

Metástasis mediastínica oculta (MMO)

Mediastinoscopia cervical estándar (MCE),

Mediastinoscopia videoasistida (VAM)

Neoplasias extratorácicas (NE)

Next Generation Sequencing (NGS)

Organización Mundial de la Salud (OMS)

Performance status (PS)

Punción aspiración con aguja fina o gruesa guiada por TC (TC-PAAF/BAG)

Punción transbronquial guiada por ecobroncoscopia (EBUS-TBNA)

Quimioterapia (QT)

Radioterapia (RT)

Radioterapia Corporal Estereotáctica (SBRT)

Rapid on-site evaluation (ROSE)

Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR)

Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

Resonancia Magnética (RM)

Respuesta patológica (RP)

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO)

Tirosin quinasa (TK)

Tomografía computarizada (TC)

Tomografía por emisión de positrones (PET)

Tumor Proportion Score (TPS)

# 1. PRESENTACIÓN



## 1. PRESENTACIÓN

La presentación de esta Tesis Doctoral se realiza en forma de compendio de tres artículos publicados según la normativa aprobada por la Comisión de Doctorado de la Universidad de Barcelona el 16 de marzo de 2012 (última modificación el 14 de Julio de 2021).

**Artículo 1.** Lucena CM, **Martín-Deleon R**, Boada M, Marrades RM, Sánchez D, Sánchez M, Vollmer I, Martínez D, Fontana A, Reguart N, Molins L, Agustí C. Integral mediastinal staging in patients with NON-SMALL cell lung cancer and risk factors for occult N2 disease. *Respir Med* 2023; 208:107132. doi: 10.1016/j.rmed.2023.107132. Factor de impacto (2022): 4.3. **Q1** (SJR) y **Q2** (JCR).

**Artículo 2.** **Martin-Deleon R**, Teixido C, Lucena CM, Martinez D, Fontana A, Reyes R, García M, Viñolas N, Vollmer I, Sanchez M, Jares P, Pérez FM, Vega N, Marin E, Marrades RM, Agustí C, Reguart N. EBUS-TBNA Cytological Samples for Comprehensive Molecular Testing in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2021; 13(9): 2084. doi: 10.3390/cancers13092084. Factor de impacto (2021): 6.575. **Q1** (SJR) y **Q1** (JCR).

**Artículo 3.** **Martin-Deleon R**, Solarat B, Moisés J, Lucena CM, Fontana A, Marrades RM, Agustí C. EBUS-TBNA in Extrathoracic Malignancies: Diagnostic and Prognostic Implications. *Lung* 2022; 200(6): 747-753. doi: 10.1007/s00408-022-00584-5. Factor de impacto (2022): 5.0. **Q1** (SJR) y **Q2** (JCR).

Los estudios que forman esta Tesis Doctoral pertenecen a una misma línea de investigación dirigida a profundizar en el conocimiento de las indicaciones y rentabilidad de la ecobroncoscopia en el marco de las neoplasias tanto torácicas como extratorácicas. Los resultados de los estudios han aportado información relevante en este campo y han sido recogidos en forma de tres artículos originales publicados en tres revistas indexadas con un factor de impacto global de 15.875 puntos.



## 2. INTRODUCCIÓN



## 2. INTRODUCCIÓN

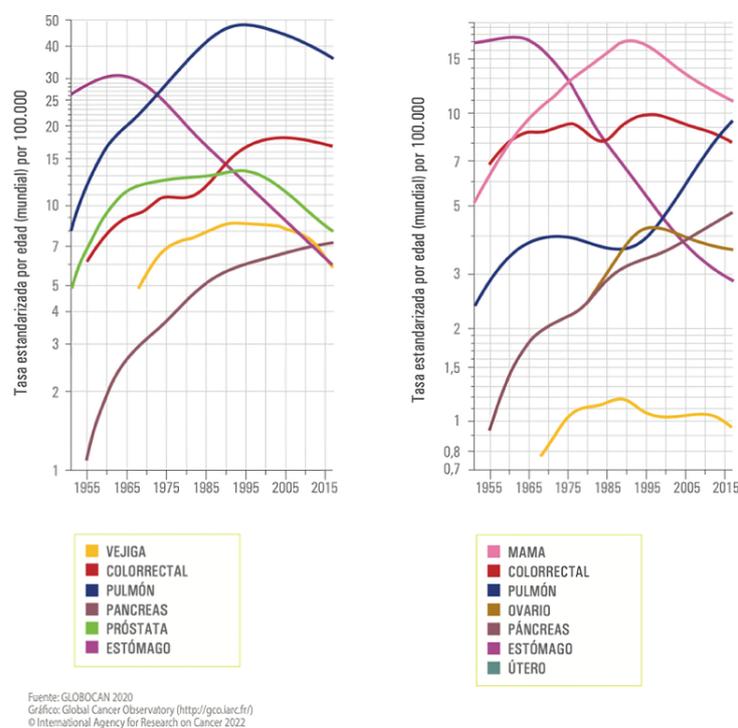
### 2.1. Cáncer de pulmón

#### 2.1.1. Epidemiología

El cáncer de pulmón (CP) es la tercera neoplasia más frecuente en España tanto en hombres como en mujeres, y la que causa una mayor mortalidad a nivel global. Se estima que en 2020 1.796.144 personas fallecieron como consecuencia de CP a nivel mundial, lo que corresponde a un 18% del total de muertes por cáncer (1).

En las últimas décadas, la incidencia por CP en mujeres en España ha mostrado un fuerte incremento. Este aumento ha sido debido mayoritariamente a la incorporación más tardía de la mujer al hábito tabáquico, mientras que en varones continúa con una tendencia a la baja desde el inicio del milenio (Figura 1).

Se estima que la supervivencia del CP a los 5 años es de un 12% en hombres y un 18% en mujeres.



**Figura 1.** Incidencia de cáncer según el sexo en los últimos 60 años por 100.000 habitantes a nivel mundial. Imagen extraída de Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM): Las cifras del cáncer en España en 2022 (1).

## **2.1.2. Etiología**

### **2.1.2.1. Tabaco**

En los países desarrollados, el antecedente de tabaquismo constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de CP. El 85% de los pacientes diagnosticados de CP son fumadores activos o ex-fumadores. Se estima que el riesgo relativo de padecer CP en fumadores respecto a no fumadores es de entre 10 y 30 veces superior (2).

### **2.1.2.2. Carcinógenos laborales y ambientales**

Se han detectado numerosos carcinógenos laborales y ambientales que también aumentan el riesgo de padecer CP. Entre los más frecuentes se encuentran:

#### **2.1.2.3. Amianto**

El amianto, también conocido como asbesto, lo conforman un grupo de minerales que se ha utilizado en diversas industrias debido a sus propiedades resistentes al calor y a la abrasión. Su exposición continuada es un factor de riesgo para desarrollar CP tanto en no fumadores como en fumadores, teniendo un efecto sumatorio en estos últimos (3).

#### **2.1.2.4. Radón**

Se trata de un producto de desintegración gaseosa del uranio-238 y del radio-226 que está presente en el suelo, las rocas y las aguas subterráneas y puede filtrarse en los hogares. Es capaz de dañar el epitelio respiratorio mediante la emisión de partículas alfa y se estima que un 1% de los CP están producidos por este gas (4).

#### **2.1.2.5. Combustión de biomasa**

En países en vías de desarrollo, la quema en interiores de combustibles de biomasa no procesados como la madera o el carbón, se ha asociado a múltiples problemas respiratorios, incluido un aumento de la incidencia del CP (5).

#### **2.1.2.6. Contaminación atmosférica y gases de combustión diésel**

Tanto la contaminación atmosférica como la exposición a gases de la combustión diésel han demostrado estar asociados al riesgo de desarrollar CP (6, 7).

#### **2.1.2.7. Otros factores**

Existen otros elementos que pueden influir en el riesgo de desarrollar CP. Entre ellos se incluyen factores raciales, la radioterapia, algunas enfermedades inflamatorias, y determinados factores genéticos que serán analizados más adelante.

#### **2.1.3. Patogenia**

Se sabe que el humo del tabaco junto con otros agentes etiológicos causa una alteración en los mecanismos de reparación de las células progenitoras en el epitelio respiratorio. Diversos cambios genéticos y epigenéticos a este nivel dan lugar a una proliferación de clones celulares aberrantes. La extensión y la progresión de estas alteraciones condicionan un “estado premaligno” que constituye el principio fundamental para el desarrollo del cáncer (8). Así, en el CP existen ciertos protooncogenes que pueden activarse dando lugar a oncogenes. La alteración genética más frecuente es la mutación del gen supresor tumoral p53, que actúa impidiendo la adecuada división y crecimiento de las células, favoreciendo así el desarrollo del CP. Otro oncogén que frecuentemente se ve afectado en el CP es el K-RAS, mutación que puede detectarse hasta en el 30% de los adenocarcinomas. Otros genes que pueden asociarse al CP son la familia ERB-B, también conocida como la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la familia de receptores de tipo I que se incluyen dentro de los receptores de la tirosin quinasa (TK); o la del oncogén MYC, presente en el carcinoma de células pequeñas (CCP).

Cabe destacar, la implicación de otros mecanismos genéticos como pueden ser la delección o inactivación de genes supresores tumorales, que alteran los fenómenos de apoptosis, provocando trastornos en los mecanismos de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Por otro lado, se sabe que existen diversos factores de crecimiento que desempeñan un papel fundamental en la activación de los genes que controlan la diferenciación y el desarrollo

celular. Un ejemplo es la unión del EGF (por sus siglas en inglés Epidermal Growth Factor) a su receptor específico, provocando un aumento de expresión de diversos oncogenes, como el C-MYC y el C-FOS. Estas alteraciones a nivel de la activación o pérdida de función de genes supresores tumorales no son los únicos mecanismos por los que la carcinogénesis está aumentada en pacientes con CP. Existen otros mecanismos epigenéticos (cambios heredados en la función del ADN que no suponen alteraciones en la secuencia del mismo), como alteraciones en pequeñas secuencias de ácido ribonucleico (ARN) (microRNA), metilación del ADN o cambios en la cromatina, que desempeñan un papel determinante en la carcinogénesis.

#### **2.1.4. Clasificación histológica**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) actualizó la clasificación histológica de los tumores torácicos en 2021 (9). En las guías de práctica clínica se clasifica el CP en dos grandes grupos: carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP) y carcinoma de células pequeñas (CCP); constituyendo el primer grupo el 85% de los casos de CP.

En el CPCNP se agrupan tres subtipos principales: el adenocarcinoma (63,8%), el carcinoma escamoso (27,7%) y el carcinoma de células grandes (3.1%) (10).

#### **2.1.5. Manifestaciones clínicas**

Los síntomas del CP suelen ser consecuencia de los efectos locales del tumor o de la diseminación regional o a distancia. Aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes presentan algún síntoma en el momento del diagnóstico, siendo los más comunes la tos (55%), la disnea (45%), el dolor torácico (38%) y la pérdida de peso (36%) (11). Excepcionalmente, las manifestaciones clínicas pueden ser debidas a síndromes paraneoplásicos.

#### **2.1.6. Diagnóstico**

El objetivo principal en pacientes con sospecha de CP es diseñar una estrategia clínica que permita identificar el tipo de lesión neoplásica subyacente y conocer su extensión intra o extratorácica. De esta forma se podrá diseñar un tratamiento oncológico específico en base a las características histológicas y moleculares

concretas. Actualmente se dispone de un arsenal de técnicas complementarias que, utilizadas de forma racional y eficiente, permitirán alcanzar dicho objetivo.

### **2.1.6.1. Pruebas radiológicas**

#### **2.1.6.1.1. Radiografía de tórax**

La radiografía de tórax es una herramienta muy útil en el diagnóstico inicial del CP, siendo ampliamente utilizada debido a su disponibilidad y bajo coste. Permite identificar no sólo nódulos o masas, sino que también aporta información respecto a la presencia de derrame pleural, atelectasias o adenopatías mediastínicas. En muchos casos, el diagnóstico de sospecha de un CP se inicia tras la realización de una radiografía de tórax llevada a cabo por síntomas inespecíficos como la tos o el dolor torácico. Sin embargo, la dificultad para discernir entre lesiones benignas y malignas, su baja sensibilidad con lesiones de pequeño tamaño, o la superposición de estructuras anatómicas, limita su interpretación y hace necesaria la realización de pruebas adicionales para confirmar los hallazgos de la misma.

#### **2.1.6.1.2. Tomografía computarizada (TC) de tórax**

La TC permite definir con gran exactitud el tamaño, la localización y las características (quística, sólida, presencia de necrosis...) de la lesión sospechosa. Por otro lado, aporta información sobre la posible infiltración de la pleura, vasculatura pulmonar o la pared torácica, y ayuda a descartar la afectación de órganos a distancia como el hígado, las glándulas suprarrenales o los huesos. De esta forma, la TC no sólo es una herramienta imprescindible para estimar la extensión de la enfermedad, sino que puede determinar las exploraciones complementarias necesarias para obtener muestras citohistológicas que permitan confirmar la naturaleza de los hallazgos evidenciados.

En este sentido, la punción aspiración con aguja fina o gruesa guiada por TC (TC-PAAF/BAG) es una técnica de gran utilidad para el diagnóstico de lesiones pulmonares, especialmente de casos no accesibles mediante broncoscopia. Se ha de considerar que la rentabilidad de la TC-PAAF/BAG se incrementa significativamente en lesiones mayores de 30 mm y en lesiones periféricas, pudiendo alcanzar una rentabilidad global de hasta el 97% (12). Aunque las

complicaciones asociadas a esta técnica generalmente suelen ser leves, no está exenta de otras complicaciones como la hemoptisis (7-8%) y el neumotórax (10-37%) que puede requerir drenaje pleural en los casos más graves (6-7%) (12-14).

#### **2.1.6.1.3. Tomografía por emisión de positrones (PET)**

La PET es una técnica de imagen no invasiva que se utiliza para localizar y cuantificar la distribución de diferentes radiotrazadores en el cuerpo humano. El paciente recibe una dosis intravenosa de un radionúclido radiactivo que emite positrones, generalmente fluorodeoxiglucosa (FDG). Mediante técnicas de reconstrucción de imágenes y análisis de datos, se genera una imagen tridimensional que muestra la distribución del radionúclido en el cuerpo. Esto permite detectar y localizar áreas de actividad metabólica anormal que puede ser cuantificada (15, 16). Así, esta técnica al valorar el metabolismo de las lesiones sospechosas incrementa el valor predictivo positivo y negativo de la TC, optimizando el circuito diagnóstico y de estadificación de los pacientes con CP (17).

Cuando se realiza de forma conjunta con una TC (PET-TC), aporta información muy fidedigna de la naturaleza de la invasión tumoral, de la afectación de los ganglios linfáticos y de la presencia de metástasis intra y extratorácicas (18, 19). De esta forma, pueden evitarse la realización de pruebas diagnósticas invasivas dando lugar a una disminución del riesgo de complicaciones asociadas. Por otro lado, al facilitar la identificación de extensión sistémica no sospechada, pueden descartarse pacientes inicialmente candidatos a cirugía.

Aunque la PET-TC ha supuesto una revolución en el manejo de los pacientes con sospecha de CP, es importante conocer sus limitaciones. La mayor limitación es la relativa alta tasa de falsos positivos (25-44%) (20-22) debido principalmente a la captación patológica de FDG en patologías de etiología benigna como infecciones y diferentes tipos de enfermedades inflamatorias (sarcoidosis, tuberculosis, histoplasmosis, silicosis, etc.) (23-25). Debido a ello, el diagnóstico cito-histológico es esencial para confirmar o descartar la afectación neoplásica en pacientes con lesiones que presentan captación patológica en la PET-TC.

#### **2.1.6.1.4. Ecografía torácica (ET)**

La ET es una técnica de imagen no invasiva que utiliza ondas de sonido de alta frecuencia (ultrasonidos) para producir imágenes de los órganos internos, permitiendo la visualización en tiempo real de las estructuras pulmonares (tejido muscular, pleura, vasos y parénquima pulmonar). Puede ser de gran utilidad en casos concretos como en lesiones que contactan con la pleura. Se ha de considerar como una técnica accesible y económica que complementa otras modalidades de imagen, como la TC y la resonancia magnética (RM) (26).

#### **2.1.6.1.5. Resonancia Magnética (RM)**

Mediante esta técnica se obtienen imágenes del organismo a través de la acción de un campo electromagnético producido por un imán potente y emitiendo ondas de radio no ionizantes. La RM combina aspectos morfológicos y funcionales siendo especialmente útil en la evaluación del mediastino y la pared torácica.

Actualmente existen estudios con contraste dinámico (27) y técnicas de imagen multiparamétricas, que valoran el uso potencial de la RM para diferenciar lesiones malignas y benignas, así como para evaluar la respuesta temprana al tratamiento sistémico en pacientes con CP (28, 29).

#### **2.1.6.2. Procedimientos endoscópicos**

La broncoscopia convencional ha sido clásicamente la técnica más utilizada durante el proceso diagnóstico del CP, ya que permite la toma de muestras de lesiones endobronquiales y la valoración del abordaje quirúrgico en caso necesario (distancia a la carina, grado de invasión del árbol bronquial, etc). Está indicada especialmente en el estudio de las lesiones centrales, ya que las posibilidades de identificar afectación endobronquial con opción de toma de biopsias son mayores.

En el caso de las lesiones periféricas, puede ser de utilidad el uso combinado de la visión radiológica aportada por un arco de fluoroscopia. Aunque se ha de considerar que la rentabilidad es baja en lesiones menores de 30 mm de diámetro (30), los avances tecnológicos conseguidos en el campo de la endoscopia respiratoria como son el uso de la navegación electromagnética y la

ecobroncoscopia radial han llevado a un incremento considerable de la rentabilidad diagnóstica de este tipo de lesiones (31).

Por otro lado, es importante resaltar la introducción de la punción transbronquial guiada por ecobroncoscopia (EBUS-TBNA), ya que puede permitir con una única exploración obtener el diagnóstico y realizar la estadificación de pacientes con CP con afectación locoregional. Las características y la relevancia potencial del EBUS-TBNA se exponen más adelante (Apartado 4.2).

#### **2.1.6.3. Procedimientos quirúrgicos**

Entre los procedimientos quirúrgicos diagnósticos más utilizados se encuentran la mediastinoscopia cervical estándar (MCE), la toracoscopia videoasistida (VATS) y la mediastinotomía anterior (técnica de Chamberlain). El carácter invasivo de estas técnicas, así como su mayor morbimortalidad y costes, las ha relegado a un segundo plano en el diagnóstico del CP y únicamente se plantean en casos excepcionales en las que las otras pruebas diagnósticas referidas no han sido rentables (19).

#### **2.1.6.4. Procedimientos para el diagnóstico de metástasis**

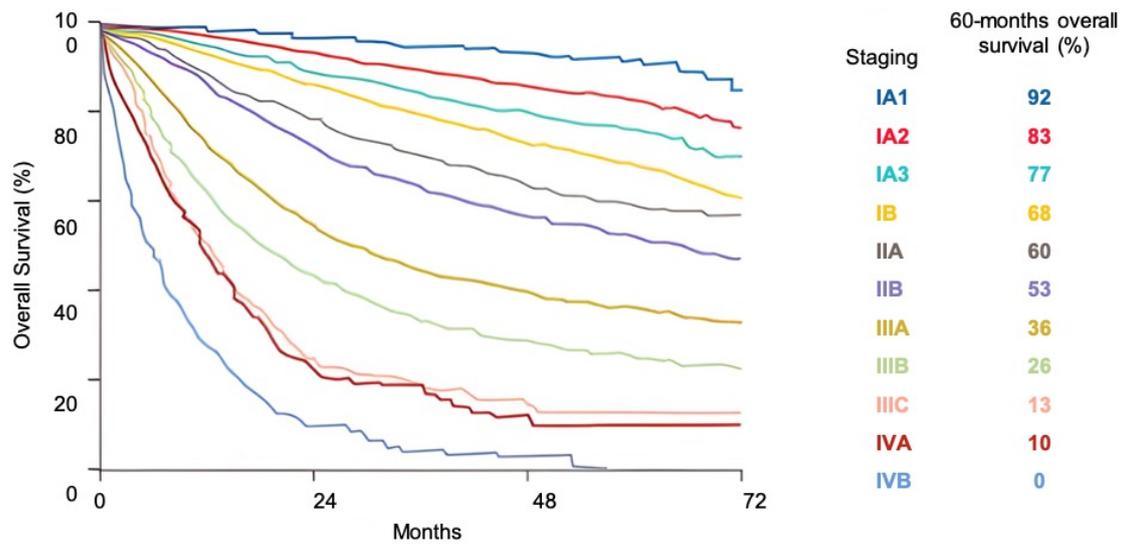
Según su localización, las metástasis se clasifican en intratorácicas o extratorácicas. Las localizaciones más frecuentes intratorácicas incluyen los nódulos pulmonares ipsi y contralaterales, la pleura y el pericardio. A nivel extratorácico las localizaciones más frecuentes incluyen el hígado, las glándulas suprarrenales, el sistema nervioso central y los huesos (32, 33).

La identificación de la afectación metastásica va a venir determinada por la exploración física y/o las pruebas de imagen. En función de la localización se deberá seleccionar la prueba diagnóstica que sea menos invasiva y con mayor rentabilidad diagnóstica.

#### **2.1.7. Estadificación.**

La estadificación del CP busca conocer en cada paciente, y con la máxima precisión posible, cual es la extensión de la enfermedad neoplásica con el

objetivo de diseñar el tratamiento individualizado más idóneo y obtener una información pronóstica objetiva (Figura 2).



**Figura 2.** Supervivencia global en meses según el estadio concreto de acuerdo con la estadificación de la 8ª edición de la IASLC. Imagen extraída del *Journal of Thoracic Oncology* (34).

Actualmente, la estadificación del CP sigue la clasificación propuesta por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC). Dicha clasificación se renueva periódicamente y en la actualidad está en su 8ª edición (34). Este sistema cataloga a los pacientes en uno de los 11 estadios de la enfermedad en virtud del tamaño del tumor primario, la afectación de estructuras vecinas, la posible afectación de los ganglios linfáticos de drenaje y la extensión a órganos extratorácicos (Figura 3).

		T1			T2		T3	T4	
		a	b	c	a	b			
N0		IA <sub>1</sub>	IA <sub>2</sub>	IA <sub>3</sub>	IB	IIA	IIB		
N1		IIB					IIIA		
N2		IIIA					IIIB		
N3		IIIB					IIIC		
M1	a	IVA						IVB	
	b								
	c								

**Figura 3.** Estadios según la 8ª edición de la IASLC para el cáncer de pulmón. Adaptación del *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* (35).

El principal reto en los pacientes con CP consiste en obtener el diagnóstico histológico y la estadificación de la enfermedad de la manera más eficiente y utilizando las técnicas menos invasivas posibles. Para la correcta aplicación del sistema de estadificación TNM, es necesario conocer la distribución anatómica de los ganglios linfáticos mediastínicos y seleccionar la técnica diagnóstica más adecuada (Tabla 1).

<b>ESTADÍO N</b>	<b>DESCRIPCIÓN NODAL</b>
<b>NX</b>	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
<b>N0</b>	Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b>	Metástasis en el ganglio linfático peribronquial ipsilateral y/o hiliar, y en el ganglio intrapulmonar, incluida la invasión por extensión directa
<b>N2</b>	Metástasis en el ganglio linfático mediastínico ipsilateral y/o subcarinal
<b>N3</b>	Metástasis en el mediastino contralateral, hiliar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral, o ganglio(s) linfático(s) supraclavicular(es).

**Tabla 1.** Descriptores nodales de la 8ª edición de la IASLC. Adaptación del *Journal of Thoracic Oncology* (34).

Existen dos circunstancias relevantes en la estadificación del CP. En primer lugar, averiguar la posible afectación ganglionar mediastínica ya sea homolateral a la lesión pulmonar primaria (N1 o N2) o contralateral (N3). En segundo lugar, determinar la presencia de enfermedad metastásica. Ambos factores van a condicionar de manera determinante tanto el esquema terapéutico como el pronóstico de la enfermedad. Aunque los datos clínicos y analíticos pueden ayudar a conocer la extensión de la enfermedad, la exploración fundamental en la estadificación de pacientes con sospecha de CP es el PET-TC.

Cuando el PET-TC muestra afectación metastásica, ya sea aislada en el pulmón contralateral (M1a) o múltiple (un órgano M1b; dos o más órganos M1c), y

siempre que sea posible, la biopsia se dirigirá hacia estas localizaciones para la confirmación cito-histológica. La determinación de enfermedad metastásica es crucial ya que confirma el estadio IV, contraindica la cirugía en la mayoría de los casos y selecciona a los pacientes que podrían beneficiarse de un tratamiento sistémico.

En pacientes con afectación localizada en el tórax, será fundamental determinar la posible afectación mediastínica. Se ha demostrado que la presencia de adenopatías con diámetro > 10 mm en el TC y/o avidéz por FDG en el PET independientemente del tamaño, tienen una probabilidad elevada de estar afectas por la enfermedad neoplásica. Siguiendo el esquema TNM, si las adenopatías mediastínicas supuestamente afectas en el PET-TC son hiliares ipsilaterales se trataría de un N1, y N2 cuando lo son las localizadas en mediastino homolateral y subcarinal. Las adenopatías hiliares y mediastínicas contralaterales se clasifican como N3. Dado que la especificidad del PET-TC no es suficientemente alta, y como ya se ha comentado, siempre será necesario confirmar la afectación neoplásica mediante técnicas cito-histológicas.

Existen ciertas situaciones clínicas en las que la estadificación del CP es controvertida. Especialmente se han de considerar aquellos pacientes con riesgo intermedio de afectación mediastínica, ya que el porcentaje de N2-N3 en la cirugía puede alcanzar hasta el 20% a pesar de que el PET-CT no muestre afectación ganglionar aparente. Dentro de este grupo se incluirían aquellos pacientes con tumores de localización central, tumores de tamaño superior a 30 mm o con afectación hilar ipsilateral en el PET-TC. Aunque en este grupo de pacientes no existe unanimidad en cómo proceder para descartar afectación mediastínica de la enfermedad, probablemente serían candidatos a exploraciones mediastínicas adicionales con el objetivo de descartar definitivamente la invasión ganglionar (36-39).

Clásicamente el CCP se estadificaba en función de si la afectación neoplásica estaba limitada al tórax (enfermedad intratorácica, y por tanto abarcable en un único campo de radioterapia), o si se extendía a otros órganos (enfermedad extratorácica). Sin embargo, en la actualidad, la estadificación del CCP se realiza

igual que la del CPCNP siguiendo el sistema TNM (tumor, ganglios y metástasis) propuesto por la IASLC.

### **2.1.8. Tratamiento.**

El abordaje terapéutico en el CPCNP depende de la extensión de la enfermedad y la presencia de biomarcadores. Durante los últimos años se han evidenciado avances significativos en la caracterización molecular del tumor que han permitido el desarrollo de terapias dirigidas. Por otra parte, la inmunoterapia (IT) ha cambiado el paradigma de tratamiento en el CPCNP. El beneficio de ambas estrategias se confirma tanto en estadios avanzados como en la enfermedad inicial resecable, por lo que en la actualidad la individualización terapéutica en base a biomarcadores esta recomendada por guías clínicas en todos los estadios de la enfermedad (40-42).

En los estadios iniciales el tratamiento estándar es la cirugía, siempre que se cumplan los criterios de resecabilidad y operabilidad. La IT adyuvante con atezolizumab (anticuerpo monoclonal humanizado anti ligando del receptor de muerte programada 1 (anti PD-L1)), en tumores con alta expresión de dicho receptor ha demostrado una mayor supervivencia libre de enfermedad convirtiéndose en el estándar de tratamiento en Europa y EEUU (43). Por otra parte, el tratamiento adyuvante con inhibidores de EGFR (osimertinib) o ALK (alectinib) ha demostrado disminuir significativamente el riesgo de recidiva en pacientes portadores de mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (44), así como genes de fusión de ALK (45).

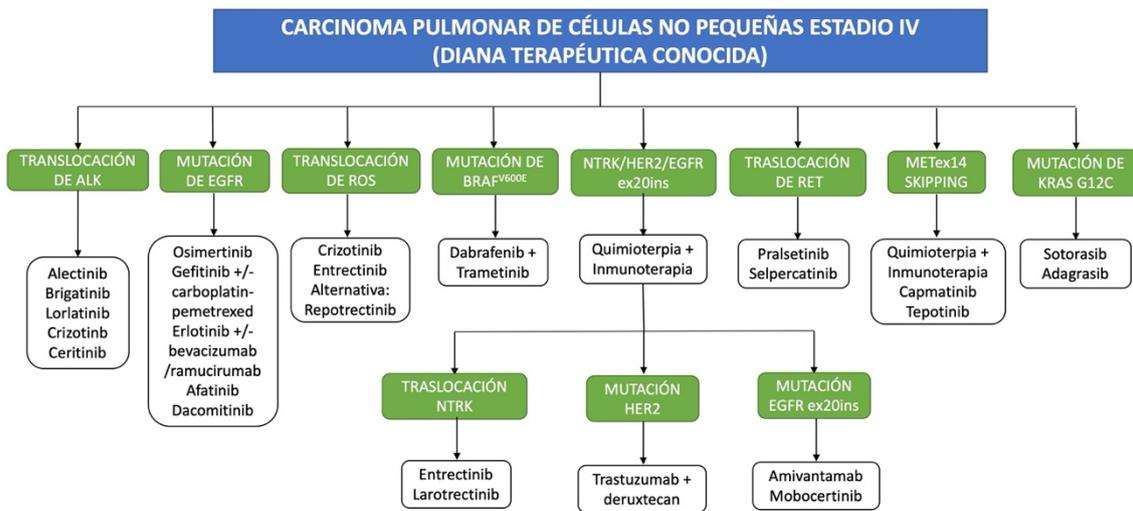
En España, en pacientes en estadios II-III A, se recomienda tratamiento adyuvante con quimioterapia (QT) basada en platino y, en tumores con alta expresión de PD-L1 (>50%) posteriormente IT con atezolizumab durante 1 año (46), u osimertinib adyuvante durante 3 años en tumores con mutación del gen EGFR en exón 19 o 21 (47). El tratamiento adyuvante con inhibidores de ALK aún no dispone de aprobación en nuestro país. En pacientes no candidatos a cirugía o que la hayan rechazado, la radioterapia corporal estereotáctica (SBRT) es una alternativa válida (48, 49).

Sin ninguna duda, uno de los campos que ha evidenciado un mayor cambio en el abordaje terapéutico ha sido la enfermedad localmente avanzada con afectación ganglionar N2 positiva. El tratamiento multimodal con QT de inducción con o sin radioterapia (RT) seguido de cirugía en los estadios III resecables (IIIA con afectación N2) ha sido motivo de debate. A pesar de demostrar un aumento en la tasa de respuesta patológica (RP) completa y RP mayor, ningún estudio ha confirmado su beneficio en términos de supervivencia, por lo que su uso siempre en la práctica clínica es debatible. Durante los últimos años, la introducción de la IT neoadyuvante en combinación con QT en el CPCNP resecable ha demostrado aumentar significativamente las respuestas patológicas, así como la supervivencia libre de eventos (50). En la actualidad, el tratamiento de inducción con tres ciclos de nivolumab (anti-PD-L1) combinado con QT seguido de cirugía se ha convertido en un nuevo estándar de tratamiento en pacientes con CPNCP resecable de alto riesgo (N2) con niveles de expresión positiva de PD-L1 y sin alteraciones diana en EGFR o ALK. No obstante, este escenario puede cambiar en los próximos años con la introducción de IT perioperatoria de inducción y adyuvante en los tumores resecables (51).

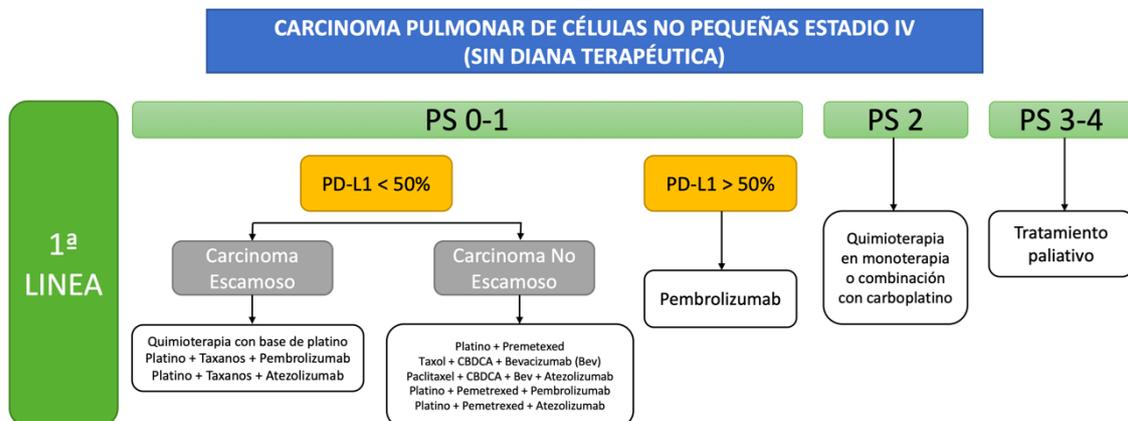
En los pacientes con estadio III que son inoperables o irresecables el tratamiento de elección es la combinación de QT basada en platino y RT concurrente. En los pacientes que no presenten progresión al tratamiento de QT/RT, y que tengan marcador PD-L1 positivo, está indicado el tratamiento de mantenimiento con durvalumab durante un año. Dicho tratamiento de consolidación ha demostrado una supervivencia del 40% a los 5 años (52).

El tratamiento del CPCNP metastásico (estadio IV), fue el inductor del cambio de paradigma del tratamiento basado en la medicina personalizada con la identificación de determinadas vías moleculares tributarias de terapia dirigida y con la introducción de la IT. Estos avances han mejorado de manera sustancial la supervivencia y la calidad de vida de este grupo de pacientes. Por ello, en la actualidad, el proceso diagnóstico de la enfermedad avanzada requiere de la identificación de tres factores: subtipo histológico, expresión de PD-L1 y la presencia de “drivers genéticos”. La presencia de un “driver genético” y los niveles de expresión de PD-L1 determinan el algoritmo terapéutico recomendado (figuras 4 y 5).

Así pues, observamos como la caracterización molecular del CPCNP se ha convertido en una necesidad imperiosa en todos los estadios de la enfermedad desde el inicial quirúrgico, el irresecable localmente avanzado y el estadio metastásico avanzado. La correcta identificación de biomarcadores genéticos y expresión de PD-L1 permite la selección de la mejor estrategia en todos los ámbitos de la enfermedad.



**Figura 4.** Esquema de tratamiento en el CPCNP estadio IV y presencia de “driver genético”. Adaptada de las guías clínicas de la Sociedad Europea de Oncología Médica (ESMO) (40).



**Figura 5.** Esquema de tratamiento en CPCNP con estadio IV y ausencia de “driver genético”. Adaptada de las guías clínicas SEOM 2018 (41).

En resumen, la caracterización genómica del CPCNP ha permitido la identificación y clasificación de múltiples alteraciones genómicas tributarias de tratamientos personalizados. Hoy en día se tiene una clara descripción de la incidencia y distribución de dichas alteraciones en el CPCNP. Un aspecto relevante radica en que dichas alteraciones se encuentran representadas con la misma incidencia en la enfermedad avanzada, así como en los estadios más iniciales de la enfermedad (53).

La alteración genética más frecuente en el CPCNP es la mutación de KRAS, que se detecta en aproximadamente el 25%, seguida de la mutación de EGFR ( $\approx 18\%$ ) y la fusión de ALK (4%). Otras alteraciones diana identificadas con menor frecuencia incluyen las mutaciones de HER-2, MET y B-RAF (2-3%), y las fusiones de ROS1, RET, NTRK1/3 ( $<1-2\%$ ).

La expresión de PD-L1 se evalúa en la membrana de las células tumorales y/o estromales mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). El nivel de expresión de PD-L1 predice la respuesta a la IT y determina la indicación terapéutica subyacente en todos los distintos estadios de la enfermedad.

Las necesidades en la caracterización molecular y la identificación de alteraciones genéticas en el CPCNP ha sido creciente durante las últimas décadas a medida que las indicaciones terapéuticas con tratamientos diana han ido aumentando. Inicialmente, se realizaban técnicas moleculares de análisis individual, es decir, técnicas que permitían la identificación de un solo gen como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), hibridación fluorescente in situ (FISH) o IHQ. Sin embargo, la creciente necesidad de identificar diferentes “drivers genéticos” en el estudio del CPCNP ha llevado a la necesidad imperiosa de introducir técnicas multiplex de secuenciación de nueva generación, como la secuenciación genética o Next Generation Sequencing (NGS). Estas técnicas permiten el análisis simultáneo de varias alteraciones genéticas al mismo tiempo, optimizando así el tiempo de respuesta y la eficiencia diagnóstica con muestras histológicas. Uno de los aspectos relevantes a destacar es la disposición de material para la realización

de los análisis moleculares. A diferencia de otros tumores, en el CP, se dispone de muy poco material por lo que la optimización de la muestra y de las técnicas de evaluación molecular es un requisito esencial en todo el proceso diagnóstico.

## **2.2. Ecobroncoscopia (EBUS-TBNA)**

### **2.2.1. Definición**

Desde su introducción en el mundo de la medicina en el año 1992, la ecobroncoscopia, más conocida con el acrónimo inglés EBUS (Endobronchial Ultrasound), ha revolucionado la manera en la que se realiza la estadificación mediastínica del CP (54).

En el año 2004 Olympus®, en colaboración con el departamento de Cirugía Torácica de la Universidad de Chiba, desarrollaron el EBUS tal y como lo conocemos en la actualidad (55, 56). Consiste en un broncoscopio clásico que incorpora en su extremo distal un transductor con un rango de frecuencia de entre 5-10 MHz, que permite la obtención de imágenes ecográficas en tiempo real de las estructuras localizadas alrededor de la tráquea y los bronquios, e incorpora un canal de trabajo de 2.0 mm de diámetro. Para mejorar la impedancia acústica y aumentar la superficie de contacto con el ecobroncoscopio, se dispone de un micro balón que rodea al transductor y que puede inflarse con suero fisiológico.

### **2.2.2. Aspectos técnicos**

La toma de muestras se realiza en tiempo real, bajo visión directa y con la ayuda de una aguja de punción-aspiración transbronquial (TBNA). Dicha aguja, tiene un diámetro entre 19 y 22 G y está cubierta por un catéter semi-rígido que se introduce a través del canal de trabajo del ecobroncoscopio. Una vez identificada la zona de punción (en general ganglios hilio-mediastínicos y/o masas pulmonares o mediastínicas que contactan con el árbol traqueobronquial), se procede a la introducción del catéter en el canal de trabajo del ecobroncoscopio deslizando la aguja a través de este. La TBNA se realiza bajo visión ecográfica directa. Seguidamente, se procede a la extracción completa del sistema de punción del

ecobroncoscopio. La muestra del material aspirado se extiende en un portaobjetos o puede introducirse en una solución fijadora para realizar bloques celulares.

El EBUS-TBNA permite evaluar la práctica totalidad de las regiones adenopáticas hilio-mediastínicas a excepción de las regiones: subaórtica (5), paraaórtica (6), paraesofágica (8) y el ligamento pulmonar (9) (57). Debido a que estas estaciones ganglionares son casi siempre accesibles a ecoendoscopia digestiva (EUS), en los últimos años algunos centros han optado por realizar una exploración mediastínica completa utilizando ambas técnicas endoscópicas (EBUS/EUS-b TBNA) (58, 59).

### **2.2.3. Indicaciones**

En general, cualquier patología que pueda afectar a AHM, ya sea benigna o maligna, podría ser subsidiaria de estudio mediante EBUS-TBNA con un rendimiento diagnóstico elevado que variará dependiendo de la patología de base (60).

#### **2.2.3.1. Diagnóstico y estadificación del CPCNP**

El EBUS-TBNA tiene un papel establecido tanto en el diagnóstico como en la estadificación mediastínica de los pacientes con CPCNP. Aunque históricamente, la mediastinoscopia había sido la técnica de elección para el estudio de las adenopatías mediastínicas en estos pacientes, la menor morbilidad del EBUS-TBNA, junto con una rentabilidad diagnóstica similar y el hecho de no requerir quirófano ni anestesia general, justifican el uso de esta técnica endoscópica como primera opción en la valoración del mediastino.

Así pues, la capacidad del EBUS-TBNA para proporcionar en un mismo procedimiento el diagnóstico y la estadificación de los pacientes con CP, hace que actualmente sea la técnica de elección inicial en el proceso diagnóstico de estos pacientes con una sensibilidad, valor predictivo negativo y precisión diagnóstica del 92%, 90% y 95% respectivamente (61).

#### **2.2.3.2. Linfadenopatías mediastínicas no neoplásicas**

En los últimos años, las indicaciones del EBUS-TBNA han crecido exponencialmente. Su eficacia diagnóstica ha quedado demostrada en enfermedades como la sarcoidosis o la tuberculosis (62, 63).

En el caso de la sarcoidosis pulmonar, la aparición del EBUS-TBNA ha facilitado su diagnóstico, evitando la realización de otras técnicas más invasivas y costosas, disminuyendo así el riesgo de complicaciones asociadas. La rentabilidad diagnóstica del EBUS en esta patología es muy alta, llegando a alcanzar una sensibilidad, especificidad y precisión del 84%, 100% y 79% respectivamente (64).

Por otro lado, son varios los estudios que demuestran la utilidad del EBUS-TBNA en el diagnóstico de infecciones pulmonares. Cabe destacar, la relevancia de esta técnica en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) donde las infecciones oportunistas pueden ser frecuentes. En este escenario, el EBUS-TBNA puede ser de gran utilidad facilitando el diagnóstico de múltiples patologías como la tuberculosis, la histoplasmosis o la criptococosis (65).

### **2.2.3.3. Papel del EBUS en síndromes linfoproliferativos**

En lo que respecta al papel diagnóstico del EBUS en el ámbito de los síndromes proliferativos, se ha suscitado un notable interés en los últimos años, aunque su papel aún no está completamente definido. En este contexto, donde resulta crucial llevar a cabo una tipificación precisa de la lesión, las muestras citológicas no han demostrado ser tan efectivas, lo que ha contribuido a resultados controvertidos en los estudios llevados a cabo hasta la fecha (66, 67).

Sin embargo, en los últimos años la creciente utilización de criosondas (crio-EBUS) para la obtención de muestras histológicas de las adenopatías ha permitido obtener resultados muy prometedores. No obstante, son necesarios estudios prospectivos que definan mejor el papel del crio-EBUS en el manejo diagnóstico de los síndromes mieloproliferativos (68, 69).

### **2.2.4. Limitaciones**

Como cualquier técnica, el EBUS-TBNA no está exenta de limitaciones. En primer lugar, se ha de señalar que, mediante esta técnica, y como se ha mencionado con

anterioridad, no se puede acceder a todos los territorios ganglionares. Así adenopatías localizadas en la región subaórtica (5), paraaórtica (6), paraesofágica (8) y el ligamento pulmonar (9), no son accesibles mediante este procedimiento (57).

Por otro lado, destacar que pueden existir limitaciones técnicas como la dificultad para atravesar la pared traqueobronquial debido al endurecimiento en aquellos pacientes que hayan recibido radioterapia previa. Finalmente, cabe señalar su papel limitado en el genotipado o en la filiación específica de los linfomas.

### **2.2.5. Complicaciones**

El EBUS-TBNA es un procedimiento seguro, con tasas de complicaciones menores que oscilan entre el 0,1 y el 0,53% (70, 71). La mayoría de las complicaciones asociadas a este procedimiento vienen determinadas por la sedación o por la TBNA.

Las complicaciones tras la TBNA son infrecuentes si se toman las precauciones adecuadas y se emplea la técnica apropiada. Aunque se han descrito diversas complicaciones relacionadas con la TBNA, los daños en el canal de trabajo del broncoscopio son, con diferencia, los más frecuentes.

La presencia de fiebre y/o bacteriemia post-procedimiento también han sido descritas, sin embargo, no se pueden hacer recomendaciones firmes sobre la necesidad o no de profilaxis antibiótica (72, 73).

Suele ser habitual un mínimo sangrado en el lugar de la punción. La hemorragia masiva, incluso en pacientes que reciben anticoagulación o antiagregación, es excepcional (74, 75).

Otras complicaciones menos frecuentes incluyen neumotórax, neumomediastino, hemomediastino, fractura de la aguja, mediastinitis y trombosis vascular pulmonar en el área de punción (76-80).

### **2.2.6. Ampliando horizontes del EBUS-TBNA**

El EBUS-TBNA se ha ido posicionando en las unidades de endoscopia respiratoria, llegando a convertirse en una herramienta indispensable para los

neumólogos debido a su rendimiento diagnóstico, a su versatilidad y a su elevado perfil de seguridad. Sus indicaciones están creciendo de forma exponencial a medida que aparece nueva evidencia científica en diferentes escenarios. Sin embargo, existen algunas situaciones donde el papel del EBUS-TBNA está aún por definir.

#### **2.2.6.1. Utilidad en situaciones clínicas especiales**

Como se ha mencionado con anterioridad, existe un riesgo incrementado de afectación mediastínica, N2 o N3, en determinados grupos de pacientes a pesar de disponer de un PET-TC negativo. En concreto se trataría de pacientes con tumores mayores de 30 mm, que tuvieran una localización central, o afectación hilar ipsilateral (N1 clínico) (36, 39). En estos casos, parece necesario descartar afectación mediastínica previo a la cirugía. En este sentido, existen estudios recientes que recomiendan una valoración del mediastino mediante EBUS-TBNA (81).

La necesidad de establecer una estrategia de estadificación integral del mediastino, es decir, la realización de una mediastinoscopia en pacientes con un EBUS-TBNA negativo cuando exista riesgo de afectación N2 o N3 oculto, es desconocida, pero potencialmente relevante.

#### **2.2.6.2. Utilidad en la era de la terapia dirigida**

A raíz del descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas, se ha producido un cambio de paradigma en el tratamiento del CPCNP que obliga a llevar a cabo numerosas determinaciones genéticas (EGFR, ALK, ROS, RET BRAF, NTRK, METex14, PDL1). Clásicamente, el estudio de biomarcadores se ha realizado de forma individualizada y secuencial (gen a gen), dando lugar a una escasa eficacia en términos de tiempo y obtención de tejido. Por otra parte, la biopsia continúa siendo el gold standard recomendado en las guías clínicas para la realización de las técnicas moleculares. No obstante, durante los últimos años se han introducido nuevas tecnologías de secuenciación múltiple que permiten el estudio simultáneo de paneles de genes en una sola reacción, optimizando así el tiempo de respuesta y la eficiencia diagnóstica con muestras histológicas.

Estudios recientes en pacientes intervenidos de CPCNP muestran una alta sensibilidad y reproducibilidad de las técnicas moleculares en tejido parafinado, pero su utilización en la práctica clínica en muestras citológicas en el CPCNP no ha sido validada.

Es en este escenario donde el papel del EBUS-TBNA podría ser determinante. Por un lado, permitiría realizar el diagnóstico y la estadificación mediastínica y por otro lado y en el mismo acto, podría facilitar la obtención de material citológico adecuado para identificar alteraciones genéticas con potenciales dianas terapéuticas.

### **2.2.6.3. Rentabilidad en neoplasia pulmonares extratorácicas**

Otra de las situaciones clínicas en las que el EBUS-TBNA podría tener un papel fundamental es en la evaluación de las AHM en pacientes con neoplasias extratorácicas (NE).

Se ha demostrado que hasta un 30% de las AHM consideradas radiológicamente patológicas en pacientes con antecedentes de NE (adenopatías mayores a 10 mm en la TC o con una captación patológica en la PET) no son debidas a infiltración metastásica por la enfermedad extratorácica, sino que son secundarias a infecciones o procesos inflamatorios (82-84). Por tanto, con el fin de determinar una estrategia terapéutica óptima y poder establecer el pronóstico, la correcta caracterización de estas AHM será fundamental.

## 3. FUNDAMENTOS DE LA TESIS



### 3. FUNDAMENTOS DE LA TESIS

Los fundamentos generales en los que se basa la presente tesis son:

1. El CP es el cáncer con mayor mortalidad global. La correcta estadificación de la enfermedad es determinante para establecer el pronóstico y seleccionar el tratamiento óptimo.
2. El EBUS-TBNA es la técnica de elección en la estadificación mediastínica en pacientes con CPCNP. Esto se debe fundamentalmente a su alta rentabilidad diagnóstica, siendo considerada una técnica menos invasiva que los procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, la utilidad del EBUS-TBNA en situaciones en las que no existe evidencia de afectación mediastínica radiológica (PET-TC) es controvertida.
3. La identificación de *drivers genéticos* potencialmente tratables y la inmunoterapia han supuesto una revolución en el tratamiento de los pacientes con CPCNP, al permitir el desarrollo de nuevas terapias que han mejorado de manera sustancial el pronóstico y la calidad de vida de este grupo de pacientes.
4. Las muestras citológicas obtenidas mediante EBUS-TBNA podrían ser suficientes para obtener el diagnóstico específico y confirmar la afectación mediastínica en pacientes con CPCNP. Por otro lado, mediante técnicas de secuenciación múltiple se podrían determinar las características genotípicas concretas. Todo ello optimizaría el manejo clínico del paciente y evitaría pruebas diagnósticas invasivas adicionales.
5. La utilidad del EBUS-TBNA en la afectación mediastínica por neoplasias extratorácicas es conocida pero su rentabilidad y repercusión pronóstica no están bien determinadas.

La presente tesis doctoral pretende conocer el papel del EBUS en determinados escenarios clínicos en los que su rentabilidad es controvertida, así como averiguar su capacidad para identificar *drivers genéticos* que permitan individualizar los tratamientos oncológicos.

### **Artículo 1**

La afectación mediastínica en pacientes con CPCNP determina no sólo la actitud terapéutica si no también el pronóstico de estos pacientes. El objetivo del presente estudio fue conocer la aportación de una estadificación mediastínica integral (EBUS-TBNA seguido de MCE) en un grupo de pacientes con factores de riesgo para MMO pero sin afectación mediastínica radiológica.

### **Artículo 2**

El interés de este estudio se basa en valorar la utilidad de las muestras citológicas obtenidas mediante EBUS-TBNA para un genotipado completo del CPCNP. Por otro lado, se pretende determinar si la información proporcionada por el análisis de las muestras del ganglio afecto es equiparable a la proporcionada por las biopsias del tumor primario.

### **Artículo 3**

A lo largo de la evolución de los pacientes con NE, es frecuente objetivar la aparición de adenopatías hilio-mediastínicas de significado incierto. A pesar de que técnicas de imagen como la TC o la PET pueden aportar información relevante, el abanico de posibilidades diagnósticas es muy amplio. Todo esto obliga a obtener muestras citológicas que confirmen la etiología específica del proceso. El papel del EBUS-TBNA en esta situación clínica y su rentabilidad concreta entre los diversos tumores que pueden afectar al mediastino es controvertido. Por otro lado, la relevancia pronóstica de la afectación mediastínica en la evolución de la enfermedad no está demostrada.

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



## **HIPÓTESIS**

Diferentes estudios han demostrado que en determinados pacientes con CP y pruebas de imagen (PET-TC) negativas, existe un riesgo incrementado de presentar invasión ganglionar mediastínica (N2-N3). Los factores de riesgo identificados son: la presencia de ganglios linfáticos hiliares patológicos en las pruebas de imagen (N1 clínico; cN1), los tumores de localización central y los tumores con un diámetro mayor de 30 mm. En estos casos parece evidente que está indicado realizar un EBUS-TBNA antes de la cirugía, pero se desconoce la rentabilidad de realizar una evaluación mediastínica integral. Es decir, cual es el valor añadido de realizar una VAM en pacientes de riesgo cuando el EBUS-TBNA ha sido previamente negativo.

Actualmente la biopsia del tejido afectado por el CP (ya sea el tumor primario, ganglios o metástasis) es la muestra de referencia para la realización de estudios genéticos en el CP. La posibilidad de realizar dichos estudios en muestras citológicas obtenidas mediante EBUS-TBNA facilitaría el manejo clínico de estos pacientes al tratarse de una técnica mínimamente invasiva, segura y coste-efectiva. Conocer la utilidad de las muestras de AHM, obtenidas mediante EBUS-TBNA, para el análisis molecular y la correlación existente entre ellas y las muestras de referencia (biopsias del tumor primario) será determinante para clarificar el papel del EBUS en el manejo diagnóstico de los pacientes con CP.

Por otro lado, la presencia de AHM en pacientes afectos de NE es relativamente frecuente. A menudo dicha afectación mediastínica es debida a metástasis del tumor primario. Sin embargo, hasta en un 30% de los casos se debe a patología benigna, ya sea por procesos inflamatorios o infecciosos o secundarios al tratamiento oncológico establecido. Dada la relevancia clínica que supone conocer la posible afectación metastásica de las AHM, es obligada una caracterización citológica adecuada. En este sentido, la rentabilidad del EBUS-TBNA en el estudio de las AHM de pacientes con diversos tipos de NE no está bien establecida. Por otro lado, tampoco se conoce la implicación pronóstica de la afectación metastásica de dichos ganglios.

## **OBJETIVOS**

1. Valorar de manera prospectiva la utilidad de una evaluación mediastínica integral (realización de VAM después de un EBUS-TBNA negativo) en pacientes con CPCNP con factores de riesgo para MMO. Adicionalmente, se analizará la prevalencia de la enfermedad N2/N3 y el rendimiento diagnóstico del EBUS-TBNA en este grupo de pacientes.
2. Analizar la utilidad de las muestras citológicas de EBUS-TBNA para el análisis molecular utilizando técnicas de genotipado múltiple (NGS y nCounter) y estudio inmunohistoquímico (IHQ) (determinación de PD-L1) en pacientes con CPCNP. Posteriormente, se va a evaluar la reproducibilidad de los resultados del análisis molecular entre muestras citológicas y biopsias bronquiales de pacientes con CPCNP.
3. Conocer la rentabilidad diagnóstica global y específica del EBUS-TBNA en pacientes con NE y presencia de AHM, así como determinar la implicación pronóstica de la afectación neoplásica mediastínica por la enfermedad de base.

# 5. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS



**ARTÍCULO 1**

**“Integral Mediastinal Staging In Patients  
With Non-Small Cell Lung Cancer And Risk  
Factors For Occult N2 Disease”**

Lucena CM, **Martín-Deleon R**, Boada M, Marrades RM, Sánchez D, Sánchez M, Vollmer I, Martínez D, Fontana A, Reguart N, Molins L, Agustí C.

*Respir Med* 2023; 208:107132. doi: 10.1016/j.rmed.2023.107132.





Contents lists available at ScienceDirect

Respiratory Medicine

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rmed](http://www.elsevier.com/locate/rmed)

Original Research

## Integral mediastinal staging in patients with NON-SMALL cell lung cancer and risk factors for occult N2 disease



Carmen M. Lucena<sup>a</sup>, Roberto Martin-Deleon<sup>a</sup>, Marc Boada<sup>b</sup>, Ramon M. Marrades<sup>a</sup>, David Sánchez<sup>b</sup>, Marcelo Sánchez<sup>c</sup>, Ivan Vollmer<sup>c</sup>, Daniel Martínez<sup>d</sup>, Ainhoa Fontana<sup>a</sup>, Noemi Reguart<sup>e,f</sup>, Laureano Molins<sup>b</sup>, Carlos Agustí<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Pulmonary Service, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Thoracic Surgery Service, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Radiology Service, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Pathology Service, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

<sup>e</sup> Medical Oncology Service, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic, Barcelona, Spain

<sup>f</sup> Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Endobronchial ultrasound  
Lung cancer staging  
Mediastinoscopy  
N2 disease

### ABSTRACT

**Background:** In patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), the presence of abnormal hilar lymph nodes (clinical N1; cN1), central tumor location and/or tumor size (diameter >3 cm) increases the risk of occult mediastinal metastasis (OMM). This study investigates prospectively the diagnostic value of an integral mediastinal staging (IMS) strategy that combines Endobronchial Ultrasound-TransBronchial Needle Aspiration (EBUS-TBNA) and Video-Assisted Mediastinoscopy (VAM) in patients with NSCLC at risk of OMM.

**Methods:** Patients with NSCLC and radiologically normal mediastinum assessed non-invasively by positron emission tomography and computed tomography of the chest (PET-CT), and OMM risk factors (cN1, central tumor and/or >3 cm) underwent EBUS-TBNA followed by VAM if the former was negative. Those with negative IMS underwent resection surgery of the tumor.

**Results:** EBUS-TBNA identified OMM in 2 out of the 49 patients evaluated (4%) and VAM in 1 of the 47 patients with negative EBUS (2%). Two patients with a negative IMS had OMM at surgery. Overall, the prevalence of OMM was 10%. EBUS-TBNA has a sensitivity of 40%, a negative predictive value (NPV) of 93.6%, and negative likelihood ratio of 0.60 (95%CI:0.30–1.16). The risk of not diagnosing OMM after EBUS was 6% and after IMS was 4.4%.

**Conclusion:** Integral mediastinal staging in patients with NSCLC and clinical risk factors for OMM, does not seem to provide added diagnostic value to that of EBUS-TBNA, except perhaps in patients with cN1 disease who deserve further research.

### 1. Introduction

Lung cancer (LC) is the first cause of cancer death worldwide both in males and females [1]. Because mediastinal node involvement determines treatment options and prognosis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), their mediastinal staging should exclude the presence of mediastinal node metastasis with the highest certainty and

the lowest morbidity [2–5]. The combination of positron emission tomography and computed tomography (PET-CT) is useful in clinical practice to detect mediastinal node invasion. The negative predictive value (NPV) of PET-CT is high, so most patients can go straight to surgery [2,3], but it is important to exclude potential false positive results [6]. Different studies have shown that the risk of occult mediastinal metastasis (OMM), this is clinical N2 or N3, increases with the presence

**Abbreviations:** cN1, clinical N1; EBUS-TBNA, endobronchial ultrasound-transbronchial needle aspiration; ESTS, European Society of Thoracic Surgery; EUS, esophageal endoscopic ultrasound; FDG, F-fluorodeoxyglucose; IMS, integral mediastinal staging; LC, lung cancer; MDT, multi-disciplinary team; NPV, negative predictive value; NSCLC, non-small cell lung cancer; OMM, occult mediastinal metastasis; PET-CT, Positron emission tomography with computed tomography; ROSE, rapid on-site evaluation; VAM, video-assisted mediastinoscopy.

\* Corresponding author. Insitució Clínic del Tórax, Hospital Clínic de Barcelona, 170 Villarroel, 08036, Barcelona, Spain.

E-mail address: [cagusti@clinic.cat](mailto:cagusti@clinic.cat) (C. Agustí).

<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2023.107132>

Received 2 August 2022; Received in revised form 24 January 2023; Accepted 26 January 2023

Available online 30 January 2023

0954-6111/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

of abnormal hilar lymph nodes (clinical N1; cN1), when the tumor is centrally located and/or when it is larger than 3 cm in diameter, even if the mediastinal PET-CT is negative [4,5,7,8]. Whether these patients at risk of OMM require systematic mediastinal evaluation before surgery as well as the specific procedure to do it (EndoBronchial Ultrasound-TransBronchial Needle Aspiration (EBUS-TBNA) vs. Video-Assisted Mediastinoscopy (VAM)) is unclear [9,10]. The potential role of an integral mediastinal staging (IMS) strategy, this is performing VAM despite a previously negative EBUS-TBNA in patients at risk of OMM, is unknown but potentially relevant [11]. Accordingly, this study sought to evaluate prospectively the usefulness of IMS in patients with NSCLC at risk of OMM, the prevalence of N2/N3 disease and the diagnostic yield of EBUS-TBNA in this setting.

## 2. Methods

### 2.1. Study design and ethics

Prospective study to determine diagnostic yield of an IMS, which includes EBUS-TBNA followed by VAM if the result of EBUS mediastinal staging was negative, in patients with NSCLC and negative mediastinal PET-CT but at risk of OMM, including either cN1, had a central tumor and/or the latter was larger than 3 cm in diameter. If VAM confirmed the absence of mediastinal metastasis, surgical resection was indicated. The time elapsed between EBUS and surgery never exceeded 4 weeks. Patients in whom IMS showed the presence of lymph node metastasis were excluded for surgery, and other therapeutic option were offered.

All participants signed their informed consent before mediastinal staging and surgery. The study protocol was approved by the Ethics Committee of our institution (HCB/2022/0172).

### 2.2. Study population

We included in the study patients with NSCLC diagnosed according to international recommendations [2,3] and staged followed the 8th edition of the TNM classification [12,13]. Exclusion criteria included patients older than 85 years, diagnosis of small cell LC, previous LC resection, low performance status and lung function tests precluding surgical resection. Patients included in this prospective study were evaluated from April 2015 to April 2019.

### 2.3. Non-invasive mediastinal nodal staging

Thoracoabdominal CT was performed on all patients at the time of diagnosis with different equipment's (Siemens Sensation 16, Siemens Sensation 64 and Siemens Flash 128; Elargen, Germany). All the studies were carried out after injection of iodinated contrast and with the same exploration protocol.

PET-CT scans were performed after 6 h fasting period following intravenous administration of 18F-FDG, using a Biograph mCT TrueV PET-CT hybrid device (Siemens, USA) with a low-dose CT for attenuation correction and image fusion. PET data reconstruction was performed with a standard iterative algorithm from CT records.

Negative mediastinum by CT was defined as the absence of hilar-mediastinal lymph nodes or, if present, with a short-axis diameter <10 mm. Similarly, PET was considered negative when there was minimum (similar to the surrounding mediastinum) or no mediastinal lymph nodes F-fluorodeoxyglucose (FDG) uptake. Tumor size was determined by measuring the larger CT diameter in lung window. Centrality was considered when at least half of the tumor was located in the inner third of the lung on transverse CT scan, and cN1 was defined as the presence of hilar lymph nodes  $\geq 10$  mm on the short axis on CT scan and/or FDG-PET uptake in N1 nodes [13].

### 2.4. Invasive mediastinal nodal staging

#### 2.4.1. EndoBronchial UltraSound-TransBronchial needle aspiration (EBUS-TBNA)

EBUS was performed in the bronchoscopy unit using a convex probe ultrasound bronchoscope (Pentax EB-1970UK 2.0) and 22-gauge needle (Echotip® Ultra, Cook Medical, US). Conscious sedation was performed by an anesthesiologist using a continuous infusion of propofol and remifentanyl and maintaining spontaneous breathing throughout the procedure. A systematic nodal evaluation with the EBUS was done according to clinical guidelines [2,3,14] starting with the exploration of N3 hilar stations followed by N2. All identified lymph nodes with a minor diameter of  $\geq 5$  mm were sampled. The cytological preparation was performed with both air-dried and wet-fixed methods. Aspirates were placed in formaldehyde solution to cell block preparation. To ensure the sample quality, a rapid on-site evaluation (ROSE) was done. Lymph node was considered to be non-malignant after 3 needle passes per station showing normal lymphocytes with no atypical cells. In case of malignant cell identification, ROSE confirmed that sufficient material for identification, subtyping and molecular testing was available. Cytological samples were classified as neoplastic when definitive features of malignancy were identified in the obtained sample and non-neoplastic when there were cytological findings of a specific benign condition and/or presence of lymphocytes in a significant number consistent with normal lymph node (more than 150 lymphocytes/field) [15].

#### 2.4.2. Video-assisted mediastinoscopy (VAM) and surgical resection

All patients with negative EBUS results undergone VAM under general anesthesia in an operating room. A transverse cervicotomy was carried out until the opening of pretracheal fascia. Videomediastinoscope was introduced into the mediastinum after finger blunt dissection. A systematic assessment of right and left paratracheal and subcarinal spaces (2R, 2L, 4R, 4L and 7) was performed in all cases according to current guidelines [2,3]. Patients with VAM negative results according to the European Society of Thoracic Surgery (ESTS) guidelines on intraoperative systematic nodal dissection [16] underwent surgical resection of the lung tumor and mediastinal dissection.

### 2.5. Statistical analysis

Results are expressed as absolute and relative frequencies for categorical variables and as mean  $\pm$  SD for continuous variables. The accuracy, sensitivity, NPV and negative likelihood ratio of EBUS and VAM were computed using standard definitions [17].

## 3. Results

### 3.1. Patients characteristics

Fig. 1 presents the consort diagram of the study. During the study period, we assessed 63 patients with NSCLC and risk factors for OMM; 49 of them (78%) were finally enrolled in the study. Six patients were excluded due to a low performance status and 8 because they were already included in another clinical trial [18].

Table 1 summarizes the clinical characteristics of the 49 patients included. Their mean age was  $66 \pm 9.4$  years. The most common risk factor for OMM were tumor size (88%), followed by centrality (35%) and cN1 (24%). Seven patients (14%) had the three of them, 10 (20%) had a central and large (>3 cm) tumor, and 5 (10%) had cN1 and also a large tumor.

### 3.2. Mediastinal staging

In the 49 patients in whom EBUS was performed, a total of 52 lymph nodes were sampled, with a mean of  $1.04 \pm 0.8$  nodal station samples/

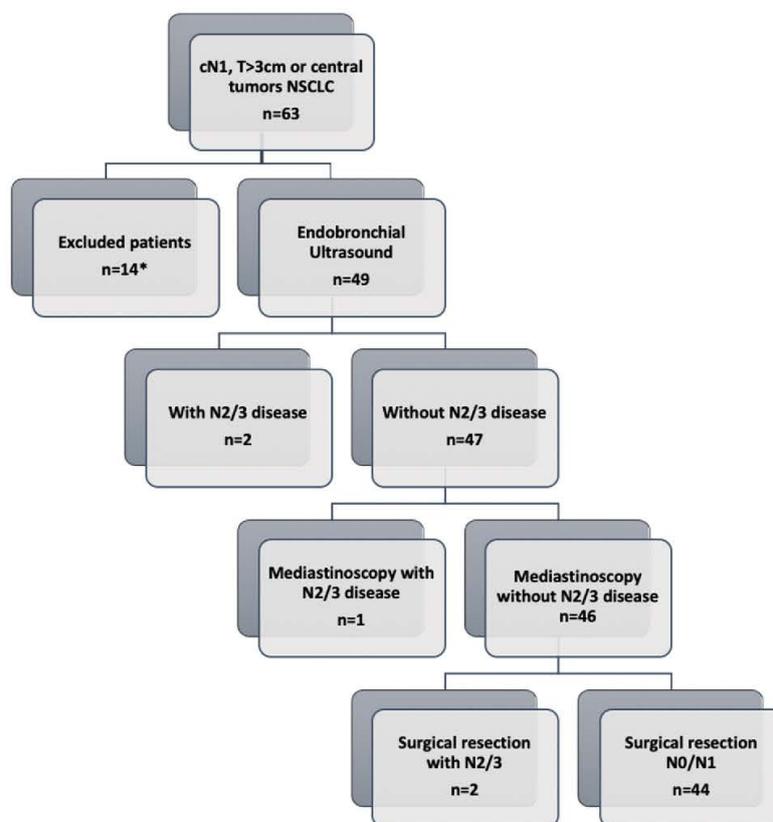


Fig. 1. Consort diagram of the study.

patient. The mean diameter of the punctured lymph nodes was  $9.3 \pm 2.9$  mm. The most commonly sampled stations were the subcarinal (station 7) (52%), followed by the low right paratracheal (station 4R) (13%). There were no complications with the procedure.

As illustrated in Fig. 1, EBUS-TBNA identified metastatic lymph node invasion in 2 of the 49 patients evaluated (4%), one with a tumor >3 cm and a positive contralateral hilar lymph node (N3 disease) and the other one with a central tumor >3 cm and cN1 disease in whom EBUS-TBNA identified a positive right low paratracheal lymph node (station 4R).

VAM was then performed in the 47 patients with a negative EBUS-TBNA and it identified an additional mediastinal nodal metastasis (station 4R, N2 disease) in one patient (2.1%) (Fig. 1). Then, the 46 patients with no evidence of mediastinal involvement after IMS were referred to surgical resection during which 2 additional patients with metastatic mediastinal invasion were identified after systematic nodal dissection (4.3%). One of them with a positive right low paratracheal lymph node (station 4R, N2 disease) and the other with invasion of the subaortic lymph node (station 5, N2 disease) (Fig. 1). Overall, the prevalence of OMM in the study population was 10.2%.

### 3.3. Risk factors for mediastinal invasion

Table 2 presents the individual data of the 5 patients with mediastinal lymph node invasion after IMS or surgery. Four of them (80%) had a tumor size >3 cm and 3 (60%) were classified as cN1 after the PET-CT study. In one of the latter 3 patients with undetected N2 disease by EBUS-TBNA, the involved station was out of reach of the procedure

(station 5L).

The probability of having OMM was 9% in patients with a lung tumor higher than 3 cm in diameter, 6% in those with a central location of the tumor and 25% in those with cN1.

### 3.4. Diagnostic accuracy

The sensitivity of EBUS-TBNA for detecting mediastinal invasion was 40%, the NPV was 93.6%, and the negative likelihood ratio was 0.60 (95%CI: 0.30–1.16). The sensitivity, NPV and negative likelihood ratio for VAM (after a negative EBUS) were 60%, 95.6% and 0.67 (95%CI: 0.30–1.35) respectively. According to these results the risk of overlooking OMM (N2/N3 disease) after both negative EBUS and VAM was 4.4%.

## 4. Discussion

Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for NSCLC states that when there are no abnormal lymph nodes on PET-CT, preoperative mediastinal staging is indicated in patients with central tumors, clinical N1 nodes and/or tumors larger than 3 cm [3]. The choice between endoscopic staging with EBUS/EUS or video-assisted mediastinoscopy depends on local expertise. What is not known is the added value of VAM in this selected group of patients where EBUS is negative.

This is the first study to evaluate prospectively the utility of IMS strategy that combines EBUS-TBNA and VAM to diagnose mediastinal

**Table 1**  
Characteristics of included patients (n = 49).

Characteristics	Values
Age, years, m ± SD	66 ± 9.4
Male sex, n (%)	32 (65)
Smoking status, n (%)	
Never smoker	9 (18)
Prior smoker	28 (57)
Current smoker	12 (25)
Lobar location, n (%)	
Right upper lobe	21 (43)
Right middle lobe	1 (2)
Right lower lobe	9 (18)
Left upper lobe	10 (20)
Left lower lobe	8 (16)
Histology, n (%)	
ADC	26 (53)
SCC	19 (39)
Neuroendocrine tumor	2 (4)
ADC + SCC	1 (2)
ADC + Neuroendocrine tumor	1 (2)
Risk factors, n (%)	
T > 3 cm	43 (88)
Central tumor	17 (35)
cN1 stage	12 (24)
Stage, n (%)	
IA3	1 (2)
IB	17 (35)
IIA	13 (27)
IIB	5 (10)
IIIA	10 (20)
IIIB	1 (2)
IVA	2 (4)

Abbreviations: ADC: Adenocarcinoma; SCC: Squamous cell carcinoma.

disease in patients with NSCLC, negative mediastinum on imaging and risk factors for OMM. Main results show that, in this patient population: (1) the prevalence of OMM is low (10%); (2) EBUS-TBNA has a low sensitivity (40%) but a high NPV (94%); and that (3) the added value of VAM to detect OMM in patients with a previously negative EBUS-TBNA is small since it reduces the probability of detecting OMM only from 6% to 4%.

4.1. Previous studies

Several previous studies have evaluated the role of EBUS-TBNA in NSCLC patients with radiologically normal mediastinum [4,19]. Most of them are retrospective, include patients with or without clinical risk factors for OMM, use different methodology for performing EBUS-TBNA (type of anesthesia, presence of ROSE, thoroughness of the endoscopic exploration) and often employ only one (CT or PET-CT) imaging technique for considering the mediastinum “negative”. Likely because this heterogeneity, the reported prevalence of OMM in these studies is highly variable. In a meta-analysis of these previous investigations, El-Osta et al. showed that the prevalence of OMM was 12.8%, and the EBUS-TBNA sensitivity and NPV were 49.5% and 93% respectively, and concluded that a negative pre-operative EBUS-TBNA in the absence of

radiologic mediastinal involvement indicates a low probability of OMM [20]. Similar results were observed in a sub-analysis of the ASTER trial in patients with negative mediastinum on imaging, that showed that despite a high prevalence of mediastinal metastasis (24%), the probability of OMM after a negative integral endo-sonography (both EBUS and esophageal endoscopic ultrasound-EEUS-) was only 9% [11]. This suggests that the addition of VAM staging may expose patients to potential complications of the surgical procedure without a clear-cut clinical benefit. The choice between endo-sonography vs VAM depends on local expertise, but beginning mediastinal staging with EBUS-TBNA, which is cheaper and safer than VAM [9,21,22], seems a reasonable option. What is not known and constitutes the primary aim of the present study is the added value of VAM after a negative previous EBUS-TBNA in patients with NSCLC at risk of OMM.

4.2. Interpretation of findings

The present prospective study, using well defined criteria for patient’s selection and performance of the staging techniques, shows that the prevalence of OMM in patients at risk was 10%, just around the threshold proposed by the ESTS as reasonable for proceeding to mediastinal staging [3]. However, a diagnostic procedure with a post-test probability of 5% means that the result is highly accurate and that no further investigations are necessary [23]. In our study the post-test probability of having OMM after a negative EBUS-TBNA was 6% and the addition of VAM decreased it to 4%. This reduced added diagnostic value of VAM, its cost, potential morbidity and time delay entailing the performance of two consecutive staging procedures, make VAM not advisable in this clinical setting. Thus, our results indicate that patients with negative mediastinum on imaging and a negative EBUS-TBNA may go straight to surgery without VAM. In this scenario, lymph node dissection should be routinely performed to recognize the potentially missed mediastinal involvement.

In contrast with the high diagnostic yield of EBUS-TBNA in patients with pathological mediastinum on imaging, the sensitivity of EBUS-TBNA is rather low in patients with negative mediastinum on imaging and OMM. It is known that both sensitivity and NPV depend upon the overall prevalence of N2/N3 metastasis in the population undergoing EBUS. In particular, sensitivity is positively correlated with the overall prevalence of N2/N3 disease, whereas NPV is negatively correlated [24]. Actually, it can reflect some interesting biological differences in the lymph nodes since larger and FDG-avid nodes might have diffuse metastatic involvement whereas normal sized and non FDG-avid one may reflect the presence of microscopic metastasis. Theoretically, the presence of false negative samples by EBUS-TBNA would be higher in the latter situation. Our results are in line with this hypothesis since 2 of the 3 patients with mediastinal nodal disease not detected by EBUS-TBNA, had localized intracapsular neoplastic infiltration.

Finally, we recruited patients with different clinical risk factors assuming that the risk for having OMM between them was equiposed, but probably this is not the case. In our study the risk of having OMM in patients with central tumors or a tumor size ≥3 cm was rather low (9% and 6% respectively), suggesting that in this specific group of patients a negative EBUS should preclude the performance of VAM. By contrast,

**Table 2**  
Occult mediastinal metastasis identified by invasive mediastinal staging or surgery.

Mediastinal Staging	Node Involvement	Sex	Age (years)	Primary tumor location	OMM risk factors	Tumor size (cm)	N stage	Histology
EBUS	11R	male	72	LLL	T > 3	4.1	N3	ADC
EBUS	4R	male	68	RUL	T > 3 + Central tumor + cN1	4.5	N2	ADC
VAM	4R <sup>a</sup>	male	76	RUL	T > 3	4	N2	ADC
Surgery	4R <sup>a</sup>	male	79	RML	T > 3 + cN1	3.3	N2	SCC + ADC
Surgery	5L	female	49	LUL	cN1	0.7	N2	NEC

Abbreviations: OMM: Occult mediastinal metastasis; EBUS: Endobronchial Ultrasound; VAM: Video Assisted Mediastinoscopy; LLL: left lower lobe, RUL: right upper lobe; RML: right middle lobe; LUL: left upper lobe; ADC: Adenocarcinoma; SCC: Squamous cell carcinoma; NEC: Neuroendocrine carcinoma.

<sup>a</sup> Intracapsular.

the chance of having OMM increases up to 25% when the risk factor considered is the presence of N1 by imaging. Other studies have shown similar percentages of OMM in patients with cN1 disease [18,25]. Notoriously two different multicenter studies have shown that, in this group of patients, VAM after a negative EBUS-TBNA had a much higher sensitivity (38% vs 73%) [11,18]. Although a recent meta-analysis by Leong et al. improved EBUS-TBNA sensitivity up to 49% in this clinical setting, it seems that endo-sonography alone has an unsatisfactory sensitivity to detect mediastinal nodal metastasis in patients with cN1 disease, and the addition of a confirmatory mediastinoscopy adds value [18,26]. The low prevalence of mediastinal metastasis and the relative low number of patients with cN1 disease in our cohort preclude us to provide any firm conclusion in this regard.

#### 4.3. Potential limitations

We acknowledge the following limitations of our study. First, sample size is relatively small since patients were enrolled in a single University Hospital. Yet, our results are in line with previous results with respect to both the prevalence of OMM and the diagnostic yield of the staging procedures. Future studies in larger, multicenter cohorts are needed to confirm or dispute our findings. Second, guidelines support integral endo-sonography (combined EBUS and EUS) as the most efficient way to perform stage the mediastinum. In the present study we only performed EBUS-TBNA. Potentially, the addition of EUS might have improved the diagnostic yield of clinical staging, but this would have made VAM even less useful.

#### 5. Conclusions

Integral mediastinal staging, that includes VAM after a negative EBUS-TBNA, in patients with NSCLC and clinical risk factors for OMM, does not provide added diagnostic value to that of EBUS-TBNA, except perhaps in patients with cN1 disease who deserve further research.

#### Funding

This research didn't receive grants from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

#### Data availability statement

All data generated or analysed during this study are included in this report. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

#### CRedit authorship contribution statement

**Carmen M. Lucena:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Project administration, Resources, Writing – original draft. **Roberto Martín-Deleon:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Resources, Validation, Writing – original draft. **Marc Boada:** Investigation, Methodology, Resources. **Ramon M. Marrades:** Methodology, Resources, Visualization. **David Sánchez:** Methodology, Resources, Supervision. **Marcelo Sánchez:** Resources, Software. **Ivan Vollmer:** Resources, Software. **Daniel Martínez:** Software, Validation. **Ainhoa Fontana:** Resources, Software, Validation. **Noemi Reguart:** Software, Supervision, Validation. **Laureano Molins:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Software, Supervision, Validation. **Carlos Agustí:** Conceptualization, Formal analysis, Methodology, Data curation, Supervision, Validation, Writing – review & editing.

#### Declaration of competing interest

NR reports having received research grant support from Pfizer and personal fees from Roche, MSD, Takeda, Amgen, Bayer and Pfizer, outside the submitted work. CML, RMD, MB, RMM, DS, MS, IV, DM, AF,

LM, CA have no conflicts of interest to declare.

#### Acknowledgements

Authors thank study participants for their willingness to contribute to medical research. We are grateful to the rest of members of Thoracic Oncology Unit for their daily work and support in this study. Special thanks to Prof. Alvar Agustí for his contribution in the preparation of the manuscript.

#### References

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R.L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, F. Bray, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J. Clin.* 71 (2021) 209–249.
- [2] P. De Leyn, C. Dooms, J. Kuzdzal, D. Lardinois, B. Passlick, R. Rami-Porta, A. Turna, P. Van Schil, F. Venuta, D. Waller, W. Weder, M. Zielinski, Preoperative mediastinal lymph node staging for non-small cell lung cancer: 2014 update of the 2007 ESTS guidelines, *Transl. Lung Cancer Res.* 3 (2014) 225–233.
- [3] P. De Leyn, C. Dooms, J. Kuzdzal, D. Lardinois, B. Passlick, R. Rami-Porta, A. Turna, P. Van Schil, F. Venuta, D. Waller, W. Weder, M. Zielinski, Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer, *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* 45 (2014) 787–798.
- [4] T.M.H. Naur, L. Konge, P.F. Clementsen, Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for staging of patients with non-small cell lung cancer without mediastinal involvement at positron emission tomography-computed tomography, *Respiration* 94 (2017) 279–284.
- [5] A. Gómez-Caro, M. Boada, M. Cabañas, M. Sanchez, P. Arguis, F. Lomeña, J. Ramirez, L. Molins, False-negative rate after positron emission tomography/computer tomography scan for mediastinal staging in cI stage non-small-cell lung cancer, *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* 42 (2012) 93–100 (discussion).
- [6] K.G. Tournoy, S. Maddens, R. Gossein, G. Van Maele, J.P. van Meerbeeck, A. Kelles, Integrated FDG-PET/CT does not make invasive staging of the intrathoracic lymph nodes in non-small cell lung cancer redundant: a prospective study, *Thorax* 62 (2007) 696–701.
- [7] K. Yasufuku, T. Hakajima, K. Motoori, Y. Sekine, K. Shibuya, K. Hiroshima, T. Fujisawa, Comparison of endobronchial ultrasound, positron emission tomography, and CT for lymph node staging of lung cancer, *Chest* 130 (2006) 710–718.
- [8] P.C. Lee, J.L. Port, R.J. Korst, Y. Liss, D.N. Meherally, N.K. Altorki, Risk factors for occult mediastinal metastases in clinical stage I non-small cell lung cancer, *Ann. Thorac. Surg.* 84 (2007) 177–181.
- [9] J.T. Annema, J.P. van Meerbeeck, R.G. Rintoul, C. Dooms, E. Descheppe, O. M. Dekkers, P. De Leyn, J. Braun, M.R. Carroll, M. Praet, F. de Ryck, J. Vansteenkiste, F. Vermaesen, M.L. Versteegh, M. Veselic, A.G. Nicholson, K. F. Rabe, K.G. Tournoy, Mediastinoscopy vs endosonography for mediastinal nodal staging of lung cancer: a randomized trial, *JAMA* 304 (2010) 2245–2252.
- [10] K. Yasufuku, A. Pierre, G. Dattin, M. de Perrot, T. Waddell, M. Johnston, G. da Cunha Santos, W. Geddie, S. Boerner, L.W. Le, S. Keshavjee, 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.* 142 (2011), 1393–400.e1.
- [11] C. Dooms, K.G. Tournoy, O. Schuurbeers, H. Decaluwe, F. De Ryck, A. Verhagen, R. Beelen, E. van der Heijden, P. De Leyn, Endosonography for mediastinal nodal staging of clinical N1 non-small cell lung cancer: a prospective multicenter study, *Chest* 147 (2015) 209–215.
- [12] R. Rami-Porta, *Staging Manual in Thoracic Oncology*, second ed., North Fort Myers, 2016.
- [13] H. Asamura, K. Chansky, J. Crowley, P. Goldstraw, V.W. Rusch, J.F. Vansteenkiste, H. Watanabe, Y.L. Wu, M. Zielinski, D. Ball, R. Rami-Porta, International association for the study of lung cancer staging and prognostic factors committee AvBM, and participating institutions. The international association for the study of lung cancer lung cancer staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming 8th edition of the TNM classification for lung cancer, *J. Thorac. Oncol.* 10 (2015) 1675–1684.
- [14] C.M. Kinsey, D.A. Arenberg, Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for non-small cell lung cancer staging, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189 (2014) 640–649.
- [15] J.A. Gullón Blanco, M. Villanueva Montes, J. Rodríguez López, A. Sánchez Antuña, Negative endobronchial ultrasound in lung cancer staging, *Arch. Bronconeumol.* 53 (2017) 646–647.
- [16] D. Lardinois, P. De Leyn, P. Van Schil, R.R. Porta, D. Waller, B. Passlick, M. Zielinski, T. Lerut, W. Weder, ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer, *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* 30 (2006) 787–792.
- [17] D.G. Altman, J.M. Bland, Diagnostic tests. 1: sensitivity and specificity, *BMJ* 308 (1994) 1552.
- [18] H. Decaluwé, C. Dooms, X.B. D'Journo, S. Call, D. Sanchez, B. Haeger, R. Beelen, V. Kara, T. Kikiovits, C. Aigner, K. Tournoy, M. Zahin, J. Moons, G. Brioude, J. C. Trujillo, W. Klepetko, A. Turna, B. Passlick, L. Molins, R. Rami-Porta, P. Thomas, P. Leyn, Mediastinal staging by videomediastinoscopy in clinical N1 non-small cell lung cancer: a prospective multicentre study, *Eur. Respir. J.* 50 (2017).

- [19] P. Ong, H. Grosu, G.A. Eapen, M. Rodriguez, D. Lazarus, D. Ost, C.A. Jimenez, R. Morice, V. Bandi, L. Tamara, L. Cornwell, L. Green, A. Zhu, R.F. Casal, Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for systematic nodal staging of lung cancer in patients with N0 disease by computed tomography and integrated positron emission tomography-computed tomography, *Ann Am Thorac Soc* 12 (2015) 415–419.
- [20] H. B-Osta, P. Jani, A. Mansour, P. Rascoe, S. Jafri, Endobronchial ultrasound for nodal staging of patients with non-small-cell lung cancer with radiologically normal mediastinum. A meta-analysis, *Ann Am Thorac Soc* 15 (2018) 864–874.
- [21] M. Zakkat, C. Tan, I. Hunt, Is video mediastinoscopy a safer and more effective procedure than conventional mediastinoscopy? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 14 (2012) 81–84.
- [22] X. Ge, W. Guan, F. Han, X. Guo, Z. Jin, Comparison of endobronchial ultrasound-guided fine needle aspiration and video-assisted mediastinoscopy for mediastinal staging of lung cancer, *Lung* 193 (2015) 757–766.
- [23] K.G. Tournoy, S.M. Keller, J.T. Annema, Mediastinal staging of lung cancer: novel concepts, *Lancet Oncol.* 13 (2012) e221–e229.
- [24] G.A. Silvestri, A.V. Gonzalez, M.A. Jantz, M.L. Margolis, M.K. Gould, L.T. Tanoue, L.J. Harris, F.C. Detterbeck, *Methods for staging non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer*, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines, *Chest* 143 (2013) e2115–e505.
- [25] S. Watanabe, H. Asamura, K. Suzuki, R. Tsuchiya, Problems in diagnosis and surgical management of clinical N1 non-small cell lung cancer, *Ann. Thorac. Surg.* 79 (2005) 1682–1685.
- [26] T.L. Leong, P.M. Loveland, A. Gorelik, L. Irving, D.P. Steinfeldt, Preoperative staging by EBUS in cN0/N1 lung cancer: systematic review and meta-analysis, *J Bronchology Interv Pulmonol* 26 (2019) 155–165.

**ARTÍCULO 2**

**“EBUS-TBNA Cytological Samples for  
Comprehensive Molecular Testing in Non-  
Small Cell Lung Cancer”**

**Martin-Deleon R**, Teixido C, Lucena CM, Martinez D, Fontana A, Reyes R, García M, Viñolas N, Vollmer I, Sanchez M, Jares P, Pérez FM, Vega N, Marin E, Marrades RM, Agustí C, Reguart N.

*Cancers (Basel)* 2021; 13(9): 2084. doi: 10.3390/cancers13092084.





## Article

# EBUS-TBNA Cytological Samples for Comprehensive Molecular Testing in Non-Small Cell Lung Cancer

Roberto Martin-Deleon <sup>1,†</sup>, Cristina Teixido <sup>2,3,†</sup> , Carmen M<sup>a</sup> Lucena <sup>1</sup>, Daniel Martínez <sup>3</sup> , Ainhoa Fontana <sup>1</sup>, Roxana Reyes <sup>2,4</sup>, Mireia García <sup>3</sup>, Nuria Viñolas <sup>2,4</sup>, Ivan Vollmer <sup>5</sup> , Marcelo Sanchez <sup>5</sup> , Pedro Jares <sup>3</sup>, Francisco Manuel Pérez <sup>3</sup>, Naiara Vega <sup>3</sup>, Elba Marin <sup>2</sup> , Ramón M<sup>a</sup> Marrades <sup>1</sup>, Carlos Agustí <sup>1,‡</sup> and Noemi Reguart <sup>2,4,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Respiratory Medicine, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; robermartin48@gmail.com (R.M.-D.); cmlucena@clinic.cat (C.M.L.); afontana@clinic.cat (A.F.); marrades@clinic.cat (R.M.M.); cagusti@clinic.cat (C.A.)
- <sup>2</sup> Translational Genomic and Targeted Therapeutics in Solid Tumors, August Pi i Sunyer Biomedical Research Institute (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain; teixido@clinic.cat (C.T.); rmreyes@clinic.cat (R.R.); nvinolas@clinic.cat (N.V.); elmarin@clinic.cat (E.M.)
- <sup>3</sup> Department of Pathology, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; dmartin1@clinic.cat (D.M.); garcia01@clinic.cat (M.G.); pjares@clinic.cat (P.J.); fmperez@clinic.cat (F.M.P.); NVEGA@clinic.cat (N.V.)
- <sup>4</sup> Department of Medical Oncology, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain
- <sup>5</sup> Department of Radiology, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic de Barcelona, 08036 Barcelona, Spain; vollmer@clinic.cat (I.V.); msanche@clinic.cat (M.S.)
- \* Correspondence: nreguart@clinic.cat
- † These authors share first authorship.
- ‡ These authors share last authorship.



**Citation:** Martin-Deleon, R.; Teixido, C.; Lucena, C.M.; Martínez, D.; Fontana, A.; Reyes, R.; García, M.; Viñolas, N.; Vollmer, I.; Sanchez, M.; et al. EBUS-TBNA Cytological Samples for Comprehensive Molecular Testing in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 2084. <https://doi.org/10.3390/cancers13092084>

Academic Editor: Roberta Alfieri

Received: 17 March 2021

Accepted: 19 April 2021

Published: 25 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Endobronchial-ultrasound transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) is essential in the diagnosis and staging of NSCLC, but its usefulness for a full molecular characterization remains controversial. The aim of this prospective study was to assess if EBUS-TBNA samples were reliable for a comprehensive molecular and immunohistochemical testing in NSCLC. We prospectively evaluated EBUS-TBNA specimens for molecular characterization showing that they are useful for NSCLC genotyping and have the same potential to improve the selection of patients for personalized therapies as bronchial biopsy samples. EBUS-TBNA samples are reliable samples for NSCLC genotyping with the consequent potential to improve patient's selection for targeted therapies.

**Abstract:** Clinical guidelines promote the identification of several targetable biomarkers to drive treatment decisions in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC), but half of all patients do not have a viable biopsy. Specimens from endobronchial-ultrasound transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) are an alternative source of material for the initial diagnosis of NSCLC, however their usefulness for a complete molecular characterization remains controversial. EBUS-TBNA samples were prospectively tested for several biomarkers by next-generation sequencing (NGS), nCounter, and immunohistochemistry (PD-L1). The primary objectives were to assess the sensitivity of EBUS-TBNA samples for a comprehensive molecular characterization and to compare its performance to the reference standard of biopsy samples. Seventy-two EBUS-TBNA procedures were performed, and 42 NSCLC patients were diagnosed. Among all cytological samples, 92.9% were successfully genotyped by NGS, 95.2% by nCounter, and 100% by immunohistochemistry. There were 29 paired biopsy samples; 79.3% samples had enough tumor material for genomic genotyping, and 96.6% for PD-L1 immunohistochemistry. A good concordance was found between both sources of material: 88.9% for PD-L1, 100% for NGS and nCounter. EBUS-TBNA is a feasible alternative source of material for NSCLC genotyping and allows the identification of patient candidates for personalized therapies with high concordance when compared with biopsy.

**Keywords:** EBUS; cytology; NSCLC; PD-L1; nCounter; NGS

## 1. Introduction

Lung cancer is the most common malignancy worldwide and remains the first cause of cancer death in both men and women. Non-small cell lung cancer (NSCLC) constitutes 85% of all lung cancers and 60% of them are diagnosed in advanced stages with a median five-year survival of 15% [1]. However, the use of predictive cancer biomarkers in advanced NSCLC for specific targeted therapies and immunotherapies has emerged in recent decades, increasing positive patient outcomes [2]. Genomic profiling is now a standard of care in the routine diagnostic workup of patients with advanced lung cancer and a necessity to drive treatment decisions in clinical practice [3]. Testing of *EGFR*, *BRAF*, *ALK*, *ROS1*, and PD-L1 expression [2,4–7] is considered mandatory in patients with advanced disease and the most recently updated guidelines encourage the evaluation for several other evolving targets such as *NTRK*, *RET*, *MET* exon14 skipping (*MET*Δex14), *HER2*, and *KRAS* [2]. With the growing demand for gene testing in lung cancer, multiplex approaches are increasingly necessary to allow the study of several genes at the same time [5,8].

Bronchoscopy has been traditionally employed in the diagnosis of lung cancer. The recent implementation of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) as an additional tool in the endoscopic exploration allows us not only to obtain a specific histological diagnosis but also to establish an accurate nodal mediastinal staging in a unique investigation. This results in a reduction in the time-to-treatment decision [9], which is of paramount importance since timeliness of lung cancer care is a fundamental quality indicator.

Although biopsies are still considered the gold standard source of material for genetic testing [10–13], current molecular testing guidelines highlight that any source of material, including cytology samples, with adequate tumor cellularity may be used for diagnosis or therapy-predictive biomarker testing [5,14]. This is of relevance as small biopsy and cytology samples may represent the sole diagnostic material for diagnosis in up to two thirds of patients [15,16], and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) biopsies have frequently limited tumor content, since many diagnostic tests are required [17].

This situation prompted us to investigate the yield of EBUS-TBNA specimens, a cytological methodology, using a comprehensive multiplex genotyping based on combined next-generation sequencing (NGS) (DNA) and nCounter (RNA) multiplex testing [18], as well as PD-L1, in a series of patients with newly diagnosed NSCLC at our institution. We also aimed to assess the reproducibility of results between cytological specimens and paired tissue biopsies taken from the same tumor.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patients

Patients from Hospital Clinic Barcelona (Barcelona, Spain) with suspected lung cancer were evaluated by the Respiratory Department where the different diagnostic and staging procedures were indicated and performed according to international recommendations [9]. All cases were discussed in multi-disciplinary team meetings composed of various professionals involved in the care of lung cancer patients. Patients undergoing an EBUS-TBNA with confirmed diagnosis of stage III or IV NSCLC were prospectively included in the study. Patients were staged according to the International Association for the Study of Lung Cancer classification (eighth edition) [19]. Patients who were diagnosed on cytology were not required to have a confirmation on biopsy.

### 2.2. EBUS-TBNA

EBUS-TBNA was performed in the Bronchoscopy Unit on an outpatient basis using a convex probe ultrasound bronchoscope (EB-1970UK 2.0, Pentax<sup>®</sup>, Pentax Medical,

New Jersey, USA). Conscious sedation was performed by an anesthesiologist using a continuous infusion of propofol and remifentanyl. The bronchoscope was inserted orally and a systematic echographic nodal evaluation was done according to clinical guidelines [2], starting with the exploration of N3 hilar and interlobar stations then mediastinal N3 stations, and finally N2 stations. Once the suspected lymph node was ecographically located, its minimum diameter was measured and a dedicated 22-gauge needle (ECHO-HD-22-EBUS-P, Echotip<sup>®</sup> ultra, Cook Medical, Bloomington, USA) was used to obtain cytological samples. An expert cytopathologist carried out a rapid on-site evaluation (ROSE) with diff-quick staining for the assessment of the amount and viability of the tumor cells. Based on this, a number of passes were made, ranging from 1 to 13, with smears or blocks being carried out as appropriate. A lymph node was considered to be non-malignant when at least three needle passes evidenced normal lymphocytes with no atypical cells.

Cytology smears were suitable for molecular testing when at least 300 tumor cells were observed. Smears with an insufficient tumor cell percentage (<20%) were considered not evaluable in order to avoid false negative results. In those cases, for which low-tumor cellularity cytology smears were observed, cells collected from up to three smears were combined for DNA and/or RNA isolation. Cell blocks were prepared from normal saline with Histogel<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

### 2.3. Flexible Bronchoscopy

Patients with suspicion of bronchial infiltration of the primary tumor underwent, after the EBUS-TBNA procedure, a flexible bronchoscopy (FB) for obtaining biopsy samples. A total of 3 to 6 bronchial biopsies were obtained with a single-use biopsy forceps (Radial Jaw<sup>™</sup> 4, Boston Scientific<sup>®</sup>, Marlborough, USA) that were preserved in 4% “ready to use” formol (Histofix<sup>®</sup>, Panreac Química, Castellar del Vallès, Spain) for further histological and molecular analysis.

### 2.4. Genetic Testing

After diagnosis, biopsy (when feasible) and/or EBUS-TBNA cytology material was used to perform the molecular analyses. The best scenario was to have enough tumor cells to perform the three different techniques: NGS (DNA mutations), nCounter (RNA gene fusions and *MET*Δex14), and immunohistochemistry (IHC) for PD-L1 expression (see supplementary material and methods). For NGS and nCounter only smears were used, while for PD-L1, smears or cell-blocks were used according to availability. All immunohistochemical studies were evaluated by two anatomical pathologists specialists (CT and DM). For controversial cases, a consensus was reached over a double headed microscope. References [18,20–23] are cited in the supplementary material.

### 2.5. Statistical Analysis

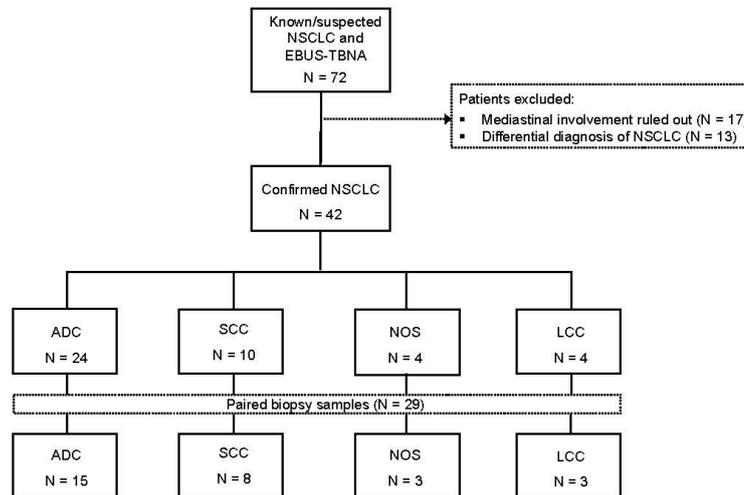
Descriptive statistics were tabulated and presented, including mean, standard deviation, median, minimum value and maximum value, and range for continuous variables, or percentages and frequencies for categorical variables. Characteristics of all patients included in the study were compared with Student’s t-test for mean values between groups. The Kappa value was used to evaluate concordance between measurements. For the statistical analysis, the SPSS program version 24.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) was used. All tests were performed at a significance level of  $p = 0.05$  and calculated at confidence level  $1 - \alpha = 0.95$ . Cases with missing data for analyzes were omitted and the remaining data was analyzed.

## 3. Results

### 3.1. Patients

During the study period (August 2018 to December 2019), 72 patients with suspected stage III or IV lung cancer underwent EBUS-TBNA for mediastinal evaluation. In 42 out of these 72 patients, metastatic mediastinal lymph nodes from NSCLC were confirmed (58.3%). The presence of malignant cells was ruled out in 17 cases (23.6%), whereas an

alternate diagnosis was provided in 13 cases (18.1%), including nine patients with small-cell lung cancer, one with breast neoplasia, one with biliopancreatic cancer, one with urothelial carcinoma, and one case of pulmonary tuberculosis (Figure 1).



**Figure 1.** Flow chart of the patient cohort included in this study. Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; LCC, large cell carcinoma; NOS, not otherwise specified; SCC, squamous cell carcinoma; NSCLC, non-small cell lung cancer.

The final study population consisted of 42 patients with NSCLC, of whom 31 (73.8%) were men and 11 (26.2%) were women (Table 1). The mean age was 67.1 years (range 52–83). The majority of patients were smokers (47.6%; 20/42). A total of 57.1% had extensive or stage IV disease (24/42) and 42.9% locally-advanced disease (18/42). Adenocarcinoma was the most common histological subtype (57.2%; 24/42), followed by squamous cell carcinoma (23.8%; 10/42), non-otherwise specified (NOS) and large cell carcinoma (9.5%; 4/42, each) (Table 1).

**Table 1.** Characteristics of study population (N = 42).

	No. (%) or Mean (Range)
Age (years)	67.1 (52–83)
Sex	
Male	31 (73.8)
Female	11 (26.2)
Smoking status	
Current	20 (47.6)
Former	17 (40.5)
Never	5 (11.9)
Staging by CT or PET	
IIIA	4 (9.5)
IIIB	12 (28.5)
IIIC	2 (4.8)
IVA	6 (14.3)
IVB	18 (42.9)
Histological type	
Adenocarcinoma	24 (57.2)
Squamous cell carcinoma	10 (23.8)
Non-otherwise specified	4 (9.5)
Large cell carcinoma	4 (9.5)

Abbreviations: CT, computed tomography; PET, positron emission tomography.

### 3.2. Flexible Bronchoscopy and EBUS-TBNA Representativeness

A total of 78 different anatomical regions (according to the lymph node map of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)) were sampled with EBUS-TBNA, 50 (64.1%) on mediastinum, 13 (16.7%) on lobar nodes. In 15 patients, cytology samples were obtained directly from the peribronchial primary tumor mass (Table 2). The most commonly sampled nodal locations were subcarinal (28.2%; 22/78), followed by right lower paratracheal (24.3%, 19/78). No clinically significant complications appeared in any patient during the procedure, but in four the following two weeks (2 hemoptysis and 2 respiratory infections).

**Table 2.** Characteristics of the sampled regions by EBUS-TBNA procedure.

EBUS Findings	No. (%) or Mean (Range)
Regions sampled	78
Nodes	63 (80.8%)
Mediastinal	
Subcarinal	22 (28.2)
Right lower paratracheal	19 (24.3)
Left lower paratracheal	7 (9.0)
Right higher paratracheal	2 (2.6)
Lobar	
Right interlobar	7 (9.0)
Left interlobar	3 (3.8)
Right hilar	2 (2.6)
Left hilar	1 (1.3)
Peribronchial primary tumor mass	15 (19.2)
Number passes per each node station/site	6 (1–13)
Lymph node characteristics	
Size by EBUS (mm)	13.7 (5.9–32.7)
SUV by PET	16.9 (0.0–48.5)

Abbreviations: EBUS-TBNA, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration; PET, positron emission tomography; SUV, standard uptake value.

Sixty-eight out of the 78 anatomical regions were positive (87.2%), 9 negative (11.5%), and one not evaluable (1.3%) due to the absence of a confirmatory lymphocytic background. The average lymph node size on EBUS was 13.7 mm, the mean standard uptake value (SUV) was 16.9, and the mean number of punctures per adenopathy was 6. Positive node regions were significantly larger (14.5 vs. 8.8 mm,  $p = 0.029$ ) and had an increased SUV uptake (SUV max mean difference 19.3 vs. 0.0,  $p = 0.002$ ) compared to the negative nodes. Furthermore, FB exploration showed macroscopic evidence of bronchial infiltration by the tumor in 18 of the 42 patients (42.9%).

### 3.3. Molecular Analysis of Cytological Material Obtained by EBUS-TBNA

Overall, 39 out of 42 (92.8%) patients samples yielded sufficient material to successfully proceed with all genomic tests (92.8% (39/42) for NGS, 95.2% (40/42) for nCounter and 100% (42/42) for PD-L1). All three cases with insufficient material corresponded to multiplexed testing, whereas all samples were sufficient for PD-L1 IHC testing (Supplementary Figure S1). There were two samples with a non-evaluable result, accounting for one OncoPrint Solid Tumor (OST) NGS and another PD-L1 IHC due to low quality of the DNA and insufficient number of tumor cells, respectively.

Forty-seven somatic alterations were identified in 29 cases, representing 74.4% of the samples successfully tested with OST NGS (29/39). The genes most commonly detected were *TP53* (53.8%, 21/39), *KRAS* (35.9%, 14/39), and *STK11* (10.3%, 4/39). Other genes identified with lower incidence were *EGFR* (5.1%, 2/39), *BRAF* V600E (5.1%, 2/39), *PIK3CA* (5.1%, 2/39), *DDR2* (2.6%, 1/39) and *SMAD4* (2.6%, 1/39) (Figure 2). Molecular alterations were more commonly found in women than men (80%, 8/10 and 72.4%, 21/29 respectively),

whereas cases with co-mutations per sample were very-similar between sexes (men with 50%, 21/42 vs. women with 53.3%, 8/15).

The customized lung cancer nCounter panel (RNA test) was successfully performed on 40 samples (95.2%), all of them providing an evaluable result (Figure 2). All genes included in the panel (*ALK*, *ROS1*, *RET*) were negative, except for a *MET* $\Delta$ 14 that resulted positive in one sample (2.5%; 1/40).

PD-L1 expression was successfully evaluated in all samples (100%, 42/42). Among them, 16 (38.1%) were smears and 26 (61.9%) cell blocks. Cases were classified according to the Tumor Proportion Score (TPS) and both types of samples (smear and cell block) contained cases within the three PD-L1 categories. PD-L1 was negative in 17 patients (40.5%; 17/42), low-positive in ten (23.8%; 10/42), and high-positive in 14 patients (33.3%; 14/42) (Figure 3).

#### 3.4. Comparison of Paired EBUS-TBNA Cytology and Biopsy Samples by Targeted NGS and NCounter

Overall, FFPE samples yielded sufficient material to successfully proceed with all study testing (OST NGS, nCounter, and PD-L1 IHC) in 22 out of 29 patients (75.8%). There were six cases with insufficient material to proceed with all or any of the multiplex testing, and one sample was also insufficient for PD-L1 IHC testing. Overall, results for NGS and nCounter using biopsies were provided in 79.3% (23/29) of samples (Supplementary Figure S1). In two cases (patients 1 and 13), there was not enough tumor cell content for both DNA and RNA analyses. In patient 1, NGS was prioritized over the nCounter technique because no targetable alteration was found in the cytology material, whereas for patient 13, nCounter technique was prioritized because a *MET* $\Delta$ ex14 was identified from the EBUS-TBNA material.

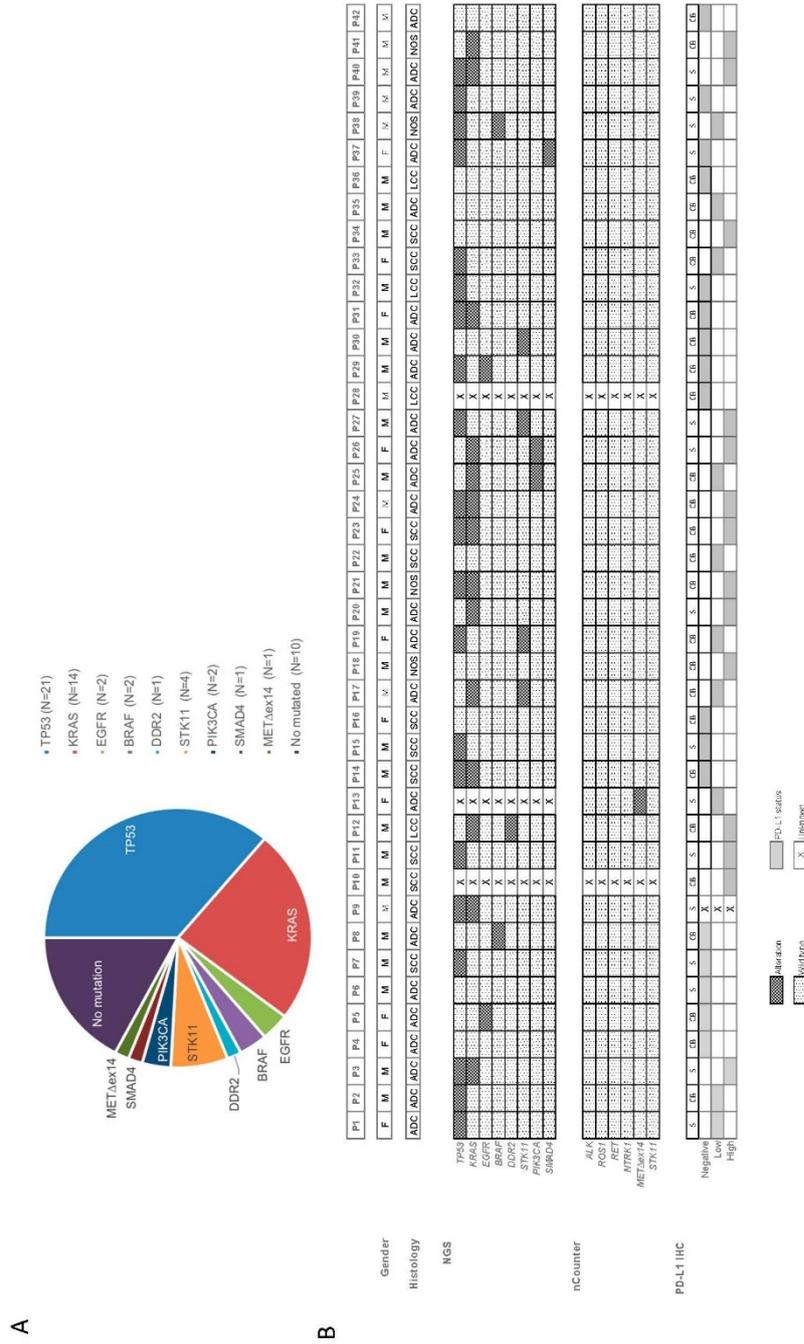
Twenty-nine cases had a paired cytology/FFPE biopsy for comparison purposes (Figure 1). Table 3 shows the concordance of the NGS results between the cytology and the biopsy samples. Among the 23 samples with an NGS result and paired cytology/FFPE biopsy, 18 cases were positive for any alteration. There was full agreement in the positive and negative results between both sample sources. Most of the reported results were the same (91.3%, 21/23) and only two samples (patients 9 and 37) showed discrepancies regarding co-mutations. In the first case, both cytology/FFPE biopsy agreed with a common *KRAS* mutation but co-mutations detected were different, with *TP53* in the cytology and *ALK/FGFR2* point-mutations in the biopsy. In the second sample, cytology resulted in a *TP53* and *SMAD4* mutation, whereas only *TP53* alteration was identified in the biopsy. The number of agreements expected by chance was 15.2 (66% of the observations).

**Table 3.** Concordance of the NGS results between EBUS-TBNA and biopsy samples.

		Biopsy		
		Positive	Negative	Total
EBUS-TBNA	Positive	18 <sup>Φ</sup>	0	18
	Negative	0	5	5
	Total	18	5	23

<sup>Φ</sup>, 2 samples were identified with the same driver, but different co-mutations identified by NGS. Concordance samples are in bold. Number of observed agreements: 23 (100% of the observations). Number of agreements expected by chance: 15.2 (65.97% of the observations). Abbreviations: EBUS-TBNA, EBUS-TBNA, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle; NGS, next-generation sequencing.

For the nCounter technique, all of the results were concordant (23/23, 100%) with the number of agreements expected by chance 21.1 (91.7% of the observations). As mentioned above, only one patient resulted positive for the *MET* $\Delta$ ex14 mutation in both cytology and biopsy.



**Figure 2.** Molecular characterization of EBUS-TBNA samples. (A) Pie chart representing frequencies (%) of the examined genes identified from patients successfully genotyped by next-generation sequencing. Frequencies are expressed as the percentage of positive samples for each molecular alteration relative to the total number of patients with an informative molecular result. (B) Heatmap displaying the sex, NSCLC histological subtype and molecular characteristics of the 42 patients included in the study. Abbreviations: ADC, adenocarcinoma; CB, cell block; F, female; IHC, immunohistochemistry; LCC, large cell carcinoma; M, male; NGS, next-generation sequencing; P, patient; SCC, squamous cell carcinoma; S, smear.

(Figure 3A). High-positive PD-L1 TPS were more frequently observed in the biopsies than the cytologies (16 vs. 11 cases, respectively), independent of the cytology sample type (smear or cell block). Representative images of three different cases of PD-L1 expression from both types of samples are shown in Figure 3B.

However, if we only segregate samples into two groups, positive (tumor cells  $\geq 1\%$ ) and negative, or high (tumor cells  $\geq 50\%$ ) and negative/low-positive, the strength of agreement was substantial at 88.9% and 81.5%, respectively (Supplementary Tables S1 and S2, respectively).

**Table 4.** Comparison of PD-L1 results between paired cytological and biopsy samples using three cutoffs, negative (tumor cells  $< 1\%$ ), low- (TPSI-49%) and high-positive (TPS  $\geq 50\%$ ) ( $N = 27$ ).

		Biopsy			Total
		Negative	Low-Positive	High-Positive	
EBUS-TBNA	Negative	4	2	1	7
	Low-positive	0	5	4	9
	High-positive	0	0	11	11
Total		4	7	16	27

Number of observed agreements: 20 (74.1% of the observations). Number of agreements expected by chance: 9.9 (36.6% of the observations). Kappa = 0.591 (95% confidence interval from 0.344 to 0.838). Abbreviations: EBUS-TBNA, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle.

#### 4. Discussion

Numerous studies have explored the efficiency of EBUS-TBNA in NSCLC to evaluate PD-L1 expression status or the genomic phenotype using single-gene testing, rapid techniques (RT-PCR, IHC) or direct sequencing [10,24]. However, very few have evaluated prospectively the efficiency of EBUS-TBNA for using NGS [25,26] or combining both NGS and PD-L1, and fewer still have included tissue for the genomic evaluation for comparison (Supplementary Table S3) [27,28]. To our knowledge, we are the first to provide prospective data comparing EBUS-TBNA vs. tissue for a comprehensive genomic evaluation including PD-L1 and genetic phenotype determination by NGS.

Most of the samples obtained from EBUS-TBNA, 92.8% (39/42), yielded sufficient material to successfully proceed with all of the biomarker evaluations, overtaking the 75.8% (22/29) achieved with biopsies. This is significant, as cytology obtained from EBUS-TBNA was the only source of material for diagnosis in 13 cases (30.9%), which highlights the relevance of employing such material for other purposes apart from diagnosis.

The use of rapid on-site evaluation (ROSE) and an increased number of needle passes was used to improve the genomic and diagnostic yield of EBUS-TBNA. Whereas three needle passes are sufficient in the diagnosis of mediastinal disease [29,30], a minimum of four needle passes might be required to get enough material for molecular testing [31]. Indeed, the average number of needle passes in our cohort was six. Therefore, an optimal on-site coordination between the pneumology and pathology departments is essential to ensure the lower limits of adequacy and guarantee the acquisition of sufficient tumor cell content for molecular testing.

Cytologies, particularly those from EBUS-TBNA, have some limitations over biopsies including a lower preservation of tissue architecture and a reduced amount of tumor cell content, especially using smears. However, they can be a rich source of genetic material as they can be preserved without FFPE, avoiding the risk of fading of PD-L1 IHC expression or DNA quality found with samples with an extended storage time [5,32]. Fielding and colleagues investigated the potential of using DNA extracted from diff-1uik cytology smears versus cell blocks from EBUS-TBNA procedure and observed that smears have a better yield and therefore success in triaging samples to sequencing [33].

In our series, the adequacy of EBUS-TBNA cytologies for genetic testing was high, above 90% for both NGS and nCounter, and was in line with other previously published studies (Supplementary Table S3 [24–28,33–43]). Molecular results in cytology fully agreed

with that of tissue testing, including some *EGFR*, *BRAF*, and *MET*Δex14 alterations, endorsing cytologies as an optimal source of material for genetic testing.

PD-L1 assessment was also feasible on cytologic material and all EBUS-TBNA samples were successfully tested for PD-L1 expression. Although an 88.9% agreement with tumor biopsies was observed when using a positive–negative PD-L1 cutoff point (TPS  $\geq$  1%), a lower concordance rate of 74.1% was observed when classifying in three categories (negative, low-, and high-positive). Most of the discordant cases presented higher PD-L1 expression levels in biopsies regardless of the type of cytology sample evaluated (smear or cell block samples).

To date, PD-L1 testing on EBUS-TBNA smear samples has not been validated with any of the commercially available platforms. Several studies have compared PD-L1 testing between EBUS-TBNA and other tissue specimens, reporting a diverse range of concordance rates—between 69.8 and 91.3% [35,37,39–41,43]. Whereas some studies have shown lower rates of PD-L1 expression in cytology specimens [32,43,44], others have reported a higher expression in metastatic lymph nodes than in primary tumors [37].

We found an 18.5% incidence of false negative cases at the TPS  $\geq$  50% cutoff. This is in contrast to the results of Smith, et al. [37,40], who did not find any false-negative case either at the TPS  $\geq$  1% or the TPS  $\geq$  50% cutoffs, but is in line with Sakata, et al. [41], where at the TPS  $\geq$  50% PD-L1 cutoff, EBUS misclassified the status of 53% (8/15) of PD-L1-positive tumors with an overall concordance between EBUS-TBNA samples and surgical resection specimens of 82%.

Based on the data mentioned above, it is unclear whether EBUS-TBNA specimens may misclassify the status of PD-L1, especially when the PD-L1 cutoff of TPS  $\geq$  50% is applied. Spatial and temporal heterogeneity of PD-L1 expression have been described in NSCLC and may be a plausible explanation of PD-L1 status discordance observed between samples across studies [45–47], increasing the risk of false negatives in small samples with low tumor cellularity, such as those obtained from EBUS-TBNA. Moreover, stage differences may account for varying levels of PD-L1 expression and could partially explain the limitations of EBUS in this setting. In our series only 50% of patients were in an advanced stage of the disease.

The limitations of our study include the small number of patients used for comparison, but nevertheless these results contribute to the existing data on the concordance between EBUS samples and histological specimens.

## 5. Conclusions

Our results support the reliability and feasibility of EBUS-TBNA cytology specimens as an optimal source of material for NSCLC genotyping, expanding the percentage of patients that can be screened for biomarkers in the approximately one-third of patients without biopsy. Although PD-L1 testing is achievable in the majority of EBUS-TBNA samples, the lower agreement observed in higher PD-L1 IHC scores reinforces the need to further prospectively evaluate the value of PD-L1 testing with EBUS-TBNA.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13092084/s1>, Figure S1: Techniques performed on cytological and biopsy samples ( $N = 42$ ). Patients with paired samples are colored in yellow; Table S1: Comparison of PD-L1 status between paired cytological and biopsy samples ( $N = 27$ ); Table S2: Comparison of PD-L1 immunostaining between paired EBUS-TBNA specimens and biopsy samples ( $N = 27$ ); Table S3: Characteristics of included studies exploring PD-L1 expression and/or other predictive biomarkers relevant in NSCLC tested by NGS in EBUS-TBNA samples.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.M.L., C.A. and N.R.; data curation, C.A. and N.R.; formal analysis, C.T.; funding acquisition, R.M.-D.; investigation, R.M.-D. and C.T.; methodology, R.M.-D., C.T., C.A. and N.R.; resources, C.M.L., A.F., R.R., I.V., M.S. and P.J.; software, D.M., A.F., M.G., N.V., F.M.P., N.V. (Naiara Vega), E.M. and R.M.M.; supervision, C.A. and N.R.; validation, D.M., R.R., M.G., N.V. (Nuria Viñolas), I.V., M.S., P.J., F.M.P., E.M. and R.M.M.; visualization, R.R. and N.V. (Naiara Vega); writing—original draft, R.M.-D. and C.T.; writing—review and editing, C.A. and N.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study has received research funding from SEPAR (515/2017), Hospital Clínic de Barcelona (Premi Emili Letang 2018), and the Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III, Spain (FIS PI16/00890).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Review Board of the Hospital Clínic de Barcelona (HCB/2017/0967).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy.

**Conflicts of Interest:** CT reports personal fees from Diaceutics, grants, personal fees and non-financial support from Pfizer, grants, personal fees and non-financial support from Novartis, personal fees from MSD, personal fees from Astrazeneca, personal fees and non-financial support from Takeda, personal fees from Roche, outside the submitted work. NR has received reports grants from Pfizer WI230526, grants from Novartis CINC280AES01T, grants from Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III, Spain (FIS16/00890), during the conduct of the study; personal fees from MSD, personal fees from Amgen, personal fees from Takeda, personal fees from Astrazeneca, personal fees from Novartis, personal fees from Abbie, personal fees from Pfizer, personal fees from Guardant Health, personal fees from Boehringer Ingelheim, personal fees from Roche, personal fees from BMS, outside the submitted work. R.M.-D., C.M.L., D.M., A.F., R.R., M.G., N.V., I.V., M.S., P.J., F.M.P., N.V., E.M., R.M.M., and C.A. have declared no conflicts of interest.

## References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34. [[CrossRef](#)]
2. Planchard, D.; Popat, S.; Kerr, K.; Novello, S.; Smit, E.F.; Faivre-Finn, C.; Mok, T.S.; Reck, M.; Van Schil, P.E.; Hellmann, M.D.; et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, iv192–iv237. [[CrossRef](#)]
3. Reck, M.; Rabe, K.F. Precision Diagnosis and Treatment for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 849–861. [[CrossRef](#)]
4. Majem, M.; Juan, O.; Insa, A.; Reguart, N.; Trigo, J.M.; Carcereny, E.; García-Campelo, R.; García, Y.; Guirado, M.; Provencio, M. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin. Transl. Oncol.* **2019**, *21*, 3–17. [[CrossRef](#)]
5. Lindeman, N.I.; Cagle, P.T.; Aisner, D.L.; Arcila, M.E.; Beasley, M.B.; Bemicker, E.H.; Colasacco, C.; Dacic, S.; Hirsch, F.R.; Kerr, K.; et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment with Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2018**, *142*, 321–346. [[CrossRef](#)]
6. Kalemkerian, G.P.; Narula, N.; Kennedy, E.B.; Biermann, W.A.; Donington, J.; Leighl, N.B.; Lew, M.; Pantelas, J.; Ramalingam, S.S.; Reck, M.; et al. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 911–919. [[CrossRef](#)]
7. Garrido, P.; Conde, E.; De Castro, J.; Gómez-Román, J.J.; Felip, E.; Pijuan, L.; Isla, D.; Sanz, J.; Paz-Ares, L.; López-Ríos, F. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: A National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin. Transl. Oncol.* **2020**, *22*, 989–1003. [[CrossRef](#)]
8. Teixidó, C.; Giménez-Capitán, A.; Molina-Vila, M. Ángel; Peg, V.; Karachaliou, N.; Rodríguez-Capote, A.; Castellví, J.; Rosell, R. RNA Analysis as a Tool to Determine Clinically Relevant Gene Fusions and Splice Variants. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2018**, *142*, 474–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Navani, N.; Nankivell, M.; Lawrence, D.R.; Lock, S.; Makker, H.; Baldwin, D.R.; Stephens, R.J.; Parmar, M.K.; Spiro, S.G.; Morris, S.; et al. Lung cancer diagnosis and staging with endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration compared with conventional approaches: An open-label, pragmatic, randomised controlled trial. *Lancet Respir. Med.* **2015**, *3*, 282–289. [[CrossRef](#)]

10. Jurado, J.; Saqi, A.; Maxfield, R.; Newmark, A.; Lavelle, M.; Bacchetta, M.; Gorenstein, L.; Dovidio, F.; Ginsburg, M.E.; Sonett, J.; et al. The Efficacy of EBUS-Guided Transbronchial Needle Aspiration for Molecular Testing in Lung Adenocarcinoma. *Ann. Thorac. Surg.* **2013**, *96*, 1196–1202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Casadio, C.; Guarize, J.; Donghi, S.; Di Tonno, C.; Fumagalli, C.; Vacirca, D.; Dell’Orto, P.; De Marinis, F.; Spaggiari, L.; Viale, G.; et al. Molecular Testing for Targeted Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Suitability of Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration. *Am. J. Clin. Pathol.* **2015**, *144*, 629–634. [[CrossRef](#)]
12. Righi, L.; Franzì, F.; Montarolo, F.; Gatti, G.; Bongiovanni, M.; Sessa, F.; La Rosa, S. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA)—from morphology to molecular testing. *J. Thorac. Dis.* **2017**, *9*, S395–S404. [[CrossRef](#)]
13. Fernandez-Bussy, S.; Labarca, G.; Pires, Y.; Caviedes, I.; Burotto, M. Molecular Testing of EGFR, EGFR Resistance Mutation, ALK and ROS1 Achieved by EBUS-TBNA in Chile. *Arch. Bronconeumol. (Engl. Ed.)* **2017**, *53*, 172–174. [[CrossRef](#)]
14. Roy-Chowdhuri, S.; Dacic, S.; Ghofrani, M.; Illei, P.B.; Layfield, L.J.; Lee, C.; Michael, C.W.; Miller, R.A.; Mitchell, J.W.; Nikolic, B.; et al. Collection and Handling of Thoracic Small Biopsy and Cytology Specimens for Ancillary Studies: Guideline From the College of American Pathologists in Collaboration With the American College of Chest Physicians, Association for Molecular Pathology, American Society of Cytopathology, American Thoracic Society, Pulmonary Pathology Society, Papanicolaou Society of Cytopathology, Society of Interventional Radiology, and Society of Thoracic Radiology. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2020**, *144*, 933–958. [[CrossRef](#)]
15. Dietel, M.; Bubendorf, L.; Dingemans, A.-M.C.; Dooms, C.; Elmberger, G.; García, R.C.; Kerr, K.M.; Lim, E.; López-Ríos, F.; Thunnissen, E.; et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): Recommendations of the European Expert Group. *Thorax* **2016**, *71*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Roy-Chowdhuri, S.; Aisner, D.L.; Allen, T.C.; Beasley, M.B.; Borczuk, A.; Cagle, P.T.; Capelozzi, V.; Dacic, S.; Santos, G.D.C.; Hariri, L.P.; et al. Biomarker Testing in Lung Carcinoma Cytology Specimens: A Perspective from Members of the Pulmonary Pathology Society. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2016**, *140*, 1267–1272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Thunnissen, E.; Kerr, K.M.; Herth, F.J.; Lantuejoul, S.; Papotti, M.; Rintoul, R.C.; Rossi, G.; Skov, B.G.; Weynand, B.; Bubendorf, L.; et al. The challenge of NSCLC diagnosis and predictive analysis on small samples. Practical approach of a working group. *Lung Cancer* **2012**, *76*, 1–18. [[CrossRef](#)]
18. Marin, E.; Teixido, C.; Carmona-Rocha, E.; Reyes, R.; Arcocha, A.; Viñolas, N.; Rodríguez-Mues, M.; Cabrera, C.; Sánchez, M.; Vollmer, I.; et al. Usefulness of Two Independent DNA and RNA Tissue-Based Multiplex Assays for the Routine Care of Advanced NSCLC Patients. *Cancers* **2020**, *12*, 1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Goldstraw, P.; Chansky, K.; Crowley, J.; Rami-Porta, R.; Asamura, H.; Eberhardt, W.E.; Nicholson, A.G.; Groome, P.; Mitchell, A.; Bolejack, V.; et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, 39–51. [[CrossRef](#)]
20. Castillo, P.; Marginet, M.; Jares, P.; García, M.; Gonzalvo, E.; Arance, A.; García, A.; Alos, L.; Teixido, C. Implementation of an NGS panel for clinical practice in paraffin-embedded tissue samples from locally advanced and metastatic melanoma patients. *Explor. Target Antitumor Ther.* **2020**, *1*, 101–108. [[CrossRef](#)]
21. Reguart, N.; Teixido, C.; Giménez-Capitán, A.; Paré, L.; Galván, P.; Viteri, S.; Rodríguez, S.; Peg, V.; Aldeguer, E.; Viñolas, N.; et al. Prat A. Identification of ALK, ROS1, and RET fusions by a multiplexed mRNA-based assay in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin. Chem.* **2017**, *63*, 751–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Teixido, C.; Vilariño, N.; Reyes, R.; Reguart, N. PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2018**, *10*, 1758835918763493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Reguart, N.; Teixido, C.; Giménez-Capitán, A.; Vilariño, N.; Arcocha, A.; Jares, P.; Castillo, S.; Bernal, X.; Muñoz, S.; Palmero, R.; et al. Prat A. P1.01-075 Simultaneous Multiplex Profiling of Gene Fusions, METe14 Mutations and Immune Genes in Advanced NSCLC by NCounter Technology. *J. Thoracic Oncol.* **2017**, *12*, S1923. [[CrossRef](#)]
24. Raad, S.; Hanna, N.; Jalal, S.; Bendaly, E.; Zhang, C.; Nuguru, S.; Oueini, H.; Diab, K. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Use for Subclassification and Genotyping of Lung Non-Small-Cell Carcinoma. *South. Med. J.* **2018**, *111*, 484–488. [[CrossRef](#)]
25. Turner, S.R.; Buonocore, D.; Desmeules, P.; Rekhman, N.; Dogan, S.; Lin, O.; Arcila, M.E.; Jones, D.R.; Huang, J. Feasibility of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration for massively parallel next-generation sequencing in thoracic cancer patients. *Lung Cancer* **2018**, *119*, 85–90. [[CrossRef](#)]
26. Stoy, S.P.; Segal, J.P.; Mueller, J.; Furtado, L.V.; Vokes, E.E.; Patel, J.D.; Murgu, S. Feasibility of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Cytology Specimens for Next Generation Sequencing in Non-small-cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **2018**, *19*, 230–238.e2. [[CrossRef](#)]
27. Biswas, A.; Leon, M.E.; Drew, P.; Fernandez-Bussy, S.; Furtado, L.V.; Jantz, M.A.; Mehta, H.J. Clinical performance of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for assessing programmed death ligand-1 expression in nonsmall cell lung cancer. *Diagn. Cytopathol.* **2018**, *46*, 378–383. [[CrossRef](#)]
28. Fernandez-Bussy, S.; Biswas, A.; Labarca, G.; Jantz, M.A.; Mehta, H.J. Comparison of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration With Stylet Retracted Partially Versus Completely for Molecular Testing. *J. Bronchol. Interv. Pulmonol.* **2019**, *26*, 222–224. [[CrossRef](#)]

29. Herth, F.J.F.; 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*, 887–891. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Wahidi, M.M.; Herth, F.; Yasufuku, K.; Shepherd, R.W.; Yarmus, L.; Chawla, M.; Lamb, C.; Casey, K.R.; Patel, S.; Silvestri, G.A.; et al. Technical Aspects of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration: CHEST Guideline and Expert Panel Report. *Chest* **2016**, *149*, 816–835. [[CrossRef](#)]
31. Yarmus, L.; Akulian, J.; Gilbert, C.; Feller-Kopman, D.; Lee, H.J.; Zarogoulidis, P.; Lechtzin, N.; Ali, S.Z.; Sathiyamoorthy, V. Optimizing Endobronchial Ultrasound for Molecular Analysis. How Many Passes Are Needed? *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2013**, *10*, 636–643. [[CrossRef](#)]
32. Midha, A.; Sharpe, A.; Scott, M.; Walker, J.; Shi, K.; Ballas, M.; Garassino, M.C.; Rizvi, N.A. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Primary lesions versus metastatic sites and impact of sample age. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 3025. [[CrossRef](#)]
33. Fielding, D.; Dalley, A.J.; Bashirzadeh, F.; Singh, M.; Nandakumar, L.; Reed, A.E.M.; Black, D.; Kazakoff, S.; Pearson, J.V.; Nones, K.; et al. Diff-Quick Cytology Smears from Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration Lymph Node Specimens as a Source of DNA for Next-Generation Sequencing Instead of Cell Blocks. *Respiration* **2019**, *97*, 525–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Mineura, K.; Hamaji, M.; Yoshizawa, A.; Nakajima, N.; Kayawake, H.; Tanaka, S.; Yamada, Y.; Yutaka, Y.; Nakajima, D.; Ohsumi, A.; et al. Diagnostic yield of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration to assess tumor-programmed cell death ligand-1 expression in mediastinal lymph nodes metastasized from non-small cell lung cancer. *Surg Today* **2020**, *50*, 1049–1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jug, R.; Giovacchini, C.X.; Liu, B.; Green, C.L.; Clarke, J.M.; Mahmood, K.; Pavlisko, E.N. EBUS-FNA cytologic-histologic correlation of PD-L1 immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J. Am. Soc. Cytopathol.* **2020**, *9*, 485–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Perrotta, F.; Nankivell, M.; Adizie, J.B.; Maqsood, U.; Elshafi, M.; Jafri, S.; Lerner, A.D.; Woolhouse, I.; Munavvar, M.; Evison, M.; et al. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration for PD-L1 Testing in Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* **2020**, *158*, 1230–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Smith, A.; Wang, H.; Zerbo, A.; Beaudoin, S.; Ofiara, L.; Fiset, P.-O.; Benedetti, A.; Gonzalez, A.V. Programmed Death Ligand 1 Testing of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Samples Acquired for the Diagnosis and Staging of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Bronchol. Interv. Pulmonol.* **2020**, *27*, 50–57. [[CrossRef](#)]
38. Xie, F.; Zheng, X.; Mao, X.; Zhao, R.; Ye, J.; Zhang, Y.; Sun, J. Next-Generation Sequencing for Genotyping of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Samples in Lung Cancer. *Ann Thorac. Surg* **2019**, *108*, 219–226. [[CrossRef](#)]
39. Yoshimura, K.; Inoue, Y.; Karayama, M.; Tsuchiya, K.; Mori, K.; Suzuki, Y.; Iwashita, Y.; Kahyo, T.; Kawase, A.; Tanahashi, M.; et al. Heterogeneity analysis of PD-L1 expression and copy number status in EBUS-TBNA biopsy specimens of non-small cell lung cancer: Comparative assessment of primary and metastatic sites. *Lung Cancer* **2019**, *134*, 202–209. [[CrossRef](#)]
40. Wang, G.; Ionescu, D.N.; Lee, C.-H.; Hiruki, T.; Myers, R.; Shaipanich, T.; Lam, S.; Melosky, B.; Zhou, C. PD-L1 testing on the EBUS-FNA cytology specimens of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2019**, *136*, 1–5. [[CrossRef](#)]
41. Sakata, K.K.; Midthun, D.E.; Mullon, J.J.; Kern, R.M.; Nelson, D.R.; Edell, E.S.; Schiavo, D.N.; Jett, J.R.; Aubry, M.C. Comparison of Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemical Staining Between Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration and Resected Lung Cancer Specimens. *Chest* **2018**, *154*, 827–837. [[CrossRef](#)]
42. Ghigna, M.R.; Crutu, A.; Florea, V.; Feuillet-Soummer, S.; Baldeyrou, P.; Adam, J.; Lacroix, L.; Besse, B.; Mercier, O.; Fadel, E.; et al. Endobronchial ultrasound-guided fine-needle aspiration for pulmonary carcinomas genotyping: Experience with 398 cases including rapid. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 4653–4658. [[CrossRef](#)]
43. Sakakibara, R.; Inamura, K.; Tambo, Y.; Ninomiya, H.; Kitazono, S.; Yanagitani, N.; Horiike, A.; Ohyanagi, F.; Matsuura, Y.; Nakao, M.; et al. EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* **2017**, *18*, 527–534.e1. [[CrossRef](#)]
44. Skov, B.G.; Skov, T. Paired Comparison of PD-L1 Expression on Cytologic and Histologic Specimens from Malignancies in the Lung Assessed With PD-L1 IHC 28-8pharmDx and PD-L1 IHC 22C3pharmDx. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2017**, *25*, 453–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. McLaughlin, J.K.; Han, G.; Schalper, K.A.; Carvajal-Hausdorf, D.; Pelekanou, V.; Rehman, J.; Velcheti, V.; Herbst, R.S.; Lorusso, P.M.; Rimm, D.L. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **2016**, *2*, 46–54. [[CrossRef](#)]
46. Casadevall, D.; Clavé, S.; Taus, Á.; Hardy-Werbin, M.; Rocha, P.; Lorenzo, M.; Menéndez, S.; Salido, M.; Albanell, J.; Pijuan, L.; et al. Heterogeneity of Tumor and Immune Cell PD-L1 Expression and Lymphocyte Counts in Surgical NSCLC Samples. *Clin. Lung Cancer* **2017**, *18*, 682–691.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ben Dori, S.; Aizic, A.; Sabo, E.; Hershkovitz, D. Spatial heterogeneity of PD-L1 expression and the risk for misclassification of PD-L1 immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2020**, *147*, 91–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Supplementary Material

## EBUS-TBNA Cytological Samples for Comprehensive Molecular Testing in Non-small Cell Lung Cancer

Roberto Martín-Deleon, Cristina Teixido, Carmen M Lucena, Daniel Martinez, Ainhoa Fontana, Roxana Reyes, Míreia García, Nuria Viñolas, Ivan Vollmer, Marcelo Sanchez, Pedro Jares, Francisco M Pérez, Naiara Vega, Elba Marin, Ramón M Marrades, Carlos Agustí, Noemi Reguart.

### Supplementary Material and Methods

#### *DNA and Oncomine*

Briefly, DNA isolation and Next-Generation Sequencing (NGS) were performed with the *QIAamp DNA FFPE Tissue kit* (Qiagen, Hilden, Germany) and the Oncomine™ Solid Tumour DNA Panel Kit (OST, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), respectively, both according to the manufacturer's instructions and as described previously [1]. Ten ng was used as a template to generate genomic libraries. The Oncomine™ Solid Tumour DNA Panel (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), interrogates somatic mutations (substitutions, insertions, deletions and inversions) on 22 genes, including *EGFR*, *ALK*, *ERBB2*, *ERBB4*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *MET*, *DDR2*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *AKT1*, *PTEN*, *NRAS*, *MAP2K1*, *STK11*, *NOTCH1*, *CTNNB1*, *SMAD4*, *FBXW7*, and *TP53*. Amplicons were covered on average to a minimum of 500X. To be considered suitable for NGS testing, tumor cells must comprise at least 20% of cells in the sample and there must be more than 300 tumor cells in total.

#### *RNA and nCounter*

RNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and cytological smear samples was extracted with a high purity FFPE RNA isolation kit (Roche, Meylan, France) following the manufacturer's instructions. The total RNA (10-200ng) was hybridized with a custom-designed mixture of biotinylated capture tags and fluorescently labeled reporter probes (*ALK*, *ROS1*, *RET*, *NTRK1*, *METexΔ14*; Elements Chemistry). The panel was customized to identify *ALK*, *ROS1*, *RET*, and *NTRK1* gene fusions, and *METΔex14* [2]. Sample processing, imaging, and counting were performed with nCounter Prep Station and Digital Analyzer automated instruments (NanoString Technologies Inc, Seattle, WA) according to the manufacturer's instructions. Expression levels were collected and normalized with the nSolver analysis software version 2.6 [3, 4]. FFPE samples were considered for analysis if they contained a minimum of 500 cells in total with at least 10% tumor cells.

#### *PD-L1 immunohistochemistry*

Immunohistochemistry (IHC) was performed on cytological smears or four-micron deparaffinized, formalin-fixed tissue sections using the PD-L1 IHC 22C3 pharmDx assay (Dako, Glostrup, Denmark; on a Dako Autostainer Link 48) with antigen retrieval and antibody dilutions following manufacturer's recommendations. Human tonsil tissue was used as control. PD-L1 expression in tumor cells was evaluated based on the percentage of PD-L1 positive on the membrane intensity staining pattern. Cases were classified according to the Tumor Proportion Score (TPS) as follows: negative (0 and <1%); low-positive (1-49%); and high-positive (50-100%). A minimum of 100 tumor cells were evaluated per sample and PD-L1 positivity was considered when a membrane stain (partial or complete) of tumor cells  $\geq 1\%$  was observed [5].

Figure S1. Techniques performed on cytological and biopsy samples (N = 42). Patients with paired samples are colored in yellow.

		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35	P36	P37	P38	P39	P40	P41	P42				
EBUS-TBNA	NGS	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
	nCounter	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	IHC	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Biopsy	NGS	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	nCounter	⊘	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	IHC	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	⊘	✓	✓	⊘	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Done       No biopsy       Insufficient material  
 No available

Abbreviations: Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA), immunohistochemistry (IHC), next-generation sequencing (NGS), patient (P).

Table S1. Comparison of PD-L1 status between paired cytological and biopsy samples (N = 27).

		Biopsy		Total
		Positive	Negative	
EBUS-TBNA	Positive	20	0	20
	Negative	3	4	7
	Total	23	4	27

Number of observed agreements: 24 (88.9% of the observations). Number of agreements expected by chance: 18.1 (66.9% of the observations). Kappa = 0.664 (95% confidence interval from 0.326 to 1.000). Abbreviations: EBUS-TBNA, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle.

Table S2. Comparison of PD-L1 immunostaining between paired EBUS-TBNA specimens and biopsy samples (N = 27).

		Biopsy		Total
		TPS≥50%	TPS<50%	
EBUS-TBNA	TPS≥50%	11	0	11
	TPS<50%	5	11	16
	Total	16	11	27

Number of observed agreements: 22 (81.5% of the observations). Number of agreements expected by chance: 13.0 (48.3% of the observations). Kappa= 0.642 (95% confidence interval from 0.377 to 0.906). Abbreviations: EBUS-TBNA, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle; TPS, tumor proportion score.

Table S3. Characteristics of included studies exploring PD-L1 expression and/or other predictive biomarkers relevant in NSCLC tested by NGS in ERUS-TBNA samples.

Reference	Year	Smear/ Cell Block	N	Techniques	Molecular Tests	Comparison		Study	Success Rate/ Concordance	Other results / Comments
						histology vs. EBUS-cytology	EBUS-cytology			
[6]	2020	Cell Block	40	IHC	PD-L1	PD-L1	No	Retrospective	Success Rate 80% (N=32)	PD-L1 expression in advanced NSCLC
[7]	2020	Cell Block	53	IHC	PD-L1	PD-L1	Yes	Retrospective	Sensitivity 73.3%/Specificity 65.2%/VPP 65.2%/NPV 69.8% Concordance 69.8% cutoff TPS≥1% (N=37)	EBUS-TBNA samples are suitable for PD-L1 testing, especially using cutoff of TPS≥50%, concordance of 79.2% (42 pts)
[8]	2020	Cell Block	189	IHC	PD-L1	PD-L1	No	Retrospective	Success Rate 94.7% (N=179)	EBUS sample are adequate for PD-L1 testing
[9]	2020	Cell Block	120	IHC	PD-L1	PD-L1	Partial (N=18)	Retrospective	Success Rate 92% (N=110) Concordance 78% (N=18)	PD-L1 higher in EBUS than histologic samples; 5/18 discordant cases TPS≥50%
[10]	2019	-	50 (TBNA 27/ Stylet 23)	NGS/FISH/ IHC	NGS/ALK/ PD-L1 (Techniques not specified)	PD-L1	No	Retrospective	Success Rate (Stylet Retriected Partially vs Completely): NGS 88.9% (N=24)/91.3% (N=21); ALK 88.9% (N=24)/87% (N=20); PD-L1 85.2% (N=23)/ 87% (N=20)	Diagnostic yield comparison of ERUS-TBNA vs Stylet removal for molecular testing. PD-L1 cutoff TPS >50 or <50%.
[11]	2019	Cell Block	85	NGS/IHC/ RTPCR/ FISH	EGFR/ALK/ ROS1/ NGS (Lung Corel, 56 genes)	PD-L1	No	Prospective	Success Rate 91% (N=77)	100% concordant results between single gene and NGS testing
[12]	2019	Cell Block	71	IHC	PD-L1	PD-L1	Yes	Retrospective	Concordance : EBUS vs TBB 83.8% (N=68) EBUS vs Resected Primary 84.6% (N=13) EBUS vs Resected Metastases 86.7% (N=15)	Concordance: TPS cutoff 1% PD-L1 TPS higher in resected tumors than in EBUS-TBNA
[13]	2019	Cell Block	265	IHC	PD-L1	PD-L1	Partial (N=34)	Prospective	Success Rate 86.8% (N=230) Concordance 91.3% (N=31)	TPS≥50% higher in EBUS EBUS-FNA 100% agrees with histology samples- same anatomic site (N=16)
[14]	2019	Both	67	NGS	TruSeq Amplicon Cancer Panel 48 gene	PD-L1	No	Prospective	Success Rate: 92.5% Concordance: 75% (N=33)	EBUS-TBNA smears vs EBUS-TBNA cell-blocks Smears are recommended as primary source of DNA for NGS in EBUS-TBNA
[15]	2018	Cell Block	61	IHC	PD-L1	PD-L1	Yes	Retrospective	Concordance: 87% cutoff TPS≥1% (N=53) 82% cutoff TPS≥50% (N=50)	EBUS vs Resected Using a cutoff TPS≥50%, EBUS-TBNA specimens may misclassify the status of PD-L1
[16]	2018	Cell Block	398	Sanger or NGS /IHC/ FISH/ RTPCR	EGFR/ KRAS/ ALK/ BRAF/ PI3K/HER2 NGS (Sentosa SQ NSCLC, 11 genes)	PD-L1	No	Prospective	Success Rate: 79.4% (all techniques, N=316)	RTPCR test (EGFR/KRAS) in 43 cases EBUS-FNA provides high-quality material for tumor genotyping

[17]	2018	Cell Block	50	NGS / FISH/ IHC	NGS (GatorSeq 76 genes/ ALK/ PD-L1)	No	Retrospective	Success Rate: 82% (all techniques, N=41)	EBUS-TBNA is effective and has a high proportion of satisfactory results for testing PD-L1 expression on tumor cells in addition to NGS and ALK FISH
[18]	2018	Cell Block	115	NGS	NGS (MSK IMPACT, 368 genes)	No	Retrospective	Success Rate: 86.1% (N=99)	EBUS-TBNA reliably provided adequate tissue for hybrid capture NGS
[19]	2018	Cell Block	69	PCR, direct sequencing/ FISH	EGFR/KRAS/ ROS1/ALK	No	Prospective	Success Rate: 69.6% (all techniques, N=48)	EBUS-TBNA with a 21-gauge needle is appropriate for the analysis of multiple mutations and the genotyping of lung adenocarcinoma
[20]	2017	Both	54	NGS	OncoScreen (50 genes) OncoPlus (1213 genes) panels	No	Retrospective	Success Rate: OncoScreen, 98.0% (N=49); OncoPlus, 91.4% (N=32)	Success rate of NGS testing of EBUS samples utilizing 22- & 25-gauge needles. The size of the needle does not seem to affect the success rate of NGS tests
[21]	2017	Cell Block	97	IHC	PD-L1	Yes	Prospective	Concordance: All $r > 0.48$ , $P < 0.087$ EBUS vs resected primary $r = 0.75$ , $P = 0.086$ , $N = 6$ , EBUS vs lymph node $r = 0.93$ , $P = 0.02$ , $N = 5$ ; EBUS & TBB $r = 0.75$ , $P < 0.001$ , $N = 16$ ; TBB & primary tumor $r = 0.52$ , $P < 0.001$ , $N = 41$ ; lymph node & primary tumor $r = 0.48$ , $P < 0.001$ , $N = 47$	EBUS-TBNA is a promising method to evaluate PD-L1 expression. No cutoff of PD-L1 was used

**Abbreviations:** EBUS guided fine-needle aspiration (EBUS FNA), endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA), immunohistochemistry (IHC), fluorescent in situ hybridization (FISH), next-generation sequencing (NGS), non-small cell lung cancer (NSCLC), reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), transbronchial biopsy (TBB), tumor proportion score (TPS), positive predictive value (VPP), negative predictive value (VFN).

## References

1. Castillo, P.; Marginet, M.; Jares, P.; García, M.; Gonzalvo, E.; Arance, A.; García, A.; Alos, L.; Teixidó, C. Implementation of an NGS panel for clinical practice in paraffin-embedded tissue samples from locally advanced and metastatic melanoma patients. *Explor. Target Antitumor Ther.* **2020**, *1*, 101–108, doi:10.37349/etat.2020.00006
2. Marin, E.; Teixido, C.; Carmona-Rocha, E.; Reyes, R.; Arcocha, A.; Viñolas, N.; Rodríguez-Mues, M.; Cabrera, C.; Sánchez, M.; Vollmer, I.; et al. Usefulness of Two Independent DNA and RNA Tissue-Based Multiplex Assays for the Routine Care of Advanced NSCLC Patients. *Cancers* **2020**, *12*, 1124, doi:10.3390/cancers12051124.
3. Reguart, N.; Teixidó, C.; Giménez-Capitán, A.; Paré, L.; Galván, P.; Viteri, S.; Rodríguez, S.; Peg, V.; Aldeguez, E.; Viñolas, N.; et al. Prat A. Identification of ALK, ROS1, and RET fusions by a multiplexed mRNA-based assay in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin. Chem.* **2017**, *63*, 751–760.
4. Reguart, N.; Teixido, C.; Gimenez-Capitan, A.; Vilariño, N.; Arcocha, A.; Jares, P.; Castillo, S.; Bernal, X.; Muñoz, S.; Palmero, R.; et al. P1.01-075 Simultaneous Multiplex Profiling of Gene Fusions, METe14 Mutations and Immune Genes in Advanced NSCLC by NCounter Technology. *J. Thorac. Oncol.* **2017**, *12*, S1923, doi:10.1016/j.jtho.2017.09.729.
5. Teixidó, C.; Vilariño, N.; Reyes, R.; Reguart, N. PD-L1 expression testing in non-small cell lung cancer. *Ther. Adv. Med Oncol.* **2018**, *10*, doi:10.1177/1758835918763493.
6. Mineura, K.; Hamaji, M.; Yoshizawa, A.; Nakajima, N.; Kayawake, H.; Tanaka, S.; Yamada, Y.; Yutaka, Y.; Nakajima, D.; Ohsumi, A.; et al. Diagnostic yield of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration to assess tumor-programmed cell death ligand-1 expression in mediastinal lymph nodes metastasized from non-small cell lung cancer. *Surg. Today* **2020**, *50*, 1049–1055, doi:10.1007/s00595-020-01989-6.
7. Jug, R.; Giovacchini, C.X.; Liu, B.; Green, C.L.; Clarke, J.M.; Mahmood, K.; Pavlisko, E.N. EBUS-FNA cytologic-histologic correlation of PD-L1 immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J. Am. Soc. Cytopathol.* **2020**, *9*, 485–93, doi:10.1016/j.jasc.2020.04.003.
8. Perrotta, F.; Nankivell, M.; Adizie, J.B.; Maqsood, U.; Elshafi, M.; Jafri, S.; Lerner, A.D.; Woolhouse, I.; Munavvar, M.; Evison, M.; et al. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration for PD-L1 Testing in Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* **2020**, *158*, 1230–1239.
9. Smith, A.; Wang, H.; Zerbo, A.; Beaudoin, S.; Ofiara, L.; Fiset, P.-O.; Benedetti, A.; Gonzalez, A.V. Programmed Death Ligand 1 Testing of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Samples Acquired for the Diagnosis and Staging of Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Bronchol. Interv. Pulmonol.* **2020**, *27*, 50–57, doi:10.1097/lbr.0000000000000623.
10. Fernandez-Bussy, S.; Biswas, A.; Labarca, G.; Jantz, M.A.; Mehta, H.J. Comparison of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration With Stylet Retracted Partially Versus Completely for Molecular Testing. *J. Bronchol. Interv. Pulmonol.* **2019**, *26*, 222–224, doi:10.1097/lbr.0000000000000596.
11. Xie, F.; Zheng, X.; Mao, X.; Zhao, R.; Ye, J.; Zhang, Y.; Sun, J. Next-Generation Sequencing for Genotyping of Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Samples in Lung Cancer. *Ann. Thorac. Surg.* **2019**, *108*, 219–226, doi:10.1016/j.athoracsur.2019.02.010.
12. Yoshimura, K.; Inoue, Y.; Karayama, M.; Tsuchiya, K.; Mori, K.; Suzuki, Y.; Iwashita, Y.; Kahyo, T.; Kawase, A.; Tanahashi, M.; et al. Heterogeneity analysis of PD-L1 expression and copy number status in EBUS-TBNA biopsy specimens of non-small cell lung cancer: Comparative assessment of primary and metastatic sites. *Lung Cancer* **2019**, *134*, 202–209, doi:10.1016/j.lungcan.2019.06.002.
13. Wang, G.; Ionescu, D.N.; Lee, C.-H.; Hiruki, T.; Myers, R.; Shaipanich, T.; Lam, S.; Melosky, B.; Zhou, C. PD-L1 testing on the EBUS-FNA cytology specimens of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **2019**, *136*, 1–5, doi:10.1016/j.lungcan.2019.07.033.
14. Fielding, D.; Dalley, A.J.; Bashirzadeh, F.; Singh, M.; Nandakumar, L.; Reed, A.E.M.; Black, D.; Kazakoff, S.; Pearson, J.V.; Nones, K.; et al. Diff-Quik Cytology Smears from Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration Lymph Node Specimens as a Source of DNA for Next-Generation Sequencing Instead of Cell Blocks. *Respir.* **2019**, *97*, 525–539, doi:10.1159/000495661.
15. Sakata, K.K.; Midthun, D.E.; Mullon, J.J.; Kern, R.M.; Nelson, D.R.; Edell, E.S.; Schiavo, D.N.; Jett, J.R.; Aubry, M.C. Comparison of Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemical Staining Between Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration and Resected Lung Cancer Specimens. *Chest* **2018**, *154*, 827–837, doi:10.1016/j.chest.2018.07.017.
16. Ghigna, M.-R.; Crutu, A.; Florea, V.; Feuillet-Soummer, S.; Baldeyrou, P.; Adam, J.; Lacroix, L.; Besse, B.; Mercier, O.; Fadel, E.; et al. Endobronchial ultrasound-guided fine-needle aspiration for pulmonary carcinomas genotyping: experience with 398 cases including rapid EGFR/KRAS analysis in 43 cases. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 4653–4658, doi:10.21037/jtd.2018.06.157.
17. Biswas, A.; Leon, M.E.; Drew, P.; Fernandez-Bussy, S.; Furtado, L.V.; Jantz, M.A.; Mehta, H.J. Clinical performance of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for assessing programmed death ligand-1 expression in nonsmall cell lung cancer. *Diagn. Cytopathol.* **2018**, *46*, 378–383, doi:10.1002/dc.23900.
18. Turner, S.R.; Buonocore, D.; Desmeules, P.; Rekhman, N.; Dogan, S.; Lin, O.; Arcila, M.E.; Jones, D.R.; Huang, J. Feasibility of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration for massively parallel next-generation sequencing in thoracic cancer patients. *Lung Cancer* **2018**, *119*, 85–90.
19. Raad, S.; Hanna, N.; Jalal, S.; Bendaly, E.; Zhang, C.; Nuguru, S.; Oueini, H.; Diab, K. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Use for Subclassification and Genotyping of Lung Non-Small-Cell Carcinoma. *South. Med J.* **2018**, *111*, 484–488, doi:10.14423/smj.0000000000000846.

20. Stoy, S.P.; Segal, J.P.; Mueller, J.; Furtado, L.V.; Vokes, E.E.; Patel, J.D.; Murgu, S. Feasibility of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Cytology Specimens for Next Generation Sequencing in Non-small-cell Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* 2018, 19, 230–238.e2, doi:10.1016/j.clcc.2017.11.010.
21. Sakakibara, R.; Inamura, K.; Tambo, Y.; Ninomiya, H.; Kitazono, S.; Yanagitani, N.; Horiike, A.; Ohyanagi, F.; Matsuura, Y.; Nakao, M.; et al. EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin. Lung Cancer* 2017, 18, 527–534.e1, doi:10.1016/j.clcc.2016.12.002.



**ARTÍCULO 3**

**“EBUS-TBNA in Extrathoracic Malignancies:  
Diagnostic and Prognostic Implications”**

**Martin-Deleon R**, Solarat B, Moisés J, Lucena CM, Fontana A, Marrades RM, Agustí C.

*Lung* 2022; 200(6): 747-753. doi: 10.1007/s00408-022-00584-5.



Lung  
<https://doi.org/10.1007/s00408-022-00584-5>

INTERVENTIONAL PULMONOLOGY



## EBUS-TBNA in Extrathoracic Malignancies: Diagnostic and Prognostic Implications

Roberto Martin-Deleon<sup>1</sup> · Belén Solarat<sup>1</sup> · Jorge Moisés<sup>1</sup> · Carmen M Lucena<sup>1</sup> · Ainhoa Fontana<sup>1</sup> · Ramón M Marrades<sup>1</sup> · Carles Agustí<sup>1</sup>

Received: 12 August 2022 / Accepted: 9 October 2022  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

### Abstract

**Purpose** In patients with extrathoracic malignancies (EM) the role of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) for the assessment of abnormal mediastinal lymph nodes (MLN) is controversial. The aim of this study was to assess the diagnostic yield and prognostic significance of EBUS-TBNA in these patients.

**Methods** Retrospective analysis of patients with EM and abnormal MLN detected by Computed Tomography (CT) and/or Positron Emission Tomography (PET).

**Results** A total of 161 patients with EM and abnormal MLN were included (93 males, 58%). The most common EM was melanoma (19%) and gastrointestinal cancer (17%). Assessed lymph nodes were mediastinal in 70% of cases and hilar in 30%. The most frequently sampled lymph nodes were subcarinal (45%) and lower right paratracheal (21%). Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of EBUS-TBNA for the diagnosis of malignancy were 88%, 100%, 100% and 87%, respectively. These values were similar regardless the type of EM except for head and neck tumors where the NPV was particularly low (67%). The diagnosis of neoplastic involvement by EBUS-TBNA implied a worse prognosis in terms of overall survival ( $p < 0.02$ ) and cancer-specific survival ( $p < 0.001$ ).

**Conclusions** In patients with EM and abnormal MLN, EBUS-TBNA has a high diagnostic yield. However, the NPV decrease in patients with head and neck tumors. Neoplastic MLN detected by EBUS-TBNA has prognostic implications in these patients.

**Keywords** EBUS · Fine needle aspiration · Mediastinal lymph nodes · Extrathoracic malignancy

### Introduction

Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) is of paramount importance in the diagnosis and staging of lung cancer [1–3]. In recent years, the indications for EBUS-TBNA have expanded, demonstrating also efficacy in diseases such as sarcoidosis, tuberculosis or lymphomas [4–6]. Patients with extrathoracic malignancies (EM) often present abnormal mediastinal lymph nodes (MLN) that are not due to metastatic infiltration but secondary to inflammatory or infectious complications [7–9]. The correct characterization of these MLN is essential to optimize therapeutic strategies and to establish the prognosis of

these patients. Although several studies have evaluated the usefulness of EBUS-TBNA in this clinical scenario, these are series with a relatively small number of cases that use variable selection criteria, so definitive conclusions cannot be drawn [10–14]. Moreover, the prognostic implication of mediastinal invasion by the EM in these patients is unknown. The objectives of the present study, carried out in patients with EM and abnormal MLN are: (1) to know the global and specific diagnostic yield of EBUS-TBNA and, (2) to know the prognostic implication of mediastinal neoplastic invasion due to the underlying disease.

✉ Carles Agustí  
 cagusti@clinic.cat

<sup>1</sup> Pulmonary Service, Thoracic Oncology Unit, Hospital Clínic Barcelona, 170 Villarroel, 08036 Barcelona, Spain

## Methods

### Study Design

Retrospective observational study performed in an interventional endoscopy unit of a tertiary hospital from January 2010 to September 2020 (Reg. HCB/2022/0230). All patients with prior or concurrent diagnosis of EM who underwent EBUS-TBNA to assess abnormal mediastinal or hilar lymph nodes (minor diameter  $\geq 5$  mm and/or pathological uptake on PET-CT) were included.

Patients diagnosed with lymphoproliferative syndromes, those with previous or final diagnosis of lung cancer and patients with mediastinal metastases of unknown origin were excluded.

### Thoraco-Abdominal Computed Tomography (CT)

Different Siemens ® equipment 64 was used (Siemens Sensation 16, Siemens Sensation 64 and Siemens Flash 65 128; Elargen, Germany). The studies were performed after iodinated contrast injection and using the same standardized protocol: 5 mm collimation with 3 mm reconstruction with filter in mediastinal window, 1.5 mm collimation with filter in pulmonary window and 5 mm collimation with 3 mm reconstruction with filter in abdomen.

### Positron Emission Tomography (PET-CT)

Hybrid equipment (Biograph mCT True V PET-CT, Siemens USA) with a low dose CT with attenuation correction and image fusion. The scan was performed with the patient fasting for at least 6 h to achieve glycemia values below 140 mg/dL and at rest, in a dimly lit room for 60 min after intravenous administration of 18-FDG (4.07 MBq/kg). PET data reconstruction was performed following an iterative algorithm from the CT images. PET was considered negative when there was minimum (similar to the surrounding mediastinum) or no mediastinal lymph nodes F-fluorodeoxyglucose (FDG) uptake. SUVmax (Standardized Maximum Uptake) was calculated as the value that corresponds to the ratio of uptake/volume of the voxel of maximum uptake. Lymph nodes were considered pathological when they presented a minor diameter  $\geq 5$  mm and/or were PET positive.

### EBUS-TBNA

A linear endobronchial ultrasound (Pentax ® EB-1970UK 2.0) and 22G needles (Cook Medical ® Echotip ® Ultra) were used. The procedure was performed under anesthesiologist-controlled conscious sedation using individualized doses of

intravenous propofol, remifentanyl and/or midazolam. Abnormal mediastinal/hilar lymph nodes were categorized following the Mountain-Dresler classification [15]. A minimum of three punctures of at least one of the identified abnormal MLN were performed. The specimens obtained were spread on a conventional slide and stained by Diff-Quick technique for "in situ" evaluation by a cytopathologist (Rapid on-site evaluation; ROSE) and subsequently by hematoxylin & eosin staining. Part of the smears obtained was fixed in 96° alcohol for subsequent staining in the laboratory and deferred examination. Whenever the cytopathologist considered necessary, material was obtained to prepare a cell block for immunohistochemical analysis. The cytological samples obtained were classified as: (1) neoplastic: when definitive features of malignancy were identified in the sample obtained; (2) benign: when there were specific cytological findings of a specific benign condition including granulomatous inflammation; (3) non-diagnostic: when only the presence of lymphocytes were observed in a significant number consistent with normal lymph node (more than 150 lymphocytes/field [16]). Neoplastic and benign samples were assumed to be true positive and no further examinations were performed for confirmation. In non diagnostic cases, clinical/radiological follow-up was performed for a minimum of six months or alternative diagnostic tests were conducted according to clinical judgement.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 24.0. Normally distributed continuous variables are expressed as mean  $\pm$  standard deviation ( $X \pm SD$ ), asymmetrically distributed variables as median and interquartile range [Me, (IQR)] and categorical variables as frequencies. Comparison of means was calculated with Student's *t* test if the distribution was normal or with the Mann-Whitney *U* test in the opposite case. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Standard formulas were used to calculate sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) [17].

Overall Survival (OS) and Cancer-Specific Survival (CSS) defined respectively as the time elapsed from the diagnosis of mediastinal involvement to death from any cause or from the previously diagnosed EM were analyzed. Kaplan-Meier curves for OS and CSS were constructed by comparing means using the log-rank test.

Lung

**Table 1** General characteristics of the study population

	N (%) o mean (range)
Age (years)	61.5 (28–86)
Sex	
Male	93 (57.8)
Female	68 (42.2)
Origin of the neoplasm	
Melanoma	30 (18.6)
Gastrointestinal	27 (16.8)
Breast	19 (11.8)
Renal	19 (11.8)
Gynecological	18 (11.2)
Head and Neck	15 (9.3)
Others*	33 (20.5)

\*Others: bladder, prostate, thymoma, hepatocarcinoma, sarcoma, thyroid, pancreas, nasal squamous cell carcinoma

**Table 2** Anatomic mediastinal region explored by EBUS-TBNA and PET uptake

	N (%) o mean (range)
Subcarinal (7)	73 (45.3)
Low right paratracheal (4R)	34 (21.1)
Left interlobar (11L)	16 (9.9)
Right interlobar (11R)	12 (7.5)
Right hilar (10R)	11 (6.8)
Left hilar (10L)	5 (3.1)
Low left paratracheal (4L)	3 (1.9)
Right lobar (12R)	2 (1.2)
Left lobar (12L)	2 (1.2)
High right paratracheal (2R)	2 (1.2)
High left paratracheal (2L)	1 (0.6)
Number of punctures	5.01 (1–16)
PET uptake (SuvMax)	
Positive by EBUS	7.58 (1.5–23.9)
Negative by EBUS	5.34 (0.0–14.8)

**Results**

**Patients**

Table 1 shows the general characteristics of the population. A total of 161 patients with EM were evaluated with a median age of 64 years (range 28–86) with 58% (93/161) being male. The most frequent EM was melanoma (19%, 30/161) followed by gastrointestinal cancer (17%, 27/161).

**Characteristics of Lymph Node Involvement**

Seventy per cent (113/161) of the MLN evaluated by EBUS-TBNA were mediastinal and 30% were hilar (48/161). The most frequently evaluated anatomical regions were subcarinal (45%, 73/161) and lower right paratracheal (21%, 34/161) (Table 2). The median size of the punctured MLN was 13.2 mm [9.4–17.4]. In 81 patients (50%) the PET-CT result was available before EBUS-TBNA. Metastatic MLN had a larger size (16.3 mm vs. 10.7 mm;  $p < 0.001$ ) and greater SUVmax (7.3 vs. 5.2;  $p < 0.03$ ) than benign MLN.

**EBUS-TBNA**

Figure 1 shows the diagram flow of the study. EBUS-TBNA specimens were classified as neoplastic in 74 cases (46%), benign in 13 cases (8%) (2 simple mediastinal cysts; 10 pulmonary sarcoidosis and one non-granulomatous disease), non-diagnostic in 74 cases (46%).

In the group of 74 patients with non-diagnostic EBUS-TBNA samples, radiological follow-up backed up the absence of MLN neoplastic invasion in 58 patients and confirmed the metastatic involvement in 6 [median duration of follow-up: 32 (19–75) months]. In 8 patients,

alternative diagnostic procedures were performed (4 mediastinoscopies, 2 EBUS-TBNA, 1 Endoscopic ultrasonography (EUS) and 1 CT-guided fine needle thoracic biopsy), confirming the presence of malignancy in 4 patients and its absence in the other 4 (one patient finally diagnosed with sarcoidosis).

The prevalence of neoplastic disease in the study population was 52% (84/161).

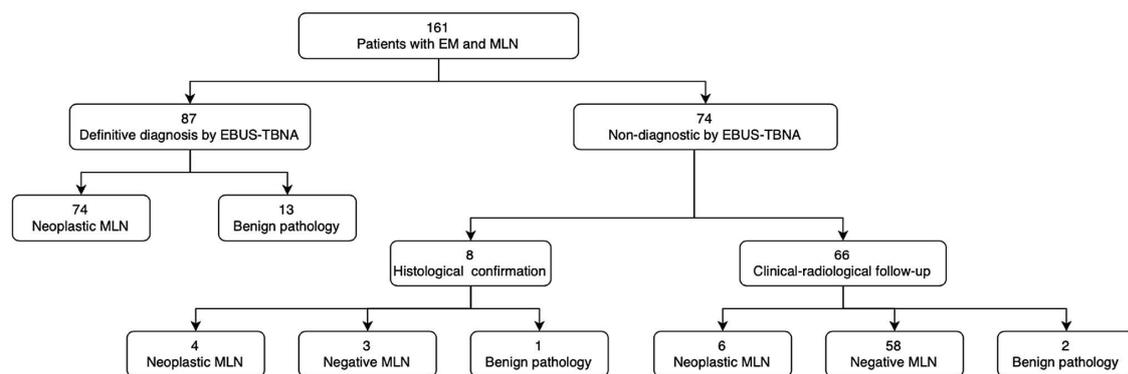
The overall sensitivity of EBUS-TBNA for the diagnosis of malignancy in patients with EM and abnormal MLN was 88% (95% CI 79.5–93.4); specificity, 100% (95% CI 94.7–100), positive predictive value (PPV), 100% (95% CI 95.1–100) and negative predictive value (NPV), 87% (95% CI 78.2–94) with an accuracy of 94% (95% CI 88.4–93.4) (Table 3).

The sensitivity of EBUS-TBNA in patients with head and neck carcinoma was lower than in patients with other types of EM (Table 3).

No relevant complications were observed with EBUS-TBNA in the studied population.

**Immunohistochemical Analysis**

Immunohistochemical analysis was performed in 41 of the 43 malignant cytologic specimens. Samples corresponded to patients with breast cancer (13 cases (30% of the total), melanoma (8 cases, 19%), and gastrointestinal cancer (7 cases, 16%). In only two cases, the quality of the sample did not allow to perform immunohistochemistry (one patient with breast cancer and another with melanoma).



Abbreviations: EBUS-TBNA: Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration; EM: extrathoracic Malignancies; MLN: mediastinal lymph nodes.

Fig. 1 Distribution of patients according to EBUS-TBNA results and final diagnosis

**Table 3** Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) according to the origin of the extrathoracic malignancy

Origin of the neoplasm	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (IC 95%)
Global	88	100	100	87	94 (88.4–93.4)
Melanoma	87	100	100	88	93 (78.7–98.2)
Gastrointestinal	91	100	100	94	96 (81.1–99.3)
Breast	100	100	100	100	100 (83.2–100)
Renal	93	100	100	67	94 (73.0–99.0)
Gynecological	89	100	100	90	94 (74.2–99.0)
Head and Neck	57	100	100	67	77 (49.7–91.8)
Others*	83	100	100	90	93 (78.7–98.2)

\*Others: bladder, prostate, thymoma, hepatocarcinoma, sarcoma, thyroid, pancreas, nasal squamous cell carcinoma

## Prognostic Analysis

Figures 2A and B show respectively the overall survival (OS) and cancer-specific survival (CSS) of patients with and without malignant MLN diagnosed by EBUS-TBNA.

Both OS and CSS were significantly worse in patients with identified malignant MLN by EBUS-TBNA compared with those with benign MLN. Overall survival: 49 months (95% CI 38–60) vs 71 months (95% CI 58.4–85);  $p < 0.02$  (Fig. 2A) Cancer-specific survival: 52 months (95% CI 39.7–64) vs 89 months (95% CI 74–103)  $p < 0.001$ ; (Fig. 2B). When analyzing the cohort by the origin of the EM, the prognostic impact of MLN metastases on OS was maintained in patients with gynecological cancer ( $p < 0.005$ ), and melanoma ( $p < 0.04$ ) and there was statistical trend in patients with breast cancer ( $p < 0.09$ ).

## Discussion

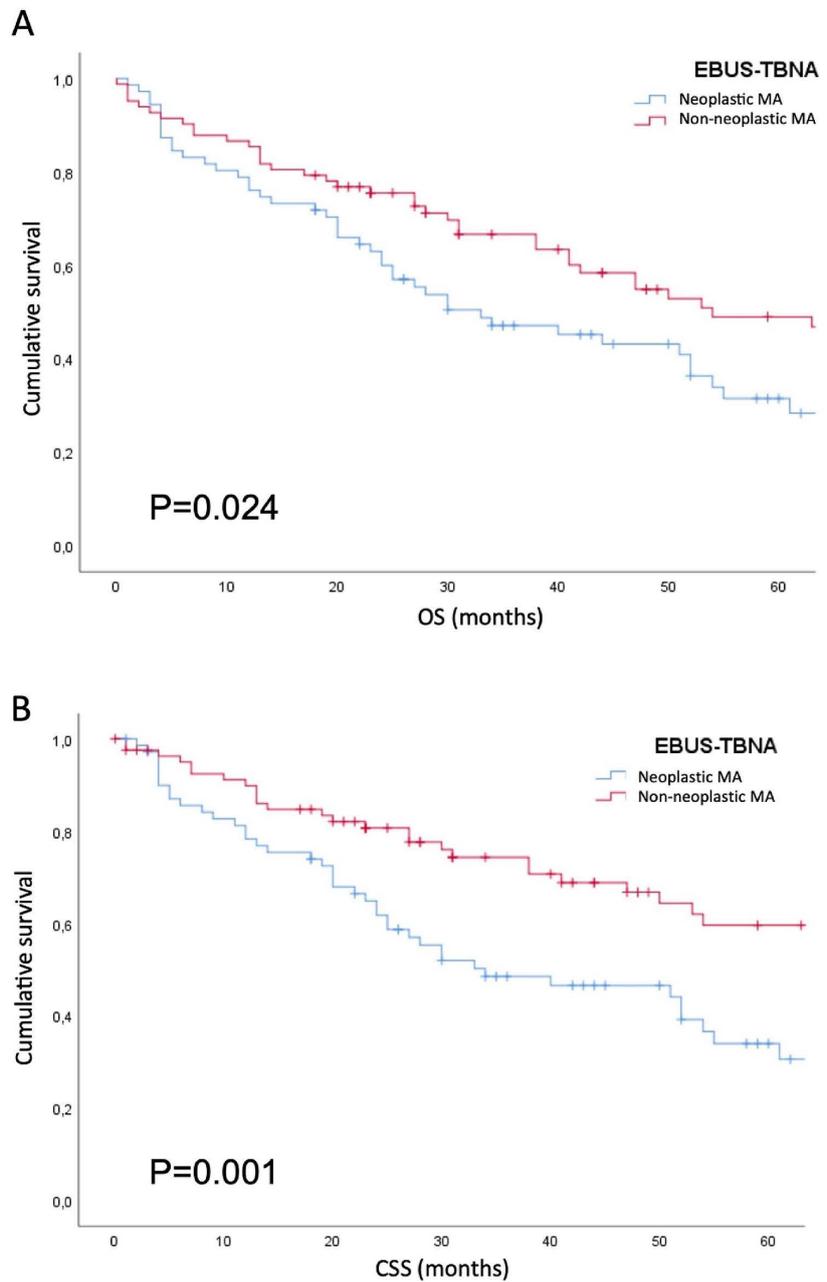
The present study shows that in patients with EM, almost half of the abnormal MLN evaluated by EBUS-TBNA are not affected by the underlying disease. In this scenario, the diagnostic yield of EBUS-TBNA shows high sensitivity and NPV for the different types of EM with the exception of head and neck tumors. Demonstration of mediastinal invasion by EBUS-TBNA confers a poor prognosis to these patients.

## Previous Studies

Several studies have evaluated the role of EBUS-TBNA in patients with EM and abnormal MLN. Navani et al. [18], reported an overall sensitivity of 87% and an accuracy of 88%, results that are comparable to other retrospective

Lung

**Fig. 2** Kaplan Meier analysis of overall survival (OS) **A** and cancer-specific survival (CSS) **B** according to the presence or absence of neoplastic mediastinal adenopathies (MA) invasion detected by EBUS-TBNA



series with a smaller number of patients [10–14]. Yang et al. [9] in a meta-analysis including 533 patients obtained a sensitivity of 85%, a specificity of 99% and an accuracy of 86%. Fournier et al. [19], in a multicenter study with a similar amount of patients obtained however lower accuracy (54.6%), sensitivity 68.4% and NPV (53.3%) that was

probably explained by the lack of follow-up in 24 patients. The evidence generated from these studies advocate the use of EBUS-TBNA as the first examination to be performed in these patients. However, no firm conclusions can be drawn since most papers included relatively small cohorts and a very heterogeneous population [9].

## Interpretation of Findings

The present cohort is one of the largest published to date and, unlike others, specifically excludes patients with a final diagnosis of lung cancer, lymphoproliferative syndrome or mediastinal metastases of unknown origin, clinical scenarios in which the diagnostic yield of EBUS-TBNA may differ substantially [11, 14, 18, 19].

The present study confirms the favorable results of EBUS-TBNA in terms of sensitivity and specificity with a high NPV. However, independent analysis according to the type of EM showed that the diagnostic yield of this procedure in patients with primary head and neck neoplasm is lower, with a sensitivity of 57% and a NPV of 67%. Although this finding should be validated in prospective studies with a larger number of patients, the relatively high percentage of false negatives (global: 13%, and 33% for patients with head and neck cancer) suggest that surgical mediastinal exploration should be performed in those cases with a negative result of EBUS-TBNA but a high clinical suspicion of lymph node involvement due to the underlying disease [20]. It should be noted that both lymph node size and SUV-max on PET can provide useful clinical information [21]. In our cohort, metastatic MLN had a larger size and an increase in the SUV-max compared with benign MLN. Similarly, the presence of granulomas in EBUS samples could also be of help since it has been shown that their presence confers a 100% NPV in a retrospective series of patients with extrathoracic malignancies [22].

Our results confirm that EBUS-TBNA samples are suitable for immunohistochemical analysis [11, 12, 14, 23]. This finding can be of great utility in patients with previous history of simultaneous EM or when primary lung cancer cannot be excluded. Cytological samples obtained by EBUS-TBNA in patients with lung cancer may be used to identify certain therapeutic targets and disease drivers [24], so it is likely that they could also be useful in patients with EM.

One of the most clinically relevant findings of the present study is that mediastinal involvement by EM confers a poor prognosis. When analyzed specifically by type of EM, the worse prognosis of mediastinal neoplastic invasion was confirmed for patients with gynecologic cancer, melanoma and breast cancer (the latter did not reach statistical significance). These findings need to be confirmed in prospective studies with the corresponding multivariate analysis. Nevertheless, the knowledge that mediastinal invasion is a variable that constitutes a poor prognosis "per se" could imply changes in the therapeutic strategy for these patients.

## Study Limitations

There are several limitations that need to be considered for a proper analysis of the results. Firstly, this is a retrospective

study, which entails a potential selection bias. Secondly, although this is the largest cohort published to date, when the specific analysis by type of EM is performed, the sample size is small. Nevertheless, the only published cohort evaluating the role of EBUS-TBNA in patients with a single type of EM (breast cancer) confirmed the efficacy of this diagnostic technique [23]. Finally, and as in the other published studies, the majority of EBUS-TBNA-negative cases were not confirmed by alternative techniques.

## Conclusions

EBUS-TBNA has a high diagnostic yield in the study of abnormal MLN in patients with EM. However, the NPV could vary substantially depending on the origin of the EM, being especially low in patients with head and neck cancer. Metastatic invasion of MLN by the EM has prognostic implications.

**Author contributions** RMD had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. RMD, BS, JM, CML, AF, RMM and CA contributed substantially to the study design, data analysis and interpretation, and writing of the manuscript.

**Funding** The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

**Data availability** All data generated or analyzed during this study are included in this report. Further enquiries can be directed to the corresponding author.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to declare.

## References

1. Yasufuku K, Chiyo M, Koh E, Moriya Y, Iyoda A, Sekine Y et al (2005) Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer. *Lung Cancer* 50(3):347–354. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.07.013>
2. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT et al (2013) Methods for staging non-small cell lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 143(5 Suppl):e211S – e250. <https://doi.org/10.1378/chest.12-2355>
3. De Leyn P, Dooms C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R et al (2014) Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 45(5):787–798. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu028>
4. Kennedy MP, Jimenez CA, Bruzzi JF, Mhatre AD, Lei X, Giles FJ et al (2008) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis of lymphoma. *Thorax* 63(4):360–365. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.084079>

5. Agarwal R, Srinivasan A, Aggarwal AN, Gupta D (2012) Efficacy and safety of convex probe EBUS-TBNA in sarcoidosis: a systematic review and meta-analysis. *Respir Med* 106(6):883–892. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2012.02.014>
6. Geake J, Hammerschlag G, Nguyen P, Wallbridge P, Jenkin GA, Korman TM et al (2015) Utility of EBUS-TBNA for diagnosis of mediastinal tuberculous lymphadenitis: a multicentre Australian experience. *J Thorac Dis* 7(3):439–448. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.01.33>
7. Kamby C, Andersen J, Ejlersen B, Birkler NE, Rytter L, Zedeler K et al (1991) Pattern of spread and progression in relation to the characteristics of the primary tumour in human breast cancer. *Acta Oncol* 30(3):301–308. <https://doi.org/10.3109/02841869109092375>
8. Bono AV, Lovisolo JA (1997) Renal cell carcinoma—diagnosis and treatment: state of the art. *Eur Urol* 31(Suppl 1):47–55. <https://doi.org/10.1159/000474531>
9. Yang B, Li F, Shi W, Liu H, Sun S, Zhang G et al (2014) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy for the diagnosis of intrathoracic lymph node metastases from extrathoracic malignancies: a meta-analysis and systematic review. *Respirology* 19(6):834–841. <https://doi.org/10.1111/resp.12335>
10. Song JU, Park HY, Jeon K, Koh WJ, Suh GY, Chung MP et al (2011) The role of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis of mediastinal and hilar lymph node metastases in patients with extrapulmonary malignancy. *Intern Med* 50(21):2525–2532. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.50.5834>
11. Park J, Jang SJ, Park YS, Oh YM, Shim TS, Kim WS et al (2011) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy for diagnosis of mediastinal lymphadenopathy in patients with extrathoracic malignancy. *J Korean Med Sci* 26(2):274–278. <https://doi.org/10.3346/jkms.2011.26.2.274>
12. Tournoy KG, Govaerts E, Malfait T, Dooms C (2011) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy for M1 staging of extrathoracic malignancies. *Ann Oncol* 22(1):127–131. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq311>
13. Parmaksız ET, Caglayan B, Salepci B, Comert SS, Kiral N, Fidan A et al (2012) The utility of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal or hilar lymph node evaluation in extrathoracic malignancy: benign or malignant? *Ann Thorac Med* 7(4):210–214. <https://doi.org/10.4103/1817-1737.102171>
14. Sanz-Santos J, Cirauqui B, Sanchez E, Andreo F, Serra P, Monso E et al (2013) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis of intrathoracic lymph node metastases from extrathoracic malignancies. *Clin Exp Metastasis* 30(4):521–528. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9556-3>
15. Mountain CF, Dresler CM (1997) Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 111(6):1718–1723. <https://doi.org/10.1378/chest.111.6.1718>
16. Gullón Blanco JA, Villanueva Montes M, Rodríguez López J, Sánchez AA (2017) Negative endobronchial ultrasound in lung cancer staging. *Arch Bronconeumol* 53(11):646–647. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2017.03.007>
17. Altman DG, Bland JM (1994) Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ* 308(6943):1552. <https://doi.org/10.1136/bmj.308.6943.1552>
18. Navani N, Nankivell M, Woolhouse I, Harrison RN, Munavvar M, Oltmanns U et al (2011) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for the diagnosis of intrathoracic lymphadenopathy in patients with extrathoracic malignancy: a multicenter study. *J Thorac Oncol* 6(9):1505–1509. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318223c3fe>
19. Fournier C, Hermant C, Gounant V, Escarguel B, Thibout Y, Lachkar S, et al. (2019) Diagnostic of mediastinal lymphadenopathy in extrathoracic cancer: A place for EBUS-TBNA in real life practice. *Respir Med Res* 75: 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.resmer.2019.03.001>
20. Navani N, Lawrence DR, Kolvekar S, Hayward M, McAsey D, Kocjan G, et al. (2012) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration prevents mediastinoscopies in the diagnosis of isolated mediastinal lymphadenopathy: a prospective trial. *Am J Respir Crit Care Med* 186(3): 255–60. <https://doi.org/10.1164/rccm.201203-0393OC>
21. Schmid-Bindert G, Jiang H, Kähler G, Saur J, Henzler T, Wang H et al (2012) Predicting malignancy in mediastinal lymph nodes by endobronchial ultrasound: a new ultrasound scoring system. *Respirology* 17(8):1190–1198. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2012.02223.x>
22. Bellinger CR, Sharma D, Ruiz J, Parks G, Dotson T, Haponik EF (2019) Negative predictive value of granulomas on EBUS-TBNA in suspected extrathoracic malignancy. *Lung* 194(3):387–91. <https://doi.org/10.1007/s00408-016-9878-z>
23. Argento AC, Gilstrap DL, Shofer S, Mahmood K, Blackwell K, Wahidi MM (2018) Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis of breast cancer thoracic metastases and detection of receptor discordance. *J Bronchol Interv Pulmonol* 25(3):176–180. <https://doi.org/10.1097/LBR.0000000000000476>
24. Martin-Deleon R, Teixido C, Lucena CM, Martinez D, Fontana A, Reyes R, et al. (2021) EBUS-TBNA cytological samples for comprehensive molecular testing in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers13092084>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



## 6. DISCUSIÓN



## **6. DISCUSIÓN**

Los trabajos que componen esta tesis han permitido profundizar en el conocimiento sobre la rentabilidad diagnóstica y las implicaciones clínicas derivadas del uso del EBUS-TBNA tanto en pacientes con CPCNP como en otro tipo de NE. El EBUS-TBNA es una técnica que ofrece un perfil de seguridad y un rendimiento diagnóstico óptimo con una alta sensibilidad, especificidad y VPN en el CP (61). Las indicaciones del EBUS-TBNA están incrementándose de manera significativa a medida que se conoce nueva evidencia científica sobre su utilidad en diferentes situaciones clínicas (60). Esta tesis doctoral pretende ampliar el horizonte de posibilidades que ofrece esta técnica endoscópica. En concreto, los estudios realizados se han centrado en valorar la rentabilidad del EBUS-TBNA en la estadificación mediastínica del CPCNP con factores de riesgo para MMO, determinar la utilidad del EBUS-TBNA en el genotipado y análisis del PD-L1 en el CPCNP y finalmente definir el valor diagnóstico y pronóstico del EBUS-TBNA en la afectación de AHM en pacientes con NE.

En pacientes con CPCNP es imprescindible realizar una correcta estadificación mediastínica, dado que de ella dependerá tanto el tratamiento específico como el pronóstico de la enfermedad (85). Varios estudios han determinado que ciertos pacientes con CPCNP y PET-TC negativo podrían tener un riesgo incrementado de MMO (39). Dichos pacientes incluirían aquellos en los que existe afectación de ganglios hiliares homolaterales en las pruebas de imagen (N1 clínico; cN1), pacientes con un tumor de localización central y/o pacientes con un tumor de más de 30 mm de diámetro mayor. No obstante, entre los diferentes estudios publicados existen discrepancias respecto a la prevalencia de MMO en estos casos (86, 87). Por otro lado, se desconoce cuál es el mejor abordaje diagnóstico para conseguir una estadificación eficiente (38, 86).

Así, en el primer estudio se aborda de manera prospectiva la utilidad real de una estrategia de estadificación mediastínica integral. Para ello, en aquellos pacientes con CPCNP que presentaban factores de riesgo para MMO se realizó una VAM siempre que los resultados de un EBUS-TBNA previo fueran negativos.

Durante un período de 4 años desde abril de 2015 hasta abril de 2019, se incluyeron un total de 63 pacientes con diagnóstico de CPCNP y factores de riesgo para MMO. Se excluyeron del estudio los pacientes mayores de 85 años, los pacientes con CCP, los que presentaban un CP previo intervenido, los pacientes con performance status bajo y aquellos que se consideraron inoperables en base a las pruebas de función pulmonar.

En todos los casos, el estudio por imagen del mediastino fue negativo definiéndose como tal: la ausencia en el PET-TC de AHM o la presencia de AHM con un diámetro del eje corto  $< 10$  mm y/o con captación de FDG mínima (similar a la del mediastino circundante) o inexistente. La centralidad se definió cuando al menos la mitad del tumor estaba localizada en el tercio interno del pulmón. cN1 vino determinada como la presencia de ganglios linfáticos hiliares  $\geq 10$  mm en el eje corto en la TC y/o captación de FDG en el PET en los ganglios N1.

El EBUS se realizó en la unidad de broncoscopia bajo sedación consciente llevada a cabo por un anestesiólogo experto. Se realizó una evaluación sistemática comenzando con la exploración de las estaciones N3 seguidas de las estaciones N2, y se tomaron muestras (TBNA) aquellas AHM con un diámetro menor de  $\geq 5$  mm. Una evaluación rápida in situ (ROSE, del inglés rapid on-site evaluation) permitía garantizar la calidad de las muestras, descartando malignidad cuando al menos 3 pases de aguja por estación mostraran linfocitos normales sin presencia de células atípicas.

A los pacientes con un EBUS-TBNA negativo, se les practicó una VAM. Para ello se siguieron las guías clínicas europeas (88), incluyendo una evaluación sistemática de las estaciones paratraqueales derechas e izquierdas y subcarinal (2R, 2L, 4R, 4L y 7). Los pacientes en los que la VAM fue negativa, se sometieron a resección quirúrgica del tumor pulmonar y disección mediastínica completa.

Se evaluaron un total de 63 pacientes con CPCNP y factores de riesgo para MMO, incluyéndose en el estudio un total de 49 pacientes (78%). Ocho pacientes fueron excluidos al estar participando en un ensayo clínico y otros seis debido a una limitación de la capacidad pulmonar que impedía la cirugía de resección.

Se demostró que la prevalencia de MMO en la población de estudio era baja (10%); siendo la sensibilidad del EBUS-TBNA de un 40%, con un VPN del 94%. En este escenario, el valor añadido que ofrece la VAM después de un EBUS-TBNA negativo fue marginal; reduciendo la probabilidad de identificar una MMO de un 6% con un EBUS previo negativo a un 4%.

La mayoría de los estudios que han evaluado el papel del EBUS-TBNA en pacientes con CPCNP y mediastino normal son retrospectivos, incluyen una población heterogénea (con y sin factores de riesgo para MMO) y siguen una metodología de realización del EBUS-TBNA diferente (89, 90). Todo esto condiciona una prevalencia de MMO variable.

El-Osta et al. (87), en un metaanálisis que incluía un total de 13 estudios demostraron que la sensibilidad del EBUS-TBNA y el VPN eran del 49,5% y el 93% respectivamente, con una prevalencia de MMO del 12,8%. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en nuestro estudio y a los del ensayo ASTER donde pese a una mayor prevalencia (24%), el riesgo de MMO tras una endosonografía negativa (tanto EBUS como EUS) era del 9% (86).

Una de las hipótesis que podría justificar la baja sensibilidad del EBUS-TBNA en esta población es el hecho de que el tamaño y la avidéz de FDG podrían tener una relación directa con la extensión de la afectación ganglionar. Así, los ganglios de mayor tamaño y/o mayor avidéz tendrían una afectación neoplásica extensa mientras que los de menor tamaño y avidéz podrían tener una afectación focal y limitada. Nuestros resultados apoyan esta teoría ya que en 2 de los 3 pacientes en los que la afectación mediastínica no fue detectada por EBUS-TBNA existía una infiltración intracapsular focal.

Por otro lado, en todos los estudios, incluido el presente, se ha asumido que el grado de riesgo de MMO es similar en pacientes con N1 clínico, tumor central y tamaño superior a 30 mm (89, 90). Sin embargo, dicha asunción podría no ser cierta. Así, en nuestro estudio, el riesgo de MMO en pacientes con afectación N1 por pruebas de imagen fue del 25%, muy superior al de presentar una tumoración central (9%) o un tamaño tumoral superior a 30 mm (6%). Otros estudios también han demostrado que el riesgo de afectación N2/3 en pacientes con afectación radiológica N1 es elevado, pudiendo alcanzar el 37% (86, 91, 92). La baja

prevalencia de MMO en nuestro estudio y el hecho de que sólo el 24% de pacientes tenían cN1 clínico no nos permite establecer conclusiones definitivas al respecto. Son necesarios estudios prospectivos que valoren de forma independiente a cada uno de los factores identificados como de riesgo para MMO.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que la probabilidad de presentar MMO tras un EBUS-TBNA negativo, en pacientes con criterios de selección bien definidos, es muy baja. Debido a esto, la aportación de una VAM en este contexto es mínima. Así, considerando su elevado coste y la potencial morbimortalidad asociada, esta técnica quirúrgica quedaría desaconsejada en este grupo seleccionado de población con CP.

Posteriormente, en un segundo estudio determinamos la utilidad del EBUS-TBNA en el genotipado y análisis de PD-L1 en el CPCNP. En los últimos años, el pronóstico de los pacientes con CPCNP avanzado ha mejorado de manera significativa gracias tanto al diseño de terapias basadas en *drivers genéticos* específicos como al desarrollo de la inmunoterapia (93). Es por ello, que la obtención de muestras de tejido afecto por el tumor para la identificación de estas alteraciones genéticas y la identificación de la expresión de PD-L1 es imprescindible (41, 42, 94). Clásicamente, la determinación de estas alteraciones ha sido secuencial (gen a gen). La progresiva identificación de nuevos *drivers genéticos* y el desarrollo de nuevas terapias biológicas ha generado un incremento en la demanda de estudios moleculares lo que ha favorecido el desarrollo de tecnologías de secuenciación múltiple y su implementación en muestras citológicas (95).

Son varios los estudios que han explorado la utilidad del EBUS-TBNA en el CPCNP para evaluar la expresión de PD-L1 o el fenotipo genómico secuencial (96). En cambio, pocos estudios han valorado prospectivamente la eficacia de las técnicas de secuenciación múltiple combinadas con la determinación de PD-L1 mediante inmunohistoquímica en muestras de EBUS-TBNA (97). Además, se desconoce la correlación existente entre el análisis genético e IHQ de muestras del tumor primario y muestras de las AHM afectas en un mismo paciente (98).

El objetivo principal de este segundo estudio fue analizar el rendimiento de las muestras citológicas de EBUS-TBNA mediante técnicas de genotipado múltiple (NGS y nCounter) y estudio IHQ de expresión de PD-L1 en pacientes con CPCNP. Como objetivo secundario se planteó evaluar la reproducibilidad de los resultados del análisis molecular entre muestras citológicas y biopsias bronquiales de estos pacientes.

Se incluyeron de manera prospectiva pacientes con CPCNP avanzado (estadios III y IV) que fueron sometidos a un EBUS-TBNA desde agosto de 2018 a diciembre de 2019. El EBUS-TBNA se llevó a cabo de acuerdo con las guías internacionales, realizando una exploración desde las regiones que conferían un estadio más avanzado (N3) hasta las hiliares ipsilaterales (N1). Un cito-patólogo experto realizaba una evaluación rápida “*in situ*” de la muestra obtenida con tinción Diff-Quick. El número de punciones realizadas variaba en relación con la cantidad y viabilidad de las células tumorales. Las AHM se consideraron negativas cuando al menos tres muestras diferentes mostraban linfocitos normales sin células atípicas. Se consideró que la muestra era apta para estudios moleculares cuando se observaban al menos 300 células tumorales, y no viables aquellas muestras con < 20% de celularidad tumoral.

En las muestras de EBUS-TBNA y/o de la biopsia (en los casos en los que se disponía) se realizaron tres técnicas diferentes: NGS (mutaciones de ADN), nCounter (fusiones génicas de ARN y MET $\Delta$ ex14), e inmunohistoquímica (expresión de PD-L1).

Se realizó un EBUS-TBNA a un total de 72 pacientes con sospecha de CPCNP en estadio avanzado, siendo la población final con diagnóstico definitivo de CPCNP de 42 (58,3%). En 29 de estos pacientes se obtuvieron simultáneamente biopsias bronquiales de la zona tumoral, lo que permitió la comparación de las diferentes muestras (muestras citológicas de las AHM obtenidas mediante EBUS-TBNA y muestras de biopsia bronquial del tumor primario).

En la práctica totalidad de las muestras obtenidas por EBUS-TBNA (92,8%, 39/42), el material fue suficiente para proceder a la evaluación de todos los biomarcadores utilizados. Estos resultados mejoraron lo conseguido con las

biopsias bronquiales (75,8% (22/29)), siendo además la muestra de EBUS-TBNA la única fuente de material para el diagnóstico en 13 casos (30,9%).

Fielding et al. (99), valoraron el ADN extraído de frotis citológicos frente a bloques celulares de muestras obtenidas mediante EBUS-TBNA y observaron que los frotis presentaban un mejor rendimiento siendo muestras óptimas para llevar a cabo la secuenciación.

En nuestra serie, más del 90% de las muestras de EBUS-TBNA fueron útiles para realizar tanto NGS como nCounter, en línea con otros estudios publicados previamente (97, 100, 101). Así, Kunimasa et al. (102), analizaron las tasas de éxito para NGS en muestras obtenidas mediante diferentes técnicas entre las que se encontraba el EBUS-TBNA obteniendo tasas de éxito similares a las obtenidas en el presente estudio (82.6%). Estos autores sugerían además, que el EBUS-TBNA era una técnica preferible a la biopsia endobronquial en lesiones de localización central. Zhao et al. (103), en un metaanálisis que incluía 21 estudios con un total de 1175 pacientes, reafirmaron la idoneidad de las muestras de EBUS-TBNA para el análisis molecular con NGS y encontraron que el éxito se veía incrementado con un mayor número de pases, llegando a ser del 94.9% cuando el número de pases era de 6. Cabe destacar que en el presente estudio no solo se confirma la idoneidad de las muestras de EBUS-TBNA para el análisis molecular, sino que además se pudo demostrar que los resultados de la citología coincidían plenamente con los de las biopsias tisulares, lo que avala a las muestras citológicas obtenidas mediante EBUS-TBNA como una fuente óptima de material para los estudios genéticos.

Con respecto a la evaluación de PD-L1, la concordancia entre las muestras de EBUS-TBNA y las de las biopsias del tumor primario fue muy alta (88,9%) cuando se utilizó un punto de corte de PD-L1 positivo-negativo, considerándose positivo un Tumor Proportion Score (TPS)  $\geq$  1%. Al realizar la comparación en las tres categorías del TPS, a saber: muestras con expresión negativa: menos del 1% de las células tumorales positivas mediante IHQ; muestras con expresión media: entre 1 y 49% de las células tumorales positivas; y muestras con expresión alta: más del 50% de células tumorales positivas, la correlación entre las muestras descendió hasta el 74,1%, y ello fue así, independientemente del

tipo de muestra citológica evaluada (frotis o muestras de bloques celulares). La mayoría de los casos discordantes presentaron mayores niveles de expresión de PD-L1 en las biopsias bronquiales de la zona tumoral. Estos hallazgos van acordes con otros estudios donde se comparó la determinación de PD-L1 entre muestras de EBUS-TBNA y otras muestras de tejido, con tasas de concordancia dispares y que oscilaban entre el 70 y el 91% (98, 104-108). En nuestra serie, la incidencia de falsos negativos en muestras de EBUS-TBNA considerando el punto de corte  $TPS \geq 50\%$  fue del 18,5%, muy inferior a los obtenidos por Sakata, et al. (108), que utilizando el mismo umbral  $TPS \geq 50\%$  PD-L1, evidenciaban que las muestras de EBUS clasificaban erróneamente el 53% (8/15) de los tumores PD-L1-positivos. Algunos autores han propuesto que esta discordancia pudiera ser debida a la heterogeneidad de la expresión de PD-L1 en el CPCNP (109, 110), aumentando el riesgo de falsos negativos en muestras pequeñas o con baja celularidad tumoral, como las obtenidas mediante EBUS-TBNA. Las diferencias de expresión de PD-L1 según el estadio podrían explicar parcialmente las limitaciones del EBUS en este contexto (111), ya que, en nuestra serie sólo el 50% de los pacientes se encontraban en un estadio metastásico de la enfermedad.

El segundo estudio afianza el potencial de las muestras de EBUS-TBNA en el genotipado del CPCNP. La utilidad de dichas muestras en el estudio de la expresión de PD-L1 no es óptima y requiere de futuros estudios para aclarar su relevancia.

Finalmente, se quiso demostrar la utilidad del EBUS-TBNA en el estudio de AHM en pacientes con NE. Un porcentaje significativo de pacientes con NE presentan AHM patológicas ya sea en el momento del diagnóstico o a lo largo de la evolución de la enfermedad (82-84). Para el correcto diagnóstico etiológico es necesario un análisis cito-histológico de las muestras ganglionares, dado que hasta en un 30% de los casos, el aumento de tamaño y/o la avidéz para FDG de los ganglios afectos no se debe a invasión neoplásica de la enfermedad primaria, sino que son consecuencia de procesos infecciosos y/o inflamatorios que pueden estar relacionados con el tratamiento oncológico específico (112).

Aunque la utilidad del EBUS-TBNA en este escenario clínico ha sido previamente evaluada en algunos estudios, en general se tratan de cohortes con criterios de selección muy variables y un número relativamente pequeño de pacientes (113, 114). Además, se desconoce la implicación pronóstica de la invasión mediastínica en pacientes con NE.

En este tercer estudio se analizaron todos los pacientes con NE a los que se realizó un EBUS-TBNA por la presencia de AHM patológicas (diámetro menor de la AHM  $\geq 5$  mm y/o captación patológica en PET-TC) desde enero de 2010 hasta septiembre de 2020.

Las muestras obtenidas por EBUS-TBNA fueron clasificadas como “neoplásicas” cuando se identificaban células atípicas concordantes con el tumor primario extratorácico; “benignas”, cuando el análisis citológico era concordante con un proceso inflamatorio específico (ej: granulomas sarcoideos) y “no diagnósticas” cuando la muestra identificaba únicamente la presencia de linfocitos en un número  $\geq 150$  por campo.

Se evaluaron un total de 161 pacientes con NE, siendo el tumor extratorácico más frecuente el melanoma seguido del cáncer gastrointestinal. Tan sólo el 52% (84/161) de los pacientes con NE y AHM patológicas tenía invasión tumoral. El 7% (12/161) de los pacientes evaluados estaban afectados de diferentes procesos inflamatorios (sarcoidosis en 11/12 de los pacientes, siendo el otro una enfermedad no-granulomatosa). La rentabilidad diagnóstica del EBUS-TBNA en estos pacientes fue alta con una sensibilidad global del 88% y un VPN del 87%. Finalmente, se demostró que la afectación de las AHM por el tumor extratorácico era un factor de mal pronóstico de manera que los pacientes que presentaban invasión neoplásica por la enfermedad de base tenían una supervivencia global (SG) de 49 meses (IC 95%: 38-60), mientras que aquellos en los que el EBUS no confirmó la invasión neoplásica de las AHM la SG fue de 71 meses (IC 95%: 58,4-85).

Una de las fortalezas de este estudio es que evalúa la mayor cohorte publicada hasta la fecha, diferenciándose además de otras, al excluir específicamente pacientes con diagnóstico final de CP, síndrome linfoproliferativo o metástasis

mediastínicas de origen desconocido, situaciones donde el rendimiento diagnóstico del EBUS-TBNA puede diferir (19, 57, 115).

Con estos resultados, se confirma la idoneidad del EBUS-TBNA en términos de sensibilidad, especificidad y VPN en pacientes con NE para detectar metástasis mediastínicas (84, 112-114, 116, 117). Cabe destacar que en el análisis independiente según el tipo de NE el rendimiento diagnóstico se ve reducido en pacientes con neoplasia primaria de cabeza y cuello. Estos hallazgos deberían ser validados en estudios prospectivos con un mayor número de pacientes, pero, dado el significativo porcentaje de falsos negativos encontrados (global: 13%, y 33% para pacientes con cáncer de cabeza y cuello) parece lógico realizar una exploración mediastínica quirúrgica en aquellos casos con un resultado negativo del EBUS-TBNA y alta sospecha clínica de afectación mediastínica por la NE.

En nuestra cohorte, las AHM metastásicas presentaban un mayor tamaño y un aumento de captación de FDG en comparación con las AHM benignas. Estos resultados van en sintonía con lo demostrado en otros estudios, donde tanto el tamaño de los ganglios linfáticos como la captación de FDG en PET pueden proporcionar información clínica útil (118).

Por otro lado, hemos confirmado la validez de las muestras obtenidas por EBUS-TBNA para el análisis IHQ, siendo de gran utilidad en aquellos pacientes que presentan dos NE o para diferenciarlo de un CP primario.

Finalmente, uno de los hallazgos clínicamente más relevantes que observamos en nuestro estudio, radica en el valor pronóstico del EBUS-TBNA en estos pacientes, si bien dichos hallazgo debe confirmarse en estudios prospectivos con un número adecuado de pacientes y con un mismo tipo de NE.

Esta tesis pretende dilucidar el papel del EBUS-TBNA en diferentes situaciones clínicas en las que no existe un criterio uniforme de actuación o en la que los resultados previos no han sido concluyentes. Además, la aportación de los estudios que incluyen la presente tesis doctoral clarifica aspectos controvertidos de actuación médica y facilita el circuito diagnóstico y de estadificación de los pacientes con CPNCP. Para poder llevar a cabo una correcta valoración de los resultados obtenidos se han de considerar una serie de limitaciones.

En primer lugar, y pese a que las cohortes de pacientes incluidas en los diferentes trabajos que componen la presente tesis doctoral están entre las más largas publicadas sobre el tema específico que se evalúa, el número de pacientes estudiados puede ser limitado a la hora de establecer conclusiones firmes. Dicha limitación es inherente a la dificultad de reclutamiento de pacientes con características muy específicas y que no tienen una gran prevalencia global.

Por otra parte, la determinación de la utilidad del EBUS-TBNA en pacientes con NE se basa en una serie retrospectiva, lo que puede llevar a un sesgo de selección.

Al igual que en muchos otros estudios, en la mayoría de los casos en los que el EBUS-TBNA demostró un resultado “positivo”, éste se asumió como verdadero positivo y no se comprobó mediante otras técnicas invasivas, lo que puede magnificar su valor predictivo positivo. No obstante, los falsos positivos del EBUS-TBNA reportados en la literatura son excepcionales, y debido en la gran mayoría de ocasiones, a errores en el manejo de las muestras de punción. Por otro lado, las muestras citológicas que mostraban > 150 linfocitos por campo fueron consideradas como verdaderas negativas sin comprobación mediante técnicas diagnósticas alternativas. No obstante, se requería un seguimiento clínico-radiológico de al menos 6 meses para considerarla como “verdadero negativo”.

Finalmente, hay que tener en cuenta que los estudios que componen la presente tesis doctoral se han realizado en un único centro. En este sentido, la extrapolación de los resultados a otras instituciones debe tomarse con cautela, ya que los procesos asistenciales pueden diferir entre los diferentes centros.

La presente tesis doctoral aporta información clínica relevante sobre la utilidad del EBUS-TBNA en diversos escenarios clínicos, y expande los horizontes de su aplicación en la patología mediastínica.

Es importante resaltar, que se ha definido el papel del EBUS-TBNA en la estadificación mediastínica de pacientes con riesgo de sufrir MMO pese a tener un PET-TC negativo. En este escenario, se demuestra el papel marginal de la

VAM, lo que clarifica el circuito diagnóstico y evita la realización de técnicas diagnósticas invasivas.

Por otra parte, se ha confirmado la utilidad de las muestras de EBUS-TBNA en el análisis del genotipado molecular del CPCNP lo que permite definir una terapia individualizada que mejore el pronóstico de estos pacientes.

Los resultados obtenidos permiten mejorar el circuito diagnóstico de los pacientes con CPCNP haciéndolo más eficiente y coste-efectivo y representan un cambio significativo de la práctica clínica.

Finalmente, se ha confirmado tanto la necesidad de establecer un diagnóstico histológico en pacientes con NE y AHM patológicas, como la utilidad del EBUS-TBNA en este contexto. La información pronóstica asociada que supone la demostración de invasión neoplásica del tumor primario es un hallazgo novedoso que puede mejorar el manejo clínico de este grupo de pacientes.



## 7. CONCLUSIONES



## **7. CONCLUSIONES**

A partir de los estudios realizados que constituyen la base de la presente tesis doctoral, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

### **Artículo 1**

#### **“Integral Mediastinal Staging In Patients With Non-Small Cell Lung Cancer And Risk Factors For Occult N2 Disease”**

- La prevalencia de N2-3 oculto en pacientes con factores de riesgo para MMO es relativamente baja (10%).
- Aunque la sensibilidad del EBUS-TBNA en este grupo de pacientes es baja, el valor predictivo negativo es alto. Esto supone que el riesgo de detectar afectación mediastínica durante la intervención quirúrgica es mínimo.
- La VAM no aporta información clínica relevante en estos pacientes.
- Es probable que el riesgo de MMO sea mayor en pacientes con afectación N1 clínica que en aquellos con tumores centrales o mayores de 30 mm de diámetro.

### **Artículo 2**

#### **“EBUS-TBNA Cytological Samples for Comprehensive Molecular Testing in Non-Small Cell Lung Cancer”**

- En pacientes con CPCNP, el EBUS-TBNA es una técnica citológica idónea para obtener material con el que realizar estudios moleculares completos y técnicas de secuenciación múltiple.
- La determinación de la expresión de PD-L1 se puede realizar en la mayoría de las muestras de EBUS-TBNA. A pesar de esto, en los casos con mínima expresión

de PD-L1, debido a la menor concordancia con las muestras de biopsia, se debería plantear la necesidad de conseguir material adicional con técnicas alternativas.

### **Artículo 3**

#### **“EBUS-TBNA in Extrathoracic Malignancies: Diagnostic and Prognostic Implications”**

- Tan sólo la mitad de los pacientes con NE y AHM patológicas por imagen son debidas a infiltración neoplásica.
- Las AHM metastásicas en pacientes con NE presentan un mayor tamaño y captación de FDG que las benignas.
- En estos pacientes, el EBUS-TBNA es una técnica con un alto rendimiento diagnóstico y permite la diferenciación entre infiltración maligna y afectación inflamatoria benigna.
- El VPN del EBUS-TBNA puede verse disminuido en ciertos tipos de NE como cabeza y cuello.
- El diagnóstico por EBUS-TBNA de AHM metastásicas en las NE confiere valor pronóstico.

## 8. BIBLIOGRAFÍA



**8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Las cifras del cancer en España 2022 [Internet]. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. 2022 [citado 16 diciembre 2023]. Disponible en: [https://seom.org/images/LAS\\_CIFRAS\\_DEL\\_CANCER\\_EN\\_ESPANA\\_2022.pdf](https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESPANA_2022.pdf)
2. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*. 2000;321(7257):323-9.
3. Markowitz SB, Levin SM, Miller A, Morabia A. Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer. New findings from the North American insulator cohort. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1):90-6.
4. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ*. 2005;330(7485):223.
5. Barone-Adesi F, Chapman RS, Silverman DT, He X, Hu W, Vermeulen R, et al. Risk of lung cancer associated with domestic use of coal in Xuanwei, China: retrospective cohort study. *BMJ*. 2012;345:e5414.
6. Olsson AC, Gustavsson P, Kromhout H, Peters S, Vermeulen R, Brüske I, et al. Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analysis from case-control studies in Europe and Canada. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(7):941-8.
7. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*. 2013;14(9):813-22.
8. Agustí C, Marrades RM, Molins L. 86. Tumores Broncopulmonares. In: Farreras Rozman, editors. *Medicina Interna*. Volumen 1. XIX ed. p. 735-43.
9. Board W. Thoracic Tumours: WHO Classification of Tumours. World Health organ classif tumours 5th ed Lyon France: International Agency for Research on Cancer. 2021.
10. Provencio M, Carcereny E, Rodríguez-Abreu D, López-Castro R, Guirado M, Camps C, et al. Lung cancer in Spain: information from the Thoracic Tumors Registry (TTR study). *Transl Lung Cancer Res*. 2019;8(4):461-75.
11. Kocher F, Hilbe W, Seeber A, Pircher A, Schmid T, Greil R, et al. Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: a comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer*. 2015;87(2):193-200.
12. Lee SM, Park CM, Lee KH, Bahn YE, Kim JI, Goo JM. C-arm cone-beam CT-guided percutaneous transthoracic needle biopsy of lung nodules: clinical experience in 1108 patients. *Radiology*. 2014;271(1):291-300.
13. Wiener RS, Schwartz LM, Woloshin S, Welch HG. Population-based risk for complications after transthoracic needle lung biopsy of a pulmonary nodule: an analysis of discharge records. *Ann Intern Med*. 2011;155(3):137-44.
14. Takeshita J, Masago K, Kato R, Hata A, Kaji R, Fujita S, et al. CT-guided fine-needle aspiration and core needle biopsies of pulmonary lesions: a single-center experience with 750 biopsies in Japan. *AJR Am J Roentgenol*. 2015;204(1):29-34.
15. Cherry SR, Sorenson JA, Phelps ME, ScienceDirect. *Physics in nuclear medicine: Soc Nuclear Med*; 2003.
16. Townsend DW, Carney JP, Yap JT, Hall NC. PET/CT today and tomorrow. *J Nucl Med*. 2004;45 Suppl 1:4S-14S.

17. De Wever W, Ceyskens S, Mortelmans L, Stroobants S, Marchal G, Bogaert J, et al. Additional value of PET-CT in the staging of lung cancer: comparison with CT alone, PET alone and visual correlation of PET and CT. *Eur Radiol.* 2007;17(1):23-32.
18. De Wever W, Vankan Y, Stroobants S, Verschakelen J. Detection of extrapulmonary lesions with integrated PET/CT in the staging of lung cancer. *Eur Respir J.* 2007;29(5):995-1002.
19. Silvestri GA, Gonzalez AV, Jantz MA, Margolis ML, 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(5 Suppl):e211S-e50S.
20. Lee BE, von Haag D, Lown T, Lau D, Calhoun R, Follette D. Advances in positron emission tomography technology have increased the need for surgical staging in non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133(3):746-52.
21. Darling GE, Maziak DE, Inculet RI, Gulenchyn KY, Driedger AA, Ung YC, et al. Positron emission tomography-computed tomography compared with invasive mediastinal staging in non-small cell lung cancer: results of mediastinal staging in the early lung positron emission tomography trial. *J Thorac Oncol.* 2011;6(8):1367-72.
22. Smith DE, Fernandez Aramburu J, Da Lozzo A, Montagne JA, Beveraggi E, Dietrich A. Accuracy of positron emission tomography and computed tomography (PET/CT) in detecting nodal metastasis according to histology of non-small cell lung cancer. *Updates Surg.* 2019;71(4):741-6.
23. Gupta NC, Graeber GM, Bishop HA. Comparative efficacy of positron emission tomography with fluorodeoxyglucose in evaluation of small (<1 cm), intermediate (1 to 3 cm), and large (>3 cm) lymph node lesions. *Chest.* 2000;117(3):773-8.
24. Sim YT, Goh YG, Dempsey MF, Han S, Poon FW. PET-CT evaluation of solitary pulmonary nodules: correlation with maximum standardized uptake value and pathology. *Lung.* 2013;191(6):625-32.
25. Hou S, Lin X, Wang S, Shen Y, Meng Z, Jia Q, et al. Combination of positron emission tomography/computed tomography and chest thin-layer high-resolution computed tomography for evaluation of pulmonary nodules: Correlation with imaging features, maximum standardized uptake value, and pathology. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(31):e11640.
26. Caroli G, Dell'Amore A, Cassanelli N, Dolci G, Pipitone E, Asadi N, et al. Accuracy of transthoracic ultrasound for the prediction of chest wall infiltration by lung cancer and of lung infiltration by chest wall tumours. *Heart Lung Circ.* 2015;24(10):1020-6.
27. Wu LM, Xu JR, Hua J, Gu HY, Chen J, Haacke EM, et al. Can diffusion-weighted imaging be used as a reliable sequence in the detection of malignant pulmonary nodules and masses? *Magn Reson Imaging.* 2013;31(2):235-46.
28. Yabuuchi H, Hatakenaka M, Takayama K, Matsuo Y, Sunami S, Kamitani T, et al. Non-small cell lung cancer: detection of early response to chemotherapy by using contrast-enhanced dynamic and diffusion-weighted MR imaging. *Radiology.* 2011;261(2):598-604.
29. Tsuchida T, Morikawa M, Demura Y, Umeda Y, Okazawa H, Kimura H. Imaging the early response to chemotherapy in advanced lung cancer with diffusion-weighted magnetic resonance imaging compared to fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography and computed tomography. *J Magn Reson Imaging.* 2013;38(1):80-8.
30. Mondoni M, Sotgiu G, Bonifazi M, Dore S, Parazzini EM, Carlucci P, et al. Transbronchial needle aspiration in peripheral pulmonary lesions: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2016;48(1):196-204.
31. Rivera MP, Mehta AC, Wahidi MM. Establishing the diagnosis of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest.* 2013;143(5 Suppl):e142S-e65S.

32. Quint LE, Tummala S, Brisson LJ, Francis IR, Krupnick AS, Kazerooni EA, et al. Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(1):246-50.
33. Perisano C, Spinelli MS, Graci C, Scaramuzza L, Marzetti E, Barone C, et al. Soft tissue metastases in lung cancer: a review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(14):1908-14.
34. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(1):39-51.
35. Detterbeck FC. The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2018;155(1):356-9.
36. Pozo-Rodríguez F, Martín de Nicolás JL, Sánchez-Nistal MA, Maldonado A, García de Barajas S, Calero-García R, et al. Accuracy of helical computed tomography and [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography for identifying lymph node mediastinal metastases in potentially resectable non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(33):8348-56.
37. Annema JT, van Meerbeek JP, Rintoul RC, Dooms C, Deschepper E, Dekkers OM, et al. Mediastinoscopy vs endosonography for mediastinal nodal staging of lung cancer: a randomized trial. *JAMA.* 2010;304(20):2245-52.
38. 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.e1.
39. Gómez-Caro A, Boada M, Cabañas M, Sanchez M, Arguis P, Lomeña F, et al. False-negative rate after positron emission tomography/computer tomography scan for mediastinal staging in cI stage non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012;42(1):93-100; discussion
40. Hendriks LE, Kerr KM, Menis J, Mok TS, Nestle U, Passaro A, et al. Oncogene-addicted metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2023;34(4):339-57.
41. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart N, Trigo JM, Carcereny E, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol.* 2019;21(1):3-17.
42. Garrido P, Conde E, de Castro J, Gómez-Román JJ, Felip E, Pijuan L, et al. Updated guidelines for predictive biomarker testing in advanced non-small-cell lung cancer: a National Consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol.* 2020;22(7):989-1003.
43. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csőszi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2021;398(10308):1344-57.
44. Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(18):1711-23.
45. Solomon BJ, Ahn JS, Dziadziuszko R, Barlesi F, Nishio M, Lee DH, et al. LBA2 ALINA: Efficacy and safety of adjuvant alectinib versus chemotherapy in patients with early-stage ALK+ non-small cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology.* 2023;34:S1295-S6.
46. Felip E, Altorki N, Zhou C, Vallières E, Martínez-Martí A, Rittmeyer A, et al. Overall survival with adjuvant atezolizumab after chemotherapy in resected stage II-IIIa

- non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase III trial. *Ann Oncol.* 2023;34(10):907-19.
47. Tsuboi M, Herbst RS, John T, Kato T, Majem M, Grohé C, et al. Overall Survival with Osimertinib in Resected. *N Engl J Med.* 2023;389(2):137-47.
48. Chang JY, Senan S, Paul MA, Mehran RJ, Louie AV, Balter P, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus lobectomy for operable stage I non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):630-7.
49. Chang JY, Mehran RJ, Feng L, Verma V, Liao Z, Welsh JW, et al. Stereotactic ablative radiotherapy for operable stage I non-small-cell lung cancer (revised STARS): long-term results of a single-arm, prospective trial with prespecified comparison to surgery. *Lancet Oncol.* 2021;22(10):1448-57.
50. Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2022;386(21):1973-85.
51. Heymach JV, Harpole D, Mitsudomi T, Taube JM, Galffy G, Hochmair M, et al. Perioperative Durvalumab for Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2023;389(18):1672-84.
52. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares L, et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2022;40(12):1301-11.
53. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(9):495-509.
54. Hürter T, Hanrath P. Endobronchial sonography: feasibility and preliminary results. *Thorax.* 1992;47(7):565-7.
55. Yasufuku K, Chhajed PN, Sekine Y, Nakajima T, Chiyo M, Iyoda A, et al. Endobronchial ultrasound using a new convex probe: a preliminary study on surgically resected specimens. *Oncol Rep.* 2004;11(2):293-6.
56. Yasufuku K, Chiyo M, Sekine Y, Chhajed PN, Shibuya K, Iizasa T, et al. Real-time endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration of mediastinal and hilar lymph nodes. *Chest.* 2004;126(1):122-8.
57. Yasufuku K, Chiyo M, Koh E, Moriya Y, Iyoda A, Sekine Y, et al. Endobronchial ultrasound guided transbronchial needle aspiration for staging of lung cancer. *Lung Cancer.* 2005;50(3):347-54.
58. 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.
59. Herth FJ, 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(4):790-4.
60. Chandra S, Nehra M, Agarwal D, Mohan A. Diagnostic accuracy of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy in mediastinal lymphadenopathy: a systematic review and meta-analysis. *Respir Care.* 2012;57(3):384-91.
61. Navani N, Nankivell M, Lawrence DR, Lock S, Makker H, Baldwin DR, et al. Lung cancer diagnosis and staging with endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration compared with conventional approaches: an open-label, pragmatic, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med.* 2015;3(4):282-9.
62. Agarwal R, Srinivasan A, Aggarwal AN, Gupta D. Efficacy and safety of convex probe EBUS-TBNA in sarcoidosis: a systematic review and meta-analysis. *Respir Med.* 2012;106(6):883-92.

63. Geake J, Hammerschlag G, Nguyen P, Wallbridge P, Jenkin GA, Korman TM, et al. Utility of EBUS-TBNA for diagnosis of mediastinal tuberculous lymphadenitis: a multicentre Australian experience. *J Thorac Dis.* 2015;7(3):439-48.
64. Trisolini R, Lazzari Agli L, Tinelli C, De Silvestri A, Scotti V, Patelli M. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for diagnosis of sarcoidosis in clinically unselected study populations. *Respirology.* 2015;20(2):226-34.
65. Sánchez-Cabral O, Martínez-Mendoza D, Fernandez-Bussy S, Aspuru-García E, Rivera-Rosales R, Luna-Rivero C, et al. Usefulness of Endobronchial Ultrasound in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection and Mediastinal Lymphadenopathy. *Respiration.* 2017;93(6):424-9.
66. Erer OF, Erol S, Anar C, Aydođdu Z, Özkan SA. Diagnostic yield of EBUS-TBNA for lymphoma and review of the literature. *Endosc Ultrasound.* 2017;6(5):317-22.
67. Bandyopadhyay D, Panchabhai TS, Mehta AC. EBUS-TBNA for the Diagnosis of Lymphoma. Still an Achilles Heel. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(9):1263-4.
68. Botana-Rial M, Lojo-Rodríguez I, Leiro-Fernández V, Ramos-Hernández C, González-Montaos A, Pazos-Area L, et al. Is the diagnostic yield of mediastinal lymph node cryobiopsy (cryoEBUS) better for diagnosing mediastinal node involvement compared to endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA)? A systematic review. *Respir Med.* 2023;218:107389.
69. Ariza-Prota MA, Pérez-Pallarés J, Fernández-Fernández A, López-González F, Cascón JA, García-Alfonso L, et al. Transbronchial Mediastinal Cryobiopsy in the Diagnosis of Mediastinal Lymph Nodes: A Case Series - How to do it. *Arch Bronconeumol.* 2022;58(10):718-21.
70. Eapen GA, Shah AM, Lei X, Jimenez CA, Morice RC, Yarmus L, et al. Complications, consequences, and practice patterns of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration: Results of the AQUIRE registry. *Chest.* 2013;143(4):1044-53.
71. 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(5):1156-64.
72. Moon KM, Choi CM, Ji W, Lee JS, Lee SW, Jo KW, et al. Clinical Characteristics of and Risk Factors for Fever after Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration: A Retrospective Study Involving 6336 Patients. *J Clin Med.* 2020;9(1).
73. Serra Mitjà P, Gonçalves Dos Santos Carvalho F, Garcia Olivé I, Sanz Santos J, Jiménez López J, Núñez Ares A, et al. Incidence and Risk Factors for Infectious Complications of EBUS-TBNA: Prospective Multicenter Study. *Arch Bronconeumol.* 2023;59(2):84-9.
74. Meena N, Abouzgheib W, Patolia S, Rosenheck J, Boujaoude Z, Bartter T. EBUS-TBNA and EUS-FNA: Risk Assessment for Patients Receiving Clopidogrel. *J Bronchology Interv Pulmonol.* 2016;23(4):303-7.
75. Harrow EM, Oldenburg FA, Lingenfelter MS, Smith AM. Transbronchial needle aspiration in clinical practice. A five-year experience. *Chest.* 1989;96(6):1268-72.
76. Lat T, Lipatov K, Delmas T, Ghamande S, Long R. Hemomediastinum From Endobronchial Ultrasound-Guided Biopsy Leading to Diagnosis of Acquired Hemophilia. *CHEST.* 2016;150(4):1040A.
77. Gochi F, Chen F, Aoyama A, Date H. Mediastinal infectious complication after endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013;17(4):751-2.
78. Vial MR, O'Connell JO, Grosu HB, Ost DE, Eapen GA, Jimenez CA. Needle Fracture during Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193(2):213-4.

79. Stanton A, Conroy K, Miller G. Pneumomediastinum following endobronchial ultrasound and transbronchial needle aspirate (EBUS-TBNA) sampling of mediastinal lymph nodes. *BMJ Case Rep.* 2021;14(8).
80. Palomeque A, Vollmer I, Fontana A, Lucena CM, Agustí C. Focal Mediastinitis and Pulmonary Arterial Thrombosis after EBUS-TBNA. *Arch Bronconeumol (Engl Ed).* 2021;57(1):73-4.
81. De Leyn P, Doods C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R, et al. Preoperative mediastinal lymph node staging for non-small cell lung cancer: 2014 update of the 2007 ESTS guidelines. *Transl Lung Cancer Res.* 2014;3(4):225-33.
82. Kamby C, Andersen J, Ejlersen B, Birkler NE, Rytter L, Zedeler K, et al. Pattern of spread and progression in relation to the characteristics of the primary tumour in human breast cancer. *Acta Oncol.* 1991;30(3):301-8.
83. Bono AV, Lovisolo JA. Renal cell carcinoma--diagnosis and treatment: state of the art. *Eur Urol.* 1997;31 Suppl 1:47-55.
84. Yang B, Li F, Shi W, Liu H, Sun S, Zhang G, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy for the diagnosis of intrathoracic lymph node metastases from extrathoracic malignancies: a meta-analysis and systematic review. *Respirology.* 2014;19(6):834-41.
85. De Leyn P, Doods 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.
86. Doods C, Tournoy KG, Schuurbiens O, Decaluwe H, De Ryck F, Verhagen A, et al. Endosonography for mediastinal nodal staging of clinical N1 non-small cell lung cancer: a prospective multicenter study. *Chest.* 2015;147(1):209-15.
87. El-Osta H, Jani P, Mansour A, Rascoe P, Jafri S. Endobronchial Ultrasound for Nodal Staging of Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer with Radiologically Normal Mediastinum. A Meta-Analysis. *Ann Am Thorac Soc.* 2018;15(7):864-74.
88. Lardinois D, De Leyn P, Van Schil P, Porta RR, Waller D, Passlick B, et al. ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006;30(5):787-92.
89. Naur TMH, Konge L, Clementsen PF. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration for Staging of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer without Mediastinal Involvement at Positron Emission Tomography-Computed Tomography. *Respiration.* 2017;94(3):279-84.
90. Ong P, Grosu H, Eapen GA, Rodriguez M, Lazarus D, Ost D, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for systematic nodal staging of lung cancer in patients with N0 disease by computed tomography and integrated positron emission tomography-computed tomography. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(3):415-9.
91. Decaluwé H, Doods C, D'Journo XB, Call S, Sanchez D, Haager B, et al. Mediastinal staging by videomediastinoscopy in clinical N1 non-small cell lung cancer: a prospective multicentre study. *Eur Respir J.* 2017;50(6).
92. Watanabe S, Asamura H, Suzuki K, Tsuchiya R. Problems in diagnosis and surgical management of clinical N1 non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2005;79(5):1682-5.
93. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237.
94. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leighl NB, et al. Molecular Testing Guideline for the Selection of Patients With Lung Cancer for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: American Society of Clinical

---

Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol*. 2018;36(9):911-9.

95. Marin E, Teixido C, Carmona-Rocha E, Reyes R, Arcocha A, Viñolas N, et al. Usefulness of Two Independent DNA and RNA Tissue-Based Multiplex Assays for the Routine Care of Advanced NSCLC Patients. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5).
96. Jurado J, Saqi A, Maxfield R, Newmark A, Lavelle M, Bacchetta M, et al. The efficacy of EBUS-guided transbronchial needle aspiration for molecular testing in lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 2013;96(4):1196-202.
97. Turner SR, Buonocore D, Desmeules P, Rekhtman N, Dogan S, Lin O, et al. Feasibility of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration for massively parallel next-generation sequencing in thoracic cancer patients. *Lung Cancer*. 2018;119:85-90.
98. Sakakibara R, Inamura K, Tambo Y, Ninomiya H, Kitazono S, Yanagitani N, et al. EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2017;18(5):527-34.e1.
99. Fielding D, Dalley AJ, Bashirzadeh F, Singh M, Nandakumar L, McCart Reed AE, et al. Diff-Quik Cytology Smears from Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration Lymph Node Specimens as a Source of DNA for Next-Generation Sequencing Instead of Cell Blocks. *Respiration*. 2019;97(6):525-39.
100. Raad S, Hanna N, Jalal S, Bendaly E, Zhang C, Nuguru S, et al. Endobronchial Ultrasound-Guided Transbronchial Needle Aspiration Use for Subclassification and Genotyping of Lung Non-Small-Cell Carcinoma. *South Med J*. 2018;111(8):484-8.
101. Stoy SP, Segal JP, Mueller J, Furtado LV, Vokes EE, Patel JD, et al. Feasibility of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Cytology Specimens for Next Generation Sequencing in Non-small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(3):230-8.e2.
102. Kunimasa K, Matsumoto S, Nishino K, Honma K, Maeda N, Kuhara H, et al. Comparison of sampling methods for next generation sequencing for patients with lung cancer. *Cancer Med*. 2022;11(14):2744-54.
103. Zhao JJ, Chan HP, Soon YY, Huang Y, Soo RA, Kee ACL. A systematic review and meta-analysis of the adequacy of endobronchial ultrasound transbronchial needle aspiration for next-generation sequencing in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2022;166:17-26.
104. Smith A, Wang H, Zerbo A, Beaudoin S, Ofiara L, Fiset PO, et al. Programmed Death Ligand 1 Testing of Endobronchial Ultrasound-guided Transbronchial Needle Aspiration Samples Acquired For the Diagnosis and Staging of Non-Small Cell Lung Cancer. *J Bronchology Interv Pulmonol*. 2020;27(1):50-7.
105. Jug R, Giovacchini CX, Liu B, Green CL, Clarke JM, Mahmood K, et al. EBUS-FNA cytologic-histologic correlation of PD-L1 immunohistochemistry in non-small cell lung cancer. *J Am Soc Cytopathol*. 2020;9(6):485-93.
106. Yoshimura K, Inoue Y, Karayama M, Tsuchiya K, Mori K, Suzuki Y, et al. Heterogeneity analysis of PD-L1 expression and copy number status in EBUS-TBNA biopsy specimens of non-small cell lung cancer: Comparative assessment of primary and metastatic sites. *Lung Cancer*. 2019;134:202-9.
107. Wang G, Ionescu DN, Lee CH, Hiruki T, Myers R, Shaipanich T, et al. PD-L1 testing on the EBUS-FNA cytology specimens of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;136:1-5.
108. Sakata KK, Midthun DE, Mullon JJ, Kern RM, Nelson DR, Edell ES, et al. Comparison of Programmed Death Ligand-1 Immunohistochemical Staining Between

- Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration and Resected Lung Cancer Specimens. *Chest*. 2018;154(4):827-37.
109. McLaughlin J, Han G, Schalper KA, Carvajal-Hausdorf D, Pelekanou V, Rehman J, et al. Quantitative Assessment of the Heterogeneity of PD-L1 Expression in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(1):46-54.
110. Casadevall D, Clavé S, Taus Á, Hardy-Werbin M, Rocha P, Lorenzo M, et al. Heterogeneity of Tumor and Immune Cell PD-L1 Expression and Lymphocyte Counts in Surgical NSCLC Samples. *Clin Lung Cancer*. 2017;18(6):682-91.e5.
111. Scheel AH, Ansén S, Schultheis AM, Scheffler M, Fischer RN, Michels S, et al. PD-L1 expression in non-small cell lung cancer: Correlations with genetic alterations. *Oncoimmunology*. 2016;5(5):e1131379.
112. Parmaksız ET, Caglayan B, Salepci B, Comert SS, Kiral N, Fidan A, et al. The utility of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal or hilar lymph node evaluation in extrathoracic malignancy: Benign or malignant? *Ann Thorac Med*. 2012;7(4):210-4.
113. Tournoy KG, Govaerts E, Malfait T, Doods C. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy for M1 staging of extrathoracic malignancies. *Ann Oncol*. 2011;22(1):127-31.
114. Sanz-Santos J, Cirauqui B, Sanchez E, Andreo F, Serra P, Monso E, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis of intrathoracic lymph node metastases from extrathoracic malignancies. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(4):521-8.
115. Kennedy MP, Jimenez CA, Bruzzi JF, Mhatre AD, Lei X, Giles FJ, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis of lymphoma. *Thorax*. 2008;63(4):360-5.
116. Song JU, Park HY, Jeon K, Koh WJ, Suh GY, Chung MP, et al. The role of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in the diagnosis of mediastinal and hilar lymph node metastases in patients with extrapulmonary malignancy. *Intern Med*. 2011;50(21):2525-32.
117. Park J, Jang SJ, Park YS, Oh YM, Shim TS, Kim WS, et al. Endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle biopsy for diagnosis of mediastinal lymphadenopathy in patients with extrathoracic malignancy. *J Korean Med Sci*. 2011;26(2):274-8.
118. Schmid-Bindert G, Jiang H, Kähler G, Saur J, Henzler T, Wang H, et al. Predicting malignancy in mediastinal lymph nodes by endobronchial ultrasound: a new ultrasound scoring system. *Respirology*. 2012;17(8):1190-8.