



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CD47 EN CÁNCER DE PULMÓN

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:
ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

LUIS ANTONIO CABRERA MIRANDA

TUTOR DE TESIS

DR. OSCAR GERARDO ARRIETA RODRIGUEZ

ONCOLOGÍA MÉDICA

CLÍNICA DE TUMORES TORÁCICOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CO-TUTOR

DR. DANIEL MOTOLA KUBA

ONCOLOGÍA MÉDICA

FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

I.	Introducción	3
II.	Marco teórico	3
	Epidemiología	3
	Factores de riesgo	3
	Visión general de la evaluación inicial	4
	Tratamiento	5
	Pronóstico	5
	Inmunoterapia y CD47	6
III.	Planteamiento del problema y justificación	7
IV.	Resultados	11
V.	Discusión	13
VI.	Conclusión	15
VII.	Tablas y figuras	16

Introducción

El cáncer de pulmón tanto en México, como en otros países, constituye un problema de salud pública y es la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial. El CP está clasificado en dos tipos; células no pequeñas y células pequeñas (CPCP) del cual corresponde el 80 al 85% y del 10 al 15% respectivamente.

Hoy en día se cuenta con un mayor conocimiento en cuanto a la fisiopatología de la enfermedad, incluyendo el estudio extenso de factores genéticos que han permitido el desarrollo de nuevas terapias blanco.

A pesar de los tratamientos actuales, el beneficio alcanzado en términos de supervivencia global es poco satisfactorio, siendo menor para la enfermedad metastásica.

Marco teórico

Epidemiología

El cáncer de pulmón constituye la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial¹. Cuenta con una incidencia estimada de 1.8 millones en el 2012, lo que representa el 12.9% de los diagnósticos por cáncer a nivel mundial, provocando 1.6 millones de muertes. A diferencia de otros tipos de cáncer, como el cáncer de mama, colon o próstata, el cáncer de pulmón presenta una alta tasa de mortalidad, alcanzando hasta un 89% de los casos, lo que se traduce en ser la principal causa de muerte en ambos sexos². En México, no existe un registro de casos de cáncer en general, de acuerdo con GLOBOCAN 2012, esta enfermedad tuvo una incidencia y mortalidad de 7.5 y 6.7 casos por 100,000 habitantes respectivamente³. En el periodo que abarca de 1998 a 2004 se reportaron 397,400 defunciones por Cáncer en general, de las que 11.5% correspondieron a cáncer de pulmón, además se observó un aumento en la incidencia en este periodo de 16%⁴.

El cáncer de pulmón está clasificado en dos tipos; células no pequeñas y células pequeñas (CPCP) del cual corresponde el 80 al 85% y del 10 al 15% respectivamente⁵. Independientemente del subtipo histológico, en la clínica se presentan en estadios localmente avanzados o metastásicos. A pesar de los tratamientos actuales se estima una supervivencia a 5 años de 18.1%, siendo menor para la enfermedad metastásica⁶.

Factores de riesgo

La interacción entre factores genéticos y ambientales influyen en el desarrollo del cáncer de pulmón. El tabaquismo es uno de los factores de riesgo más importante, responsable del 85% de los casos, aumentando el riesgo de 10-20 veces en comparación con los no fumadores, en algunas revisiones se reportó con un factor de riesgo de 17.8 para las mujeres y 14.6 para los hombres⁷. El tabaquismo pasivo también se ha relacionado con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón en 20 a 30% en relación con población no expuesta⁸. Existen otros factores de riesgo conocidos, siendo el asbesto y el gas radón los factores ocupacionales más conocidos, sin embargo se ha observado la relación con otros componentes que incluye el berilio, el cadmio, el cromo, los

hidrocarburos policíclicos aromáticos, el níquel, el gas mostaza, la sílice, el arsénico inorgánico y el cloruro de vinilo entre otros componentes ocupacionales⁹.

Se han estudiado algunos factores demográficos que incluyen la raza, el género y el estatus socioeconómico, que pudieran estar relacionados con el desarrollo del cáncer de pulmón. Aunque la incidencia del cáncer de pulmón continúa siendo menor en las mujeres, en las últimas décadas la diferencia entre géneros ha mostrado menor diferencia. Existe mayor incidencia entre los hombres de raza negra en comparación con los hombres de raza blanca (87.5 y 68.3 muertes por 100,000 habitantes respectivamente), dicha diferencia no se observa entre las mujeres según la raza¹⁰.

El estatus socioeconómico está relacionado de manera inversa con la presencia de cáncer de pulmón, probablemente debido a la alta tasa de tabaquismo, peor dieta, exposición mayor a carcinógenos ocupacionales, ambientales y la exposición al tabaquismo pasivo.

También se ha observado un aumento en el riesgo de cáncer de pulmón en las personas con historia familiar, sin embargo dichas alteraciones genéticas no han sido caracterizadas, lo que nos lleva a la hipótesis de que existe una diferencia inherente en el metabolismo de los carcinógenos, activación y capacidad de reparación del ADN. Estudios actuales han observado la interacción gen-ambiente tanto en fumadores como no fumadores, lo que remarca la importancia de una interacción multifactorial entre factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón¹¹.

Visión General de la evaluación inicial del cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón en su mayoría se presenta con enfermedad sintomática de manera inicial. Los síntomas más comunes son anorexia, fatiga, disnea y tos.

La mayoría de los pacientes se detectan en estadios avanzados (40% en estadio IV y 30% en estadio III), siendo los sitios más frecuentes de enfermedad metastásica en sistema nervioso central (SNC), hueso, hígado y glándulas adrenales¹².

Debido a la presentación en estadios avanzados y su relación con un peor pronóstico, se han propuesto diferentes métodos para la detección temprana entre los que se ha estudiado la radiografía simple de tórax y el análisis de esputo, encontrando mayor detección de tumores, sin un impacto significativo en los estadios avanzados o en la mortalidad¹³.

De manera más reciente, se comprobó la utilidad de la tomografía de tórax de baja dosis, en el estudio con mayor número de pacientes, en donde se incluyeron 53,454 pacientes, se encontró una disminución significativa de las muertes por cáncer de pulmón con una reducción relativa de la mortalidad del 20% en pacientes de alto riesgo¹⁴.

El tratamiento del cáncer de pulmón se realiza con un manejo multimodal, que incorpora la información tanto de las características del paciente, como del tumor, incluyendo el estadio tumoral, tipo histológico, la biología del tumor y más recientemente los marcadores tumorales.

Uno de los objetivos iniciales de la evaluación, es la confirmación del diagnóstico, determinar el tipo histológico, determinar el estadio de la enfermedad y el estado funcional del paciente.

Es importante el correcto estadiaje de la enfermedad ya que ayuda a determinar el manejo y el pronóstico de los pacientes.

Para el cáncer de pulmón de células no pequeñas se utiliza el sistema de TNM actualmente en uso la séptima edición¹⁵.

En términos generales el tratamiento del cáncer de pulmón se determina de manera importante por la división que se realiza entre el cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas.

Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas

En el cáncer de pulmón de células no pequeñas en los estadios tempranos, tomados como EI y EII que representa el 30% de los pacientes con CPCNP, el manejo inicial se realiza mediante la resección quirúrgica, dejando en vigilancia los EIA y IB; para el EII está indicado el uso de quimioterapia adyuvante^{10,16,17}.

Los pacientes con estadio III CPCN comprende un grupo heterogéneo de pacientes, que por lo general requieren un manejo combinado de las diferentes modalidades que incluyen la cirugía en enfermedad no voluminosa en estadios IIIA, la quimioterapia ya sea de manera adyuvante posterior a la cirugía o en una modalidad combinada con la radioterapia^{18,19}. Inicialmente los pacientes con EIII enfermedad irresecable el tratamiento secuencial con quimioterapia y radioterapia ha demostrado beneficio en los ensayos clínicos, por lo que el tratamiento con quimioterapia y radioterapia es el tratamiento de elección para estos pacientes^{16,20}.

En pacientes con cáncer de pulmón CNP, la quimioterapia basada en platinos fue la base de tratamiento para pacientes con enfermedad metastásica durante muchos años, sin embargo recientemente con el análisis genético y molecular de rutina, se han encontrado alteraciones genéticas como la mutación de EGFR, translocación de los genes EML4-ALK, re-arreglos en ROS-1 entre otros, que han sido blanco de tratamientos dirigidos con excelente respuesta, lo que ha cambiado el estándar en el manejo y clasificación de los pacientes¹⁶.

Pronostico

Existen algunos factores pronósticos independientes del tratamiento, entre los factores que favorecen el pronóstico se encuentra el buen estado funcional, la pérdida de peso menor al 5% y el sexo femenino, no existiendo una relación para la edad o el tipo histológico, a pesar de que el tipo adenocarcinoma se relaciona con mayor frecuencia a enfermedad avanzada. Para los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas el factor más importante para determinar el pronóstico es el estadio de presentación de la enfermedad, ya que la supervivencia disminuye conforme más avanzada este la enfermedad, siendo de 59 meses para estadio IA y únicamente de 4 meses para pacientes en estadio IV según datos epidemiológicos de población general²¹.

Inmunoterapia y CD47

El cáncer de pulmón es un grupo heterogéneo de enfermedades compuestas por diferentes tipos histológicos y moleculares con relevancia clínica diferente. El advenimiento de las nuevas tecnologías para determinar el tipo molecular ha sido de utilidad para el desarrollo de nuevas terapias blanco dirigidas, esto

incluye los avances en inmunoterapia que ha abierto una nueva área de investigación en el tratamiento de los tumores malignos, incluyendo el cáncer de pulmón²².

Mucho se ha avanzado en el conocimiento del cáncer y algunos factores etiológicos que lo predisponen. Se sabe qué factores genéticos, estímulos ambientales, carcinógenos, etc, provocan alteraciones genéticas que promueven aumento en la tasa de proliferación celular y disminución de la apoptosis. Parte de las funciones del sistema inmunológico es detectar las células con alteraciones y evitar su proliferación.

En el sistema inmunológico participan varias vías de señalización que activan o inhiben células especializadas. La acción coordinada de todos sus elementos permite que se desarrolle una respuesta eficiente y específica la cual requiere de una interacción compleja y rápida entre los diferentes tipos celulares encargados de la inmunidad adaptativa e innata, contra las células tumorales²³. Entre el grupo de células encargadas se encuentran linfocitos T citotóxicos y cooperadores, células NK, linfocitos T reguladores, las células supresoras mieloides y los macrófagos tanto para su fenotipo M1 encargado de la fagocitosis, como para su fenotipo M2 encargado de amortiguar la respuesta inflamatoria y fomentar la tolerancia inmune^{24,25}.

El fenómeno más estudiado en la vigilancia inmunológica es la capacidad de los linfocitos T para distinguir los antígenos de uno mismo frente a los extraños, que son presentados por las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas²⁶, dicho fenómeno juega un papel importante en la evasión tumoral con respecto al sistema inmunológico, con esta respuesta, se pueden eliminar los tumores en etapas muy tempranas, sin embargo, existen casos en los que esta maquinaria falla al favorecer la selección de variantes celulares tumorales que escapan al reconocimiento o a los mecanismos inmunes efectores.

En la evasión inmunológica de las células tumorales, existe una teoría llamada inmuno-edición del cáncer, desarrollada en tres fases. La fase de eliminación en donde existe una destrucción tumoral importante, mediada por el sistema inmune, la fase de equilibrio en donde existe un balance entre la destrucción y el crecimiento tumoral, y una fase de escape inmunológico, en donde las clonas tumorales han adquirido la capacidad de evadir al sistema inmune²⁷.

La teoría de la vigilancia inmunológica y la teoría de la inmuno-edición señalan el importante papel que juegan los macrófagos en contra y a favor de las células tumorales. Recientemente se ha mostrado que las células normales previenen su degradación exponiendo receptores de superficie que evitan la fagocitosis. Un mecanismo de señalización de protección a la fagocitosis involucra la interacción entre el receptor de superficie CD47 y la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α).

CD47 también conocida como proteína asociada a integrinas (IAP) es una proteína ubicua de membrana celular que pertenece a la super familia de las inmunoglobulinas (Ig). El CD47 es un miembro poco común de la super familia con un dominio único tipo IgV y un extremo N-terminal altamente hidrofóbico con cinco segmentos transmembranales que se generan por splicing alternativo en el extremo C terminal que varía de 3 a 36 aminoácidos²⁸. El dominio Ig de CD47 interacciona con varias proteínas, incluyendo las integrinas, trombospondina (TSP) y la proteína reguladora de señales alfa (SIRP α)²⁹. Por interacción con estas biomoléculas, CD47 está implicado en una amplia gama de procesos

biológicos³⁰ como: CD47 asociado con integrinas, mediando la motilidad, la adhesión y la migración de leucocitos^{31,32}. A través de la ligación con trombospondina, CD47 está implicado en la activación de plaquetas e inhibe la señalización del óxido nítrico (NO) en células vasculares³³. Adicionalmente, CD47 juega un papel importante en la homeostasis, la maduración de las células dendríticas y regula la interacción de la apoptosis con SIRPα³⁴.

CD47 se expresa de manera amplia en diferentes tejidos del organismo de manera constitutiva, sugiriendo un rol de manera importante en la homeostasis del organismo al mediar la fagocitosis. La sobre expresión de CD47 fue reportado por primera vez en cáncer de ovario y estudios subsecuentes han reportado una alta expresión de CD47 en varios tipos de tumores comparados con tejido normal, incluido células de leucemia linfoblástica aguda, efusión primaria células de linfoma, linfoma de células no-Hodgkin, células de mieloma, células iniciales de tumor de vejiga, células madre de leucemia mieloide aguda, células de carcinoma de células escamosas cabeza y cuello, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma pancreático ductal, las células de tumor de próstata, el colon, glioblastoma³⁵⁻⁴⁰.

La sobre-expresión de CD47 en diferentes tipos de tumores y su función como una señal de evasión de la fagocitosis, considera a CD47 como un marcador biológico de cáncer y su alta expresión es considerado un factor pronóstico adverso. Estudios clínicos han demostrado que un aumento de la expresión de CD47 disminuye las tasas de supervivencia global en comparación con la de los pacientes con bajo nivel de expresión de CD47^{41,42}.

El nivel de expresión de CD47 se correlaciona inversamente con el pronóstico del paciente, de tal manera, que a un nivel alto de expresión de CD47, el pronóstico clínico es desfavorable, ya que activa una señal de evasión de la fagocitosis.

Planteamiento del problema

El cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cancer nivel mundial, y en nuestro país, la quinta causa de mortalidad e incidencia por tumores malignos, lo que representa un problema de salud global.

Actualmente, a pesar de los avances en el tratamiento de este padecimiento así como en el entendimiento de su desarrollo, y la etapificación de alteraciones genéticas para el desarrollo de tratamientos moleculares dirigidos, el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado sigue siendo pobre.

Existen nuevas terapias moleculares dirigidas y terapias inmunológicas que han impactado tanto en la supervivencia, como en la calidad de vida de los pacientes con cáncer.

El manejo clínico actual del cancer de pulmón incluye la detección de marcadores moleculares específicos como mutación en el receptor del factor de crecimiento epidérmico, fusión de EML4-ALK y sobre-expresión de PDL1 que han demostrado tener valor terapéutico pronóstico y predictivo.

La sobreexpresión de CD47 en otros tumores ha demostrado impactar de manera negativa al pronóstico de los pacientes en otras neoplasias y se encuentra en investigación el uso de anticuerpos dirigidos para su uso como tratamiento.

Es importante conocer la incidencia de sobre expresión de CD47, determinar su asociación con características específicas de la enfermedad, el paciente y su asociación con un peor pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón.

Justificación

Actualmente la inmunovigilancia juega un papel importante en el desarrollo tumoral. Algunos marcadores, han sido asociados como factores pronósticos de respuesta a tratamiento o con peor pronóstico de la enfermedad. Por lo que la alta expresión de receptores de CD47 pudiera ser un biomarcador para la selección de pacientes que se beneficien de tratamientos específicos.

Objetivo general

- Caracterizar la expresión de CD47 en cáncer de pulmón como un biomarcador pronóstico.

Objetivos específicos

1. Analizar la expresión de CD47 en biopsias de cáncer de pulmón, y correlacionarlo con factores como exposición a tabaco, humo de leña, asbesto y subtipo histológico
2. Se pretende determinar si la sobre expresión de CD47 está correlacionado con el estadio y con la recurrencia de la enfermedad.
3. Se analizará la supervivencia libre de progresión y supervivencia global en relación a los niveles de expresión de CD47

Hipótesis

El incremento en la expresión de CD47 determinada por inmunohistoquímica, está relacionada con peor pronóstico en cáncer de pulmón.

Material y método

Se realizó un estudio retrospectivo en el cual se incluyeron muestras de tejido de pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas manejados en el Centro Oncológico Integral “Diana Laura Riojas de Colosio” del Hospital Médica Sur y el departamento de tumores torácicos del Instituto Nacional de Cancerología.

Selección de pacientes

Se incluyeron pacientes que contarán con un diagnóstico confirmado por histología de Cáncer de pulmón de células no pequeñas con enfermedad avanzada (estadio IIIB o IV). Las muestras obtenidas por biopsia o resección quirúrgica fueron procesadas para analizar la expresión del receptor CD47 por inmunohistoquímica. Se incluyeron pacientes mayores de 18 años de edad con

un estado funcional según la escala de ECOG de 0-3 y sin tratamiento previo con radioterapia, quimioterapia o inmunoterapia, que fueran candidatos a recibir tratamiento oncológico al momento del diagnóstico. Las características clinicopatológicas se recabaron del expediente electrónico.

Se excluyeron pacientes con expedientes incompletos, o que no tuvieran muestra de tejido suficiente para poder realizar las tinciones de inmunohistoquímica.

Se determinó la presencia de las siguientes variables:

- Género
 - Mujer
 - Hombre
- Edad
 - >60 o <60 años
- Exposición a humo de leña
- Antecedente de tabaquismo
- Antecedente de exposición a asbesto
- Estadio de la enfermedad de acuerdo a sistema TNM
 - Estadio IIIB o IV
- Estado funcional (ECOG)
 - 0,1
 - 2,3
- Subtipo histológico
 - Adenocarcinoma
 - Carcinoma
- Subtipo de adenocarcinoma
 - No especificó, lepidico, acinar, papilar, sólido
- Diferenciación de acuerdo a observación cualitativa
 - Poco diferenciado
 - Moderadamente diferenciado
 - Bien diferenciado
- Sitio de metástasis
 - Metástasis a SNC
 - Metástasis óseas
 - Metástasis a hígado
 - Metástasis pulmonares o a pleura
- Mutación de EGFR
- Re-arreglo ALK
- Mutación de KRAS
- Niveles séricos de antígeno carcinoembrionario (ACE) al diagnóstico
- Tipo de respuesta a la primera línea de tratamiento

- Respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable o progresión de la enfermedad

Técnica de inmunohistoquímica

Las biopsias y piezas quirúrgicas fueron fijadas en formol e incluidas en parafina utilizando los procedimientos estándar. Se hicieron cortes a 5mc los cuales fueron teñidos con CD47 usando los procedimientos estandarizados de inmunohistoquímica. Antes de utilizar el anticuerpo de inmunohistoquímica, la actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada mediante peroxidasa de hidrógeno durante 10 minutos y se hizo recuperación del ADN con calor y citratos (Bio SB, Inc. CA, USA). Se realizaron lavados con TBS al 1X (TBS Automation Wash Buffer, 40X) y los cortes fueron incubados con el anticuerpo anti CD47 en una dilución buffer a temperatura ambiente durante 45 minutos (1:50, catalog sc-12730; Santa Cruz biotechnology, Dallas Texas;). La reacción de inmunohistoquímica fue visualizada mediante el uso del kit MACH 4 universal HRP-polymer y revelada con DAB por 3 minutos. Los cortes fueron contrastados con hematoxilina e hidróxido de amonio. El isotipo de IgG fue utilizado como control .

La intensidad obtenida de la membrana celular se dividió en una escala de 0-3 que a su vez se dividió en cuatro categorías: 0 sin tinción, 1+ tinción débil, 2+ tinción moderada, y 3+ tinción fuerte. Para obtener definiciones de puntajes más fiables, una tinción fuerte (3+) era claramente visible utilizando una lente objetivo x4, para la tinción moderada de x10 y para la tinción débil de x20.

Se obtuvo un sistema de puntuación para la inmunoreactividad multiplicando la intensidad de la tinción por el porcentaje de células inmunorreactivas con lo que se obtuvieron puntuaciones entre 0 y 300 para cada caso individual. **(Figura 1)**.

Punto de cohorte por X-tile

Para el análisis de un punto de cohorte para la determinación de CD47 como marcador pronóstico y predictivo, se utilizó el programa X-tile que se especializa en análisis de supervivencia, y para la optimización del punto de cohorte utiliza valor de p mínimo. Utilizando el método estándar de log-rank, con los valores de p obtenidos con la tabla de CD47 (Camp, Dolled-Fihart et al., 2004).

Expresión de ARN

Se analizaron 16 biopsias de tejido en fresco para medición de ARN. La extracción del ARN se realizó siguiendo el protocolo del kit DNA/RNA FFPE. Preparando el ARN con 10 unidades de DNase I (Quiagen) por 15 minutos a 37°C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la transcripción reversa.

Se ejecutó la reacción de PCR en tiempo real para CD47 utilizando TaqMan® Gene Expression Master Mix gene expression y un control endógeno GAPDH (CAT).

Análisis estadístico

Para fines descriptivos, las variables continuas se resumieron como medias aritméticas, medianas y desviaciones estándar (DE), y las variables categóricas consistieron en porcentajes con sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC del 95%). Las comparaciones inferenciales se realizaron mediante la prueba t de Student o la prueba U de Mann-Whitney según la distribución de datos (normal y no normal) determinado por la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Chi-cuadrada o prueba exacta de Fisher se utilizó para evaluar las variables categóricas. La probabilidad acumulativa de supervivencia global se calculó mediante el método de Kaplan-Meier, y la diferencia se evaluó mediante la prueba Log-rank. Se realizaron análisis univariados y multivariados del modelo de riesgo proporcional de regresión de Cox para evaluar los parámetros pronósticos de supervivencia. También se realizó un análisis de regresión logística para evaluar los parámetros pronósticos de recurrencia. Se consideró que el valor de P menor que 0.05 era estadísticamente significativo. Se utilizó el paquete de software SPSS versión 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EE.UU.) para analizar los datos.

Resultados

Características generales de la población

Se lograron identificar 173 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión para el estudio. La mediana de edad fue de 60.8 ± 12.3 años, el 62% eran mujeres y el 38% hombres. El 75% de los pacientes contaban con un buen estado funcional al diagnóstico definido como un ECOG de 0 y 1. El 44% de los pacientes tenían antecedente de tabaquismo, el 24% tenían antecedente de exposición a humo de leña y únicamente el 6% antecedente de exposición a asbesto.

El patrón histológico predominante fue el adenocarcinoma (91%), con una distribución del subtipo histológico mayor para el tipo papilar (26%), seguido del subtipo Acinar (24%) y sólido (21%).

Hasta un 49% presentaban un grado histológico bajo o intermedio y únicamente 29% grado alto.

La mayoría de pacientes (91%) presentaban enfermedad metastásica al diagnóstico (estadio IV). Los sitios más comunes de metástasis fueron pulmón y pleura (28%), sistema nervioso central (24%), óseas (19%) e hígado (16%).

En el análisis genético, 48 pacientes presentaban mutación de EGFR, 9 en ALK y 7 con mutación de KRAS.

Al momento de la presentación el 61% tenían niveles de antígeno carcinoembrionario >5 ng/ml.

Las características de los pacientes se encuentran registradas en la **Tabla – 1**.

Expresión de CD47 y su asociación con características clínicas patológicas

De los 173 pacientes, 120 (65%) tuvieron una expresión positiva para CD47.

En base a un punto de cohorte se dividieron los pacientes en los que expresaban una puntuación alta de CD47 determinada como en >150 (n=90 pacientes) y <150 (83 pacientes). En el análisis de las características de los pacientes se

relacionó una puntuación > de 150 con la exposición de humo de leña en 71% (n=29) vs 29% (n=12); p=0.007. También se asoció la sobreexpresión de CD47 con la mutación de EGFR en 73% (n=35, p=0.002). **Tabla – 2.**

Expresión de CD47 en ARN

Una sobreexpresión de CD47 en ARN se observó en todas las muestras evaluadas por PCR en tiempo real de las biopsias en fresco analizadas, sin embargo únicamente en 4 pacientes se combinaron ambas mediciones (PCR + Inmunohistoquímica). (**Figura 2**). De estos 4 pacientes se demostró una relación positiva entre la expresión alta por inmunohistoquímica y expresión por ARN (1.52±123.1 vs 1.2±0.18 p=0.066).

Supervivencia global

La mediana de la SG fue de 18.2 meses (14.7 meses). Entre los factores que influyeron en la SG se encuentra la exposición a humo de leña reportando una mediana de 25.5 meses contra 12.1 meses entre los expuestos contra los no expuestos (p=<0.001) (**Figura 3**), el estado funcional medido por ECOG 0-1 con una mediana de 26.6 meses contra 15.4 meses en los pacientes con estado funcional ECOG 2-3 (p=0.006)(**Figura 4**), el tipo de histología, siendo la mediana para la histología de adenocarcinoma de 22.7 meses contra 7.26 meses en otras histología (p=0.009)(**Figura 5**) y la mutación de EGFR, quienes reportaban una mediana de supervivencia de 51.6 meses contra 19.5 meses en los pacientes sin la mutación (p=<0.001)(**Figura 6**).

La mediana de supervivencia global para pacientes con sobreexpresión de CD47>150 fue de 26.2 meses contra 19.5 meses para los pacientes con expresión <150 (p=0.021) (**Figura 7**).

Análisis univariado y multivariado

En el análisis univariado se encontró relajación entre la supervivencia libre de progresión y los siguientes factores: estadio IV (p=0.007), el grado histológico (p=<0.001), la presencia de metástasis hepáticas (p=<0.001), mutación de EGFR (p=0.003) y el puntaje de CD47>150 (p=0.030). En el análisis multivariado se mostró como factor independiente pronóstico el grado histológico (p=0.009) y las metástasis hepáticas (p=0.009). **Tabla – 3.**

En el análisis univariado para supervivencia global, se encontró una relación entre la misma y los siguientes factores: la exposición a humo de leña (p=<0.001), estado funcional por escala de ECOG puntuación 0-1 (p=0.006), histología tipo adenocarcinoma (p=0.009), mutación de EGFR (p=0.001) y un puntaje de expresión de CD47>150 (p=0.021). En el análisis multivariado para supervivencia global se observó que los mismos factores mencionados previamente se mantuvieron estadísticamente significativos como factores pronósticos de supervivencia. **Tabla – 4.**

Discusión

El pronóstico del cáncer de pulmón no está relacionado únicamente al estadio de la enfermedad, aún en los pacientes con enfermedad metastásica, existen otros factores que lo modifican. Algunos de estos factores se mostraron en este estudio, entre los que se encontró que el estado funcional ECOG 2-3, pacientes con historia de exposición a humo de leña, pacientes con histología de tipo no adenocarcinoma y la ausencia de la mutación EGFR se relacionaron con menor supervivencia global⁴³.

Actualmente se han incluido factores moleculares para determinar el pronóstico en los tumores malignos, dichos marcadores también han servido para el estudio de vías moleculares específicas para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas. El uso de las terapias dirigidas han puesto la atención en el desarrollo de medicamentos que actúen promoviendo una respuesta del sistema inmunológico contra las células tumorales, dichas terapias han mostrado resultados alentadores, las vías más estudiadas y con mejores resultados, son sobre los checkpoint inmunológico PD1/PDL1, que producen tasas de respuesta importantes durante periodos de tiempo prolongados en múltiples tumores malignos en etapas avanzadas⁴⁴.

CD47 es otro Checkpoint inmunológico presente de manera ubicua en células sanas del organismo, sin embargo se ha encontrado sobreexpresada en múltiples neoplasias malignas, donde de forma patológica ayuda en el escape de las células tumorales al evadir los mecanismos de vigilancia inmunológico, en concreto permite a las células malignas la evasión de la inmunidad innata. En este estudio se demostró la sobreexpresión de CD47 en Cáncer de pulmón de células no pequeñas, tanto por inmunohistoquímica como por medición de ARN por PCR. Esta sobreexpresión ha sido demostrada como un factor de mal pronóstico en leucemia, linfoma no Hodgkin, Cáncer de vejiga y cáncer de mama^{45,46}.

En otros estudios, por ejemplo en cáncer de mama, además de mal pronóstico confiere riesgo de presentar mayor número de sitios metastásico⁴⁷, en el linfoma no Hodgkin la sobreexpresión constitutiva de CD47 es esencial para provocar una respuesta de inmunotolerancia en el organismo y como consecuencia su diseminación⁴⁸, y en cáncer de colon esta sobreexpresión este mecanismo de escape inmunológico está relacionado con la enfermedad metastásica⁴⁹.

En un estudio previo demostró la sobreexpresión de CD47 en cáncer de pulmón de células no pequeñas utilizando líneas celulares y tejido tumoral en modelos animales, dicha sobreexpresión se relacionó con mayor tamaño tumoral, mayor estadio, la presencia de metástasis ganglionares y metástasis a distancia, encontrando que CD47 es un control importante para la migración e invasión⁵⁰. Este es el primer estudio de cohorte en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas que demostró la sobreexpresión de CD47 buscando su utilidad como marcador pronóstico

En el cáncer de pulmón, en específico de tipo adenocarcinoma ya existen la búsqueda de factores moleculares o mutaciones como la encontrada en el receptor de crecimiento epidérmico que han sido determinadas como factores pronósticos y predictivos⁵¹. Existe el FLEX score, que es un método estándar para la medición de sobreexpresión de EGFR por inmunohistoquímica, con un punto de corte determinado, para su uso como factor predictivo⁵².

Con respecto a la expresión de CD47, el 65% de los pacientes presentó dicha expresión, sin embargo hasta este momento no se cuenta con un punto de corte estandarizado, en nuestro estudio se determinó el valor de 150 como el punto de corte con valor pronóstico por medio del programa X-tile .

Con este punto de corte se demostró una diferencia significativa en la supervivencia global, siendo para los pacientes con una medición mayor de 150 de 26.2 meses contra 19.5 meses para los pacientes que mostraban una expresión por debajo de 150.

Con estos resultados se demostró que una expresión elevada de CD47 estaba relacionada con peor desenlace y que era un factor pronóstico independiente en los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas.

En otros estudios los niveles de expresión de CD47 se incrementan en relación con la progresión tumoral, por ejemplo en cáncer renal y cáncer de mama. En cáncer gástrico los niveles de expresión se relacionan con la quimioresistencia y pronóstico adverso⁵³.

También se encontró que la relación con la expresión de CD47 por arriba de 150 y la historia de exposición a humo de leña estaban relacionados con mal pronóstico. La exposición a humo de leña se ha identificado como un carcinógeno importante y como factor de riesgo de cáncer de pulmón. En México hasta el 30% de los pacientes con cáncer de pulmón se ha relacionado con la exposición a humo de leña, y en nuestra población estudiada el 24% tenían antecedente a la exposición.

Dicha exposición se ha relacionado con la disfunción de macrófagos y un incremento de la actividad de las metaloproteinasas, como MMP-2y MMP-9, que podrían explicar el daño al tejido pulmonar causado por la exposición en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y su rol en la fisiopatología en el cáncer de pulmón⁵⁴.

Existen reportes de que en los pacientes con historia de exposición a humo de leña existen alteraciones en algunos genes de las vías de señalización de PI3K/AKT y MEK/ERK⁵⁵.

Sin embargo se ha reportado que en los pacientes con este antecedente tiene ciertas características que les confieren un mejor pronóstico, como un mayor porcentaje de mutaciones en EGFR, lo que los hace candidatos para terapia dirigida.

Por lo tanto, los pacientes con antecedente de exposición a humo de leña presentan características moleculares específicas lo que les confiere una diferencia con los pacientes si este antecedente.

Una explicación del peor pronóstico que se encontró al relacionar el antecedente de la exposición del humo de leña con la sobreexpresión de CD47, es que en ambos factores existen alteraciones tanto en la función de macrófagos como una alteración en vías de señalización como PI3K/AKT, lo que podría traer un efecto sinérgico que se reflejará en un peor pronóstico para estos pacientes.

La co-expresión de CD47 y EGFR se asoció con peor supervivencia global. En otros estudios se ha demostrado que la sobreexpresión de CD47 se puede presentar con alteración en otros genes de manera concurrente. Un ejemplo se presenta en cáncer de mama, en donde al estar sobreexpresado CD47, junto con alteraciones de MET se traduce en un factor determinante de mayor invasión, motilidad y escape de la respuesta inmune mediada por macrófagos⁴². En los últimos años se ha publicado múltiples estudios en donde el eje CD47-SIRPα ha mostrado ser in checkpoint prometedor de la respuesta inmune innata.

Hoy en día, existen ensayos con líneas celulares y modelos animales, bloqueando CD47 que han mostrado resultados prometedores⁵⁶.

Conclusión

En este estudio de cohorte con pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzada se mostró que un porcentaje importante de pacientes sobreexpresan CD47, lo que da la pauta para seguir la investigación de fármacos que influyan en dicha vía de respuesta inmune. Sin embargo continúa siendo un área de investigación importante, pero nos deja la importancia de su expresión como factor de mal pronóstico.

Tabla 1. Características basales de la población (N=173)

Variable	% (n/N)
Género	
Mujer	62 (107/173)
Hombre	38 (66/113)
Edad	
Mediana (±SD)	60.8 (±12.3)
< 60 años	42 (73/173)
≥ 60 años	58 (100/173)
Exposición a humo de leña	
Ausente	76 (132/173)
Presente	24 (41/173)
Tabaquismo	
No fumadores	56 (96/173)
Fumadores	44 (77/173)
Exposición a asbesto	
Ausente	94 (163/173)
Presente	6 (10/173)
Estadio	
IIIB	8 (15/1173)
IV	91 (157/173)
ND	1 (1/173)
ECOG PS	
0-1	75 (129/173)
2-3	24 (42/173)
ND	1 (2/173)
Subtipo histológico	91 (158/173)
Adenocarcinoma	7 (12/113)
Carcinoma	2 (3)
ND	
Patrón de adenocarcinoma	
Lepídico	7(12/173)
Papilar	26 (45/173)
Acinar	24 (42/173)
Sólido	21 (36/173)
ND	22 (38/173)
Grado histológico	
Bajo	7 (12/173)
Intermedio	42 (72/173)
Alto	29 (51/173)
ND	22 (38/173)
Metástasis SNC	
Presente	24 (41/173)
Ausente	76 (132/173)
Metástasis óseas	
Presentes	19 (33/113)
Ausentes	81 (140/173)
Metástasis pulmonares y pleural	
Presente	28 (48/173)
Ausente	72 (125/173)
Metástasis hepáticas	
Presente	16 (28/173)
Ausente	84 (145/173)
Mutación EGFR	
EGFR (+)	28 (48/173)
EGFR wt	70 (122/113)
ND	2 (3/173)
ALK rearrangement	
Positivo	5 (9/173)
Negativo	95 (164/173)
Mutación KRAS	
Positivo	4 (7/173)
Negativo	96 (166/173)
ACE inicial	
≤ 5 ng/ml	25 (43/173)
> 5 ng/ml	61 (105/173)
ND	14 (25/173)

Respuesta	
RC	2 (3/173)
RP	20 (35/173)
EE	31 (53/173)
PE	34 (59/173)
ND	13 (23/173)
CD47	
Positivo	65 (112/173)
Negativo	35 (61/173)
CD47 150	
Positivo	52 (90/173)
Negativo	48 (83/173)
<p>ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; SNC: Sistema Nervioso Central, wt-EGFR: wild type EGFR, ACE: antígeno carcinoembrionario, RC: respuesta completa, RP: Respuesta parcial, EE: enfermedad estable, PE: progresión de la enfermedad</p>	

Tabla 2. Características basales en relación con H-Score de CD47 en adenocarcinoma			
Características	CD47 (-) % (n/N)	CD47 (+) % (n/N)	valor p
Genero			0.637
Hombre	45 (29/65)	55 (36/65)	
Mujer	50 (53/107)	50 (54/107)	
Edad			1.000
Mediana (±SD)	60 (±12)	61 (±13)	0.539
< 60 años	51 (37/73)	49 (36/73)	
≥ 60 años	45 (45/99)	55 (54/99)	
Exposición a humo de leña			0.007
Ausente	53 (70/131)	47 (61/131)	
Presente	29 (12/41)	71 (29/41)	
Tabaquismo			0.879
No fumador	48 (46/95)	52 (49/95)	
Fumador	47 (36/77)	53 (41/77)	
Exposición a asbesto			0.103
Ausente	49 (80/162)	51 (82/162)	
Presente	20 (2/10)	80 (8/10)	
Estadio			1.000
IIIB	47 (7/15)	53 (8/15)	
IV	48 (75/157)	52 (82/157)	
ECOG PS			0.725
0-1	46 (60/129)	54 (69/129)	
2-4	50 (21/42)	50 (21/42)	
Subtipo histológico Adenocarcinoma			1.000
Carcinoma	47 (74/157)	53 (83/157)	
	50 (6/12)	50 (6/12)	
Patrón de adenocarcinoma			0.780
Lepídico	33 (4/12)	67 (8/12)	
Acinar	50 (21/42)	50 (21/42)	
Papilar	47 (21/45)	53 (24/45)	
Sólido	49 (17/35)	51 (18/35)	
Grado histológico			0.355
Bajo	33 (4/12)	67 (8/12)	
Intermedio	48 (42/87)	52 (45/87)	
Alto	49 (17/35)	51 (18/35)	
Metástasis SNC			0.720
Ausente	46 (61/131)	54 (70/131)	
Presente	51 (21/41)	49 (20/41)	
Metástasis óseas			0.440
Ausente	46 (64/139)	54 (75/139)	
Presente	55 (18/33)	45 (15/33)	
Metástasis pulmonares y pleura			0.311
Ausente	45 (56/124)	55 (68/124)	
Presente	54 (26/48)	46 (22/48)	
Metástasis hepáticas			0.404
Ausente	46 (66/144)	54 (78/144)	
Presente	56 (15/27)	44 (12/27)	
EGFR mutación			0.002
Negativa	54 (66/121)	46 (55/121)	
Positiva	27 (13/48)	73 (35/48)	
ALK rearrangement			0.738
Negativa	47 (77/163)	53 (86/163)	
Positiva	56 (5/9)	44 (4/9)	
KRAS mutación			0.120
Negativa	49 (81/165)	51 (84/165)	
Positiva	14 (1/7)	86 (6/7)	
ACE al diagnóstico			0.718
< 5 ng/ml	49 (21/43)	51 (22/43)	
≥ 5 ng/ml	45 (47/105)	55 (58/105)	
Respuesta			0.853
RC	67 (2/3)	33 (1/3)	
RP	49 (17/35)	51 (18/35)	
EE	51 (27/53)	49 (26/53)	
PE	56 (33/59)	44 (26/59)	

Tabla 3. Análisis univariado y multivariado de supervivencia libre de progresión

Variable	Univariado			Multivariado		
	Mediana	95% IC	P	HR	95% IC	P
Genero						
Mujer	10.1	8.2-12.5				
Hombre	10.3	8.4-11.9	0.363			
Edad						
>60	10.9	9.9-11.9				
<60	8.8	6.7-10.8	0.359			
Exposición a humo de leña						
Ausente	10.1	8.3-11.7				
Presente	12.2	6.6-17.9	0.204			
Tabaquismo						
No fumador	9.6	7.2-12.1				
Fumador	10.1	8.9-11.3	0.632			
Exposición a asbesto						
Ausente	10.0	8.5-11.6				
Presente	10.8	9.8-11.7	0.948			
Estadio						
IIIB	NR	NR				
IV	9.8	8.1-11.5	0.007	1.5	0.9-2.6	0.083
ECOG						
0-1	10.6	9.6-11.4				
2-3	7.1	6.2-7.9	0.303			
Subtipo histológico Adenocarcinoma						
Carcinoma	10.1	8.4-11.9				
	10.1	9.7-10.4	0.564			
Grado histológico						
Bajo	9.2	2.7-15.8				
Intermedio	13.1	7.6-18.5				
Alto	7.5	6.1-9.0	<0.001	1.6	1.1-2.4	0.009
Metástasis SNC						
Ausente	10.1	8.1-12.0				
Presente	10.5	9.8-11.1	0.577			
Metástasis óseas						
Ausente	10.1	8.6-11.5				
Presente	10.6	3.5-17.6	0.707			
Metástasis pulmón/pleura						
Ausente	10.2	8.9-11.3				
Presente	9.8	7.0-12.6	0.322			
Metástasis hepáticas						
Ausente	10.6	9.8-11.4				
Presente	7.3	5.5-9.1	<0.001	2.0	1.2-3.6	0.009
EGFR						
wild	8.7	6.9-10.4				
Mutado	12.6	8.9-16.4	0.003	0.6	0.3-1.1	0.102
ALK rearrangement						
wild	10.1	8.8-11.6				
Mutado	10.1	6.5-13.6	0.822			
KRAS						
wild	10.1	8.8-11.5				
Mutado	NR	NR	0.566			
ACE al diagnóstico						
<5ng/ml	10.7	4.7-16.8				
>5ng/ml	10.8	10.1-11.4	0.206			
CD47						
<150	9.3	7.2-11.3				
>150	10.8	8.3-13.2	0.030	0.7	0.1-1.2	0.231

ECOG PS: Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status; SNC: Sistema Nervioso Central, wt-EGFR: wild type EGFR, ACE: antígeno carcinoembrionario, RC: respuesta completa, RP: Respuesta parcial, EE: enfermedad estable, PE: progresión de la enfermedad.

Tabla 4. Análisis univariado y multivariado de supervivencia global

Variable	Univariado			Multivariado		
	Mediana	95% IC	P	HR	95% IC	P
Género						
Mujer	21.4	18.7-24.1	0.642			
Hombre	23.9	17.3-30.4				
Edad						
>60	20.9	18.1-23.7	0.123			
<60	28.9	18.4-39.4				
Exposición humo de leña						
Ausente	25.5	19.3-31.8	<0.001	2.3	1.3-3.9	0.002
Presente	12.1	8.8-15.4				
Tabaquismo						
No fumador	21.4	18.8-24.0	0.729			
Fumador	26.2	18.4-34.1				
Exposición a asbesto						
Ausente	21.9	18.3-25.4	0.994			
Presente	21.5	7.8-35.2				
Estadio						
IIIB	32.0	NR	0.327			
IV	21.4	18.5-24.4				
ECOG						
0-1	26.6	19.9-33.3	0.006	2.1	1.3-3.4	0.001
2-3	15.4	8.5-22.2				
Subtipo histológico Adenocarcinoma						
Carcinoma	22.7	18.0-27.3	0.009	2.2	1.1-4.4	0.023
	7.2	0.0-23.2				
Grado histológico						
Bajo	29.9	4.0-55.8	0.461			
Intermedio	21.9	11.3-32.5				
Alto	2.0	18.1-26.1				
Metástasis SNC						
Ausente	21.9	17.1-26.6	0.629			
Presente	20.7	13.7-27.7				
Metástasis óseas						
Ausente	21.4	18.1-24.7	0.906			
Presente	22.7	12.4-32.9				
Metástasis pulmón/pleura						
Ausente	22.1	18.4-25.7	0.383			
Presente	19.7	13.1-26.2				
Metástasis hepáticas						
Ausente	21.9	16.2-27.6	0.621			
Presente	21.4	16.8-26				
EGFR						
wild	19.5	16.5-22.5	0.001	0.27	0.14-0.51	<0.001
Mutado	51.6	19.6-83.6				
ALK rearrangement						
Negativo	21.9	17.2-26.6	0.510			
Positivo	12.9	4.2-21.5				
KRAS						
Negativo	21.9	18.4-25.3	0.274			
Positivo	8.0	NR				
ACE al diagnóstico						
<5ng/ml	22.7	4.7-40.6	0.717			
>5ng/ml	26.6	19.8-33.4				
CD47						
<150	26.2	20.3-32.2	0.021	1.8	1.1-2.8	0.007
>150	19.5	16.3-22.7				

CD47 NSCLC

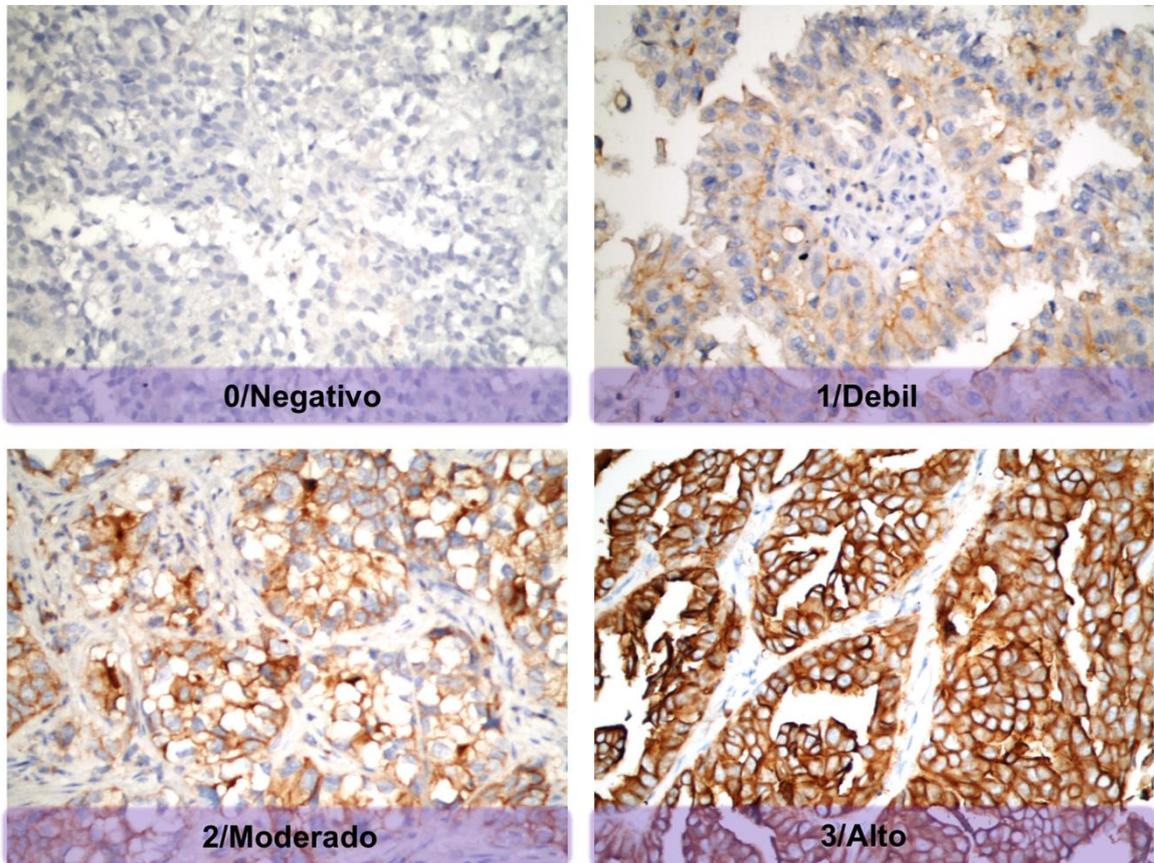


Figura 1. Se muestran ejemplos de resultados positivos y negativos para CD47 por inmunohistoquímica. La tinción de la membrana se clasificó de la siguiente forma: (A) 0 sin tinción visible, (B) 1+ para tinción leve, (C) 2+ tinción intermedia; y (D) 3+ tinción fuerte. (x400)

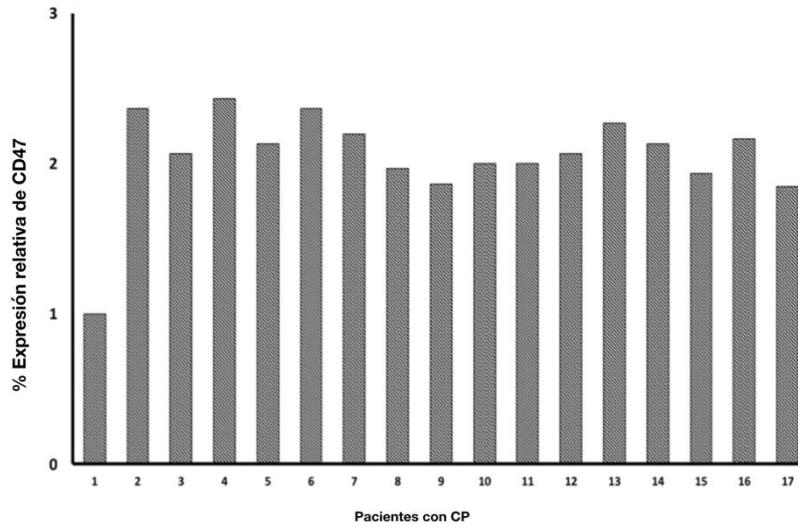


Figura 2. Se muestra el porcentaje de expresión de CD47 por PCR

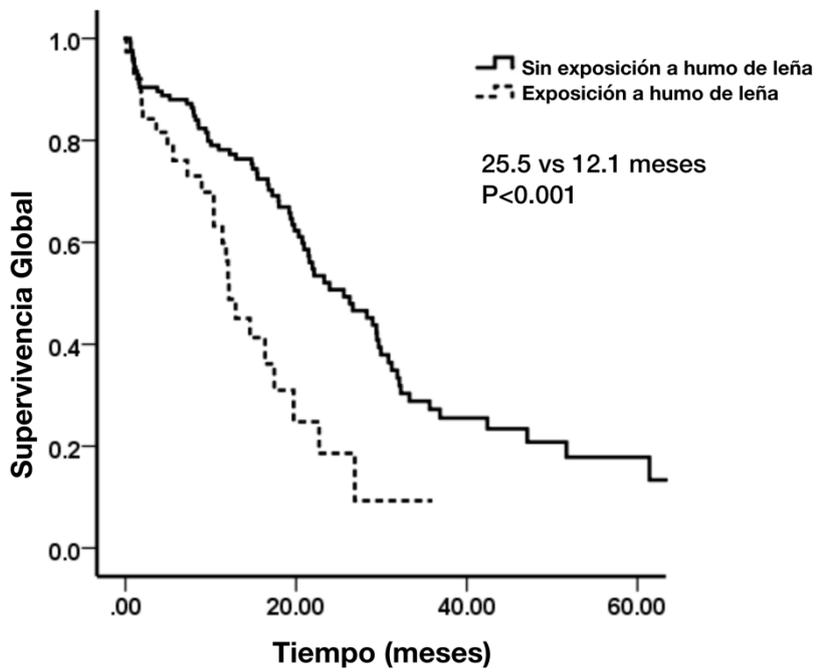


Figura 3. Supervivencia Global según antecedente de exposición a humo de leña

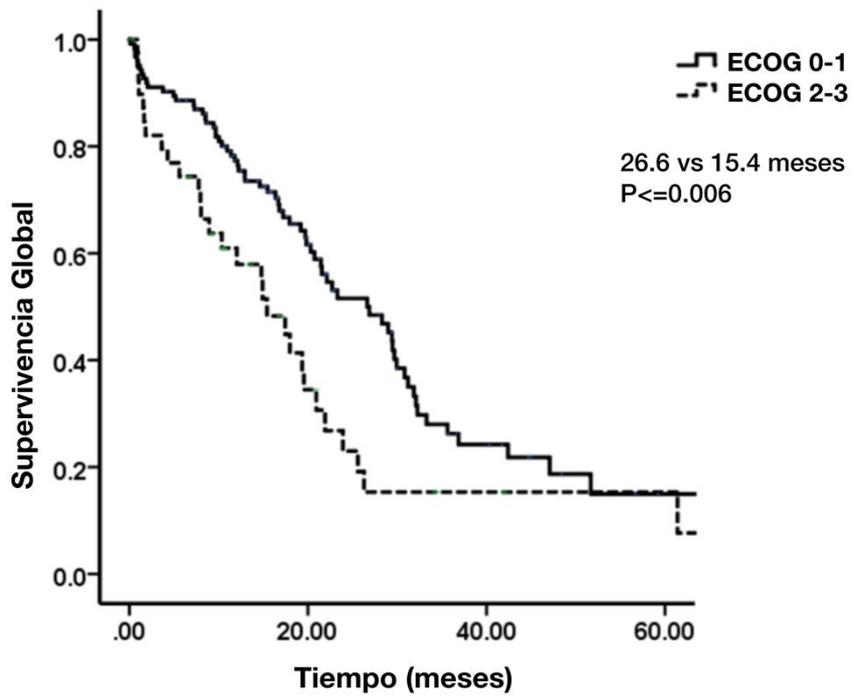


Figura 4. Supervivencia Global según estado funcional

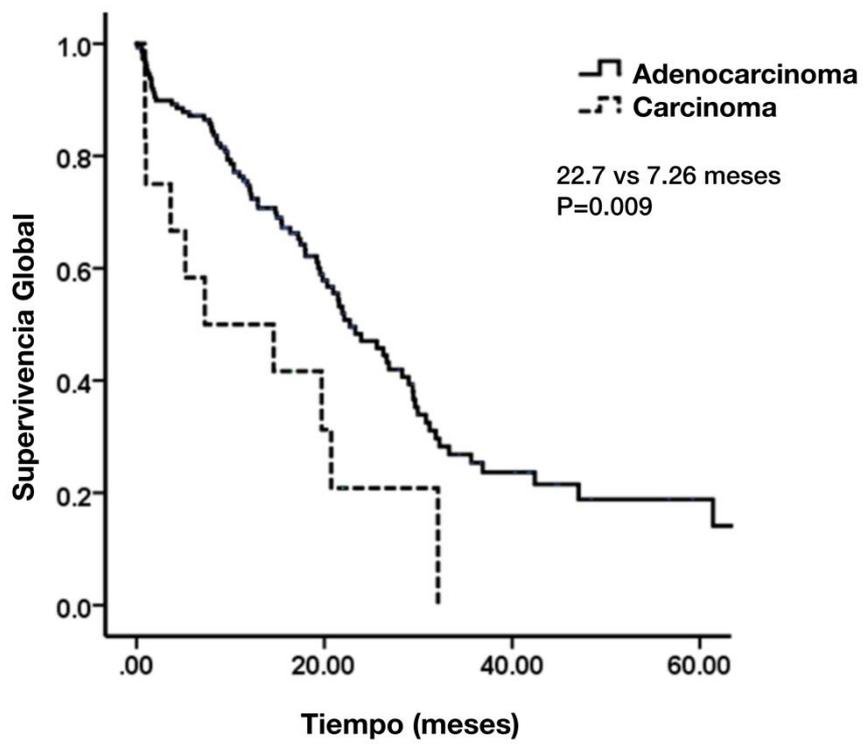


Figura 5. Supervivencia Global según histológico

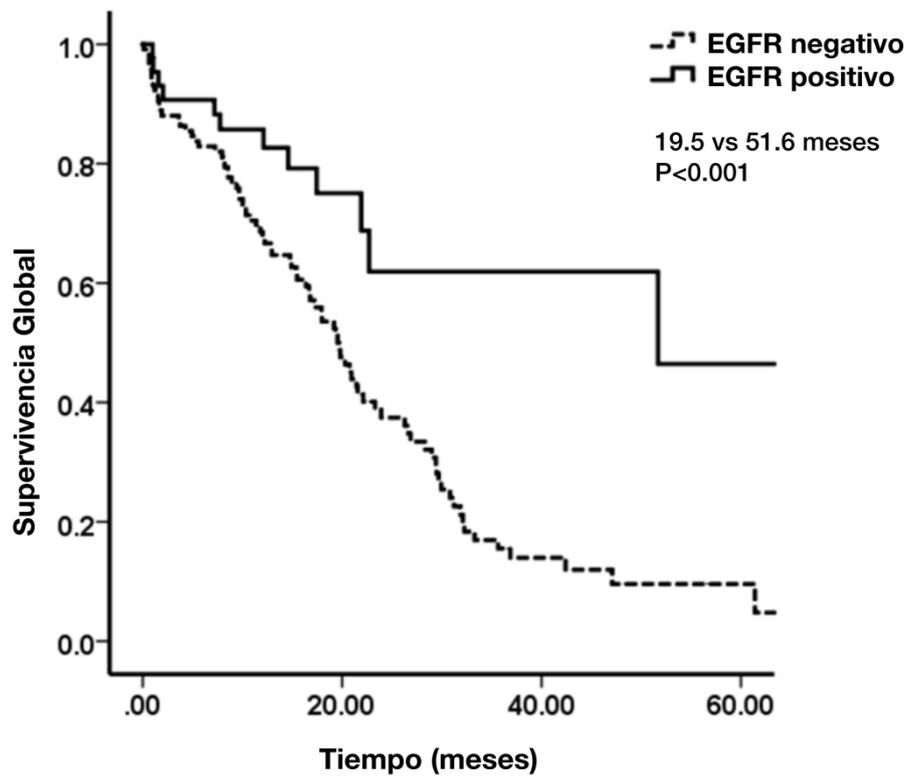


Figura 6. Supervivencia Global según la presencia de mutación en EGFR

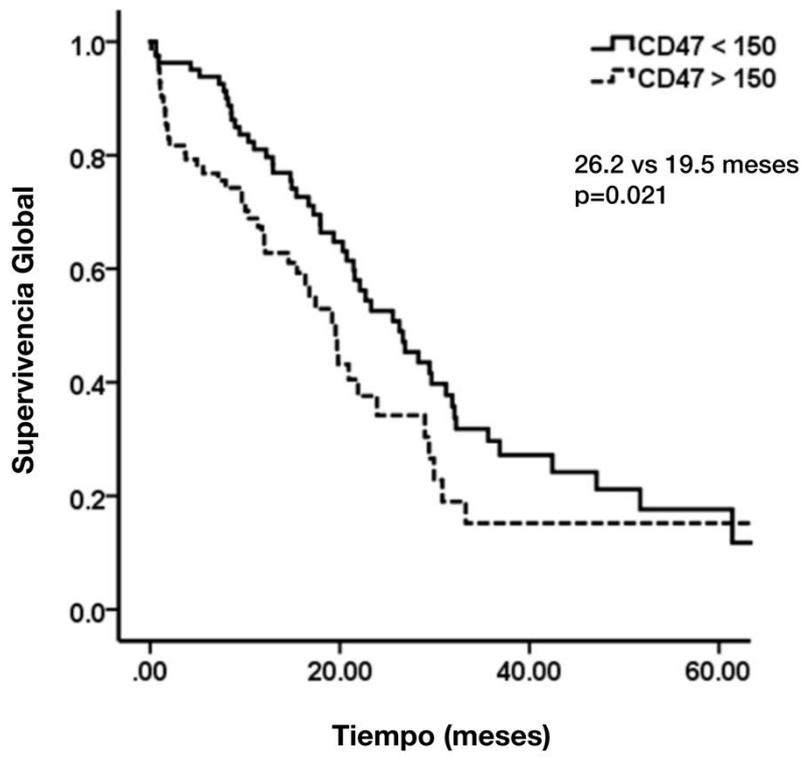


Figura 7. Se muestra el porcentaje de expresión de CD47 por PCR

REFERENCIAS

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65:87-108.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60:277-300.
3. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.)
4. Ruiz-Godoy L, Rizo Rios P, Sanchez Cervantes F, Osornio-Vargas A, Garcia-Cuellar C, Meneses Garcia A. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* 2007;58:184-90.
5. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *J Thorac Oncol* 2010;5:29-33.
6. Noone AM, Cronin KA, Altekruze SF, et al. Cancer Incidence and Survival Trends by Subtype Using Data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26:632-41.
7. Schroeder SA. New evidence that cigarette smoking remains the most important health hazard. *N Engl J Med* 2013;368:389-90.
8. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003;123:215-49S.
9. Bruske-Hohlfeld I. Environmental and occupational risk factors for lung cancer. *Methods Mol Biol* 2009;472:3-23.
10. Hensing T, Chawla A, Batra R, Salgia R. A personalized treatment for lung cancer: molecular pathways, targeted therapies, and genomic characterization. *Adv Exp Med Biol* 2014;799:85-117.
11. Ihsan R, Chauhan PS, Mishra AK, et al. Multiple analytical approaches reveal distinct gene-environment interactions in smokers and non smokers in lung cancer. *PLoS One* 2011;6:e29431.
12. Quint LE, Tummala S, Brisson LJ, et al. Distribution of distant metastases from newly diagnosed non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996;62:246-50.
13. Prorok PC, Andriole GL, Bresalier RS, et al. Design of the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial. *Control Clin Trials* 2000;21:273S-309S.
14. National Lung Screening Trial Research T, Aberle DR, Adams AM, et al. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N Engl J Med* 2011;365:395-409.
15. Silvestri GA, Tanoue LT, Margolis ML, Barker J, Detterbeck F, American College of Chest P. The noninvasive staging of non-small cell lung cancer: the guidelines. *Chest* 2003;123:147S-56S.
16. Heon S, Johnson BE. Adjuvant chemotherapy for surgically resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144:S39-42.
17. Strauss GM, Herndon JE, 2nd, Maddaus MA, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol* 2008;26:5043-51.
18. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2006;7:719-27.
19. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, et al. Impact of postoperative radiation therapy on survival in patients with complete resection and stage I, II, or IIIa non-small-cell lung cancer treated with adjuvant chemotherapy: the adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA) Randomized Trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:695-701.
20. Curran WJ, Jr., Paulus R, Langer CJ, et al. Sequential vs. concurrent chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer: randomized phase III trial RTOG 9410. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1452-60.

21. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:694-705.
22. Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba, II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treat Res* 2016;170:25-46.
23. Savage PA, Leventhal DS, Malchow S. Shaping the repertoire of tumor-infiltrating effector and regulatory T cells. *Immunol Rev* 2014;259:245-58.
24. Laoui D, Van Overmeire E, De Baetselier P, Van Ginderachter JA, Raes G. Functional Relationship between Tumor-Associated Macrophages and Macrophage Colony-Stimulating Factor as Contributors to Cancer Progression. *Front Immunol* 2014;5:489.
25. van der Merwe PA, Dushek O. Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol* 2011;11:47-55.
26. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* 2011;331:1565-70.
27. Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol* 2015;35 Suppl:S185-98.
28. Lindberg FP, Gresham HD, Schwarz E, Brown EJ. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol* 1993;123:485-96.
29. Oldenborg PA. CD47: A Cell Surface Glycoprotein Which Regulates Multiple Functions of Hematopoietic Cells in Health and Disease. *ISRN Hematol* 2013;2013:614619.
30. Spaargaren M. Lymphoma spread? Target CD47-SIRPalpha! *Blood* 2011;118:4762-4.
31. Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA, Roberts DD. CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 2006;281:26069-80.
32. Lindberg FP, Gresham HD, Reinhold MI, Brown EJ. Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. *J Cell Biol* 1996;134:1313-22.
33. Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 2009;19:72-80.
34. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Therapeutic antibody targeting of CD47 eliminates human acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2011;71:1374-84.
35. Kim D, Wang J, Willingham SB, Martin R, Wernig G, Weissman IL. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia* 2012;26:2538-45.
36. Chao MP, Alizadeh AA, Tang C, et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 2010;142:699-713.
37. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* 2009;138:286-99.
38. Galli S, Zlobec I, Schurch C, Perren A, Ochsenbein AF, Banz Y. CD47 protein expression in acute myeloid leukemia: A tissue microarray-based analysis. *Leuk Res* 2015;39:749-56.
39. Goto H, Kojima Y, Matsuda K, et al. Efficacy of anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis with macrophages against primary effusion lymphoma. *Eur J Cancer* 2014;50:1836-46.
40. Chan KS, Espinosa I, Chao M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:14016-21.
41. Kim MJ, Lee JC, Lee JJ, et al. Association of CD47 with natural killer cell-mediated cytotoxicity of head-and-neck squamous cell carcinoma lines. *Tumour Biol* 2008;29:28-34.

42. Baccelli I, Stenzinger A, Vogel V, et al. Co-expression of MET and CD47 is a novel prognosticator for survival of luminal breast cancer patients. *Oncotarget* 2014;5:8147-60.
43. Simmons CP, Koinis F, Fallon MT, et al. Prognosis in advanced lung cancer--A prospective study examining key clinicopathological factors. *Lung Cancer* 2015;88:304-9.
44. Mok TS, Loong HH. Are we ready for immune checkpoint inhibitors for advanced non-small-cell lung cancer? *Lancet* 2016;387:1488-90.
45. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med* 2010;2:63ra94.
46. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 2009;138:271-85.
47. Baccelli I, Schneeweiss A, Riethdorf S, et al. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol* 2013;31:539-44.
48. Chao MP, Tang C, Pachynski RK, Chin R, Majeti R, Weissman IL. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy. *Blood* 2011;118:4890-901.
49. Steinert G, Scholch S, Niemietz T, et al. Immune escape and survival mechanisms in circulating tumor cells of colorectal cancer. *Cancer Res* 2014;74:1694-704.
50. Zhao H, Wang J, Kong X, et al. CD47 Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Non-small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* 2016;6:29719.
51. Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. *Lab Invest* 2014;94:129-37.
52. O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol* 2011;12:795-805.
53. Yoshida K, Tsujimoto H, Matsumura K, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and a therapeutic target in gastric cancer. *Cancer Med* 2015;4:1322-33.
54. Montano M, Beccerril C, Ruiz V, Ramos C, Sansores RH, Gonzalez-Avila G. Matrix metalloproteinases activity in COPD associated with wood smoke. *Chest* 2004;125:466-72.
55. Ortega-Gomez A, Rangel-Escareno C, Molina-Romero C, et al. Gene-expression profiles in lung adenocarcinomas related to chronic wood smoke or tobacco exposure. *Respir Res* 2016;17:42.
56. Matlung HL, Szilagyi K, Barclay NA, van den Berg TK. The CD47-SIRPalpha signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol Rev* 2017;276:145-64.