CIRUGÍA ESPAÑOLA

www.elsevier.es/cirugia

Original

El ganglio centinela en el carcinoma pulmonar. Estudio molecular tras detección con radioisótopo

José M. Galbis Caravajal[a,*], *Antonio Cremades Mira*[b], *Ángel Zuñiga Cabrera*[c], *Miriam Estors Guerrero*[a], *Ana Tembl Ferrairó*[d], *Néstor J. Martinez Hernandez*[a], *Regina Gironés Sarrió*[e], *Francisco Aparisi Aparisi*[f] y *Cristóbal Gaspar Martinez*[g]

[a] *Servicio de Cirugía Torácica, Área de Respiratorio, Facultad de Medicina, Universidad Católica de Valencia, Valencia, España*
[b] *Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de la Ribera, Alcira, Valencia, España*
[c] *Servicio de Biología Molecular, Hospital Universitario de la Ribera, Alcira, Valencia, España*
[d] *Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Universitario de la Ribera, Alcira, Valencia, España*
[e] *Servicio de Oncología Médica, Hospital Lluis Alcanyís, Játiva, Valencia, España*
[f] *Servicio de Oncología Médica, Hospital Virgen de los Lirios, Alcoy, Alicante, España*
[g] *Servicio de Oncología Médica, Hospital Universitario de la Ribera, Alcira, Valencia, España*

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:
Recibido el 17 de abril de 2013
Aceptado el 11 de junio de 2013
On-line el 25 de octubre de 2013

Palabras clave:
Ganglio centinela
Cáncer de pulmón
Micrometástasis
Estadio molecular
CEACAM5
PLUNC.

RESUMEN

Introducción: La afectación metastásica a nivel ganglionar es el principal factor pronóstico en el carcinoma pulmonar localizado. Pese al estudio anatomopatológico de las piezas obtenidas tras una adecuada linfadenectomía mediastínica, la recidiva tumoral alcanza el 40% en pacientes estadio I tras la cirugía oncológica curativa. En este trabajo hemos realizado el estudio de micrometástasis por métodos moleculares en el ganglio centinela de pacientes con carcinoma pulmonar estadio I.

Material y métodos: Marcaje del ganglio centinela mediante la inyección peritumoral de 2 mCi de nanocoloide de albúmina (Nanocol®) marcado con ^{99}mTc en un volumen de 0,3 ml tras la toracotomía. Guiados mediante la sonda gammagráfica Navigator® se procedió a su localización y exéresis. Se extrajo ARN de los tejidos y se analizó la presencia de ARNm de los genes CEACAM5, PLUNC y CK7.

Resultados: Se incluyó a 29 pacientes. De los genes testados, el CEACAM5 y el PLUNC fueron los que mostraron una alta expresión en tejido pulmonar. De los 29 ganglios centinela analizados, 7 (24%) fueron positivos para estudio molecular. Se encontró ganglio centinela positivo en: 4/7 adenocarcinomas y 3/12 escamosos. Los ganglios afectos fueron: nivel 5 (1/3), nivel 7 (0/6), nivel 9 (0/1), nivel 10 (5/11), nivel 11 (1/1).

Conclusiones: La detección del ganglio centinela en pacientes con carcinoma pulmonar estadio I mediante marcaje con radioisótopo es factible. La aplicación de técnicas moleculares pone de manifiesto la afectación tumoral en casos estadificados como estadio I.

© 2013 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* *Autor para correspondencia.*
Correo electrónico: jgalbis@hospital-ribera.com (J.M. Galbis Caravajal).
0009-739X/$ – see front matter © 2013 AEC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ciresp.2013.06.016

Sentinel lymph node in pulmonary carcinoma. Molecular study after radioisotope detection

Keywords:
Sentinel node
Lung cancer
Micrometastasis
Molecular staging
CEACAM5
PLUNC.

ABSTRACT

Introduction: Metastatic lymph node affectation is the main prognostic factor in localized lung cancer. Pathological study of the obtained samples even after an adequate lymphadenectomy, present tumoral relapses of 40% of stage I patients after oncological curative surgery. In this paper we have studied micrometastasis in the sentinel lymph node by molecular methods in patients with stage I lung cancer.

Material and methods: The sentinel node was marked by injecting peritumorally performed just after performing the thoracotomy with 2 mCi of nanocoloid of albumin (Nanocol®) marked with ^{99}mTc in 0.3 ml. Guided with a Navigator® gammagraphic sensor, we proceeded to its resection. RNA of the tissue was extracted and the presence of genes CEACAM5, PLUNC and CK7 in mRNA was studied.

Results: Twenty nine 29 patients were included. Of the tested genes, CEACAM5 and PLUNC were the ones that showed a high expression in lung tissue. Of the 29 analyzed sentinel lymph nodes, 7 (24%) were positive in the molecular study. A positive sentinel lymph node was found in 4/7 adenocarcinomas and 3/12 squamous-cell tumors. Affected lymph nodes were: station 5 (1/3), station 7 (0/6), station 9 (0/1); station 10 (5/11); station 11 (1/1).

Conclusions: Detection of sentinel node in patients with stage I lung cancer by marking with radioisotope is a feasible technique. The application of molecular techniques shows the tumoral affectation in cases staged as stage I.

© 2013 AEC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La linfadenectomía mediastínica en el carcinoma pulmonar es un procedimiento usual. Dentro del TNM, el especial tropismo de las células neoplásicas pulmonares por los territorios linfáticos hace que un adecuado y exhaustivo estudio de las adenopatías mediastínicas sea básico para establecer una correcta estadificación. La afectación linfática ganglionar por metástasis es, pues, un factor pronóstico de especial relevancia en el cáncer pulmonar[1].

Al igual que sucede con el tamaño tumoral, a mayor número de ganglios afectados, mayor extensión anatómica y peor pronóstico[2]. En el carcinoma de pulmón, la clasificación ganglionar se rige exclusivamente por la ausencia (N0) o presencia (N1-3) y localización de ganglios afectados. Los descriptores N1-3 indican la localización ganglionar: a mayor N, mayor distancia del tumor primario y peor pronóstico.

Toda esta abundante información sobre el impacto pronóstico del número de ganglios y estaciones ganglionares comprometidas por el tumor ha sido posible porque se han extirpado y analizado los ganglios.

Incluso para los tumores en estadio I patológico, a mayor número de ganglios extirpados, mejor pronóstico, aunque no hay unanimidad sobre el número ideal de ganglios que extirpar: en los estudios retrospectivos publicados, este número oscila entre 6 y 15[3,4], recomendando 10 ganglios[5].

La forma generalmente recomendada de linfadenectomía mediastínica es la disección ganglionar sistemática[6]. Es la técnica que ofrece mejores garantías para una correcta estadificación tanto para certificar y matizar el compromiso ganglionar como para certificar su ausencia.

Los esfuerzos dirigidos a estudiar con técnicas novedosas los ganglios obtenidos en la cirugía van dirigidos a optimizar el rendimiento de las piezas y a aumentar las posibilidades de curación, al establecer un tratamiento acorde a la estadificación de la enfermedad.

El estudio de micrometástasis ganglionares ha sido publicado como un factor de peor pronóstico[7]. En un estudio publicado por nuestro grupo[8] la existencia de micrometástasis ganglionares halladas por métodos moleculares era un factor de más pronta recidiva tumoral. Sin embargo, el gran número de ganglios estudiados por paciente fue un parámetro que nos hizo inviable su aplicación sistemática.

La introducción del concepto de ganglio centinela (GC) bien conocido en tumores de mama y melanoma animó a la detección de dicho GC en el carcinoma pulmonar. Las limitaciones concernientes a su aplicación sistemática son numerosas y precisan de homogeneidad y validación.

El objetivo del presente trabajo es presentar nuestra experiencia en el marcaje del GC en pacientes con carcinoma pulmonar y su estudio molecular en busca de micrometástasis.

Material y métodos

Ante un paciente con criterios de inclusión (tabla 1), se procedió al marcaje del GC mediante la inyección peritumoral de 2 mCi de nanocoloide de albúmina (Nanocol®) marcado con ^{99}mTc en un volumen de 0,3 ml tras la toracotomía. Pasados un mínimo de 15 min y guiados mediante la sonda gammagráfica Navigator®, se procedió a su localización y exéresis.

Se recogieron muestras de tejido sano, tumoral y GC de todos los pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico en estadio I en el momento de la cirugía, transcurriendo el menor tiempo posible (< 30 min) para preservar lo más intacto el ARNm.

Tabla 1 – Criterios de inclusión de pacientes en el estudio

Tumor estadio I tras estudio patológico
No haber recibido tratamiento adyuvante
Ausencia de otras neoplasias previas/sincrónicas
Diagnóstico de carcinoma pulmonar primario no de células pequeñas
Descartar afectación tumoral en el GC por hematoxilina-eosina

Parte del tejido (pulmón normal, tumor y GC) se congeló inmediatamente y se almacenó en un arcón congelador de –80 °C. El resto del tejido se procesó rutinariamente, fijado en formol tamponado, embebido en parafina, realizando secciones teñidas con hematoxilina-eosina y estudio inmunohistoquímico (CKAE1/3; CK7; CK19).

Para el estudio inmunohistoquímico, se usó la técnica estándar (complejo avidina-biotina), en un inmunoteñidor automático (TechMate 500; Biotech Solutions, Dako, Dinamarca), evaluando la inmunorreactividad para CKAE1/3, CK7 y CK19, al ser estos los marcadores histológicos habituales para tejido pulmonar.

Se disecó el ganglio remitido como centinela para el estudio inmunohistoquímico y molecular. Dos terceras partes del ganglio linfático fueron procesadas para estudio anatomopatológico convencional y una tercera parte se preservó en 1 ml de RNA later™ (QIAGEN), identificado con el nombre del paciente y fecha de nacimiento. De este material se extraerá el ARNm para RT-PCR.

Para la detección de metástasis ocultas por medio de RT-PCR como técnica molecular se escogieron los marcadores de expresión génica CK7, CEACAM5 y PLUNC. Se empleó GADPH como control de expresión génica, que nos permite evaluar la calidad de la muestra y normalizar el resultado del estudio de expresión.

La elección de los 3 marcadores se basa en el trabajo de Benlloch et al. (2009)[8] donde se realizó un extensa búsqueda en el catálogo SAGE (http://cgap.nci.nih.gov/Catalog; Lash et al., 2000)[9] con el objetivo de seleccionar genes con alta expresión en tejido pulmonar y baja o nula expresión en ganglios linfáticos benignos. Se seleccionaron los genes CK7, CEACAM5 y PLUNC como los más específicos para la detección de metástasis pulmonar, por lo que se considera a aquellos ganglios linfáticos con expresión de al menos 2 de los genes marcadores de presencia de células de origen pulmonar como positivos moleculares.

La fracción de tejido tumoral, pulmonar normal y de GC se manejó en frío y con material estéril. Se procedió a su triturado en un equipo TissueLyser® (QIAGEN) según protocolo recomendado por el fabricante. A partir del homogeneizado, se procedió a la extracción de ARN utilizando el kit QIAGEN RNA Mini Kit™ (QIAGEN) en un extractor automático de ácidos nucleicos (Qiacube™, QIAGEN). El ARN obtenido de las muestras se cuantificó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000® (NanoDrop Technologies). Para la obtención de ADNc, se procedió a realizar una RT-PCR empleando el kit GeneAmp RT-PCR™ (Applied Biosystems) a partir del 1 μg de ARN total usando hexámeros al azar *(random hexamers)* de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADNc se almacenó a –80 °C hasta su utilización.

El estudio de expresión génica se realizó en un equipo ABI7500® (Applied Biosystems). Los primeros, las sondas y la Taqman Universal MX™ se adquirieron en la casa comercial Applied Biosystems. Se emplearon 2,5 μl de ADNc para la amplificación de la PCR. Cada muestra se analizó por triplicado. En todos los ensayos se incluyeron controles negativos y positivos. Las condiciones de la PCR fueron: incubación inicial a 50 °C durante 2 min para activar la AmpErase UNG™; posteriormente a 95 °C durante 10 min para activar la AmpliTaq Gold polymerase™, seguido de 50 ciclos a 95 °C durante 15 s, y a 60 °C durante 1 min. El tejido tumoral y pulmonar normal de cada paciente sirvió de control positivo. Los cebadores y las sondas se adquirieron como *Assay-on-demand* de Applied Biosystems (CK7 Hs00559840_m1, CEACAM5 Hs00237075_m1, PLUNC Hs 00213177_m1). Los ampliaciones incluían uniones exónicas para conseguir especificidad del ADNc y evitar amplificación de posible ADN genómico contaminante. El tejido pulmonar tumoral de cada paciente se empleó como control positivo de expresión de los genes analizados. Se empleó expresión del gen GADPH (Hs02758991_g1) como control endógeno de calidad de la muestra y de la cantidad de ARNm analizado.

Resultados

La muestra estaba formada por 42 pacientes. Trece pacientes fueron excluidos del reclutamiento inicial: 2 por tratarse de tumores benignos, 3 por ser tumores metastásicos y 8 por encontrarse el GC afecto por metástasis en el estudio de hematoxilina-eosina convencional.

Los pacientes incluidos fueron 29: 21 hombres con una edad media de 64,28 años (rango: 49-79 años). El tamaño tumoral medio fue de 27,86 ± 16,2 mm (rango: 8-65 mm). Se practicaron 20 lobectomías, una bilobectomía, una neumonectomía y 7 resecciones segmentarias.

El tiempo medio de espera entre la administración del radiofármaco y la identificación del GC fue de 59 min (rango 28-125 min).

Los tipos histológicos fueron: 11 adenocarcinomas, 15 escamosos, 2 carcinomas neuroendocrinos y uno adenoescamoso.

De los genes testados, el CEACAM5 y el PLUNC fueron los que mostraron una alta expresión en tejido pulmonar y baja o nula expresión en tejido linfático no afecto por el tumor. De los 29 GC analizados (tabla 2), 7 (24%) fueron positivos para estudio molecular. De estos, 3 también mostraron citoqueratina positiva (CK7). Se encontró GC positivo en: 4/7 adenocarcinomas

Tabla 2 – Estudio del GC mediante inmunohistoquímica y estudio molecular

Tipo histológico	Total	+ INH en GC	+ molecular en GC
Adenocarcinomas	11	2	4
Escamosos	15	1	3
Otros	3	0	0

INH: inmunohistoquímica.

Tabla 3 – Topografía del GC detectado y afecto por métodos moleculares

Estación ganglionar	+ molecular del GC	GC detectados	Topografía
Grupo 5	1	4	N2
Grupo 7	0	6	N2
Grupo 9	0	1	N2
Grupo 10	5	16	N1
Grupo 11	1	2	N1

y 3/12 escamosos. El estudio molecular del GC viene reflejado en la tabla 3.

Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó con el programa SPSS versión 20. Se calcularon los estadísticos descriptivos de las variables, porcentajes, medias y desviaciones estándar.

Para el cálculo del tamaño muestral no puede hacerse una estimación estadística fiable al no existir suficientes estudios de condiciones similares; se recurrió a la literatura médica para valorar el tamaño muestral con relación a los estudios semejantes.

Discusión

La afectación metastásica a nivel ganglionar es el principal factor pronóstico en el carcinoma pulmonar localizado[10]. La detección de ganglios mediastínicos afectos por métodos de imagen (TC) o por medicina nuclear (PET-TC) lleva implícito un número de falsos negativos, de gran valor a la hora de establecer un pronóstico y tratamiento adecuado a la correcta estadificación. Pese al correcto estudio anatomopatológico de las piezas obtenidas tras la linfadenectomía mediastínica, la recidiva tumoral alcanza al 40% en pacientes estadio I tras una cirugía oncológica curativa[11]. La explicación de este elevado índice de recidivas es escasamente justificado.

La existencia de micrometástasis no identificadas por los métodos de estudio habituales (hematoxilina-eosina) es considerada como una explicación plausible. En una anterior publicación[8] demostramos la presencia de dichas micrometástasis detectadas mediante métodos moleculares en ganglios mediastínicos. Sin embargo, el enorme esfuerzo en recursos humanos y coste económico que suponía analizar una media de 12 adenopatías por paciente nos hizo centrarnos en la detección del GC para su análisis molecular, reduciendo así costes.

El concepto de GC supone que el flujo linfático del tumor primario migra en primer lugar a ganglios en contiguidad anatómica antes que a otros más distantes[12]. Como sabemos, el GC ha sido bien estudiado en el melanoma y el carcinoma de mama[13]. En el caso del carcinoma pulmonar la finalidad de su detección es distinta a la de los casos comentados: aunque está descrito un aumento de posibles complicaciones tras la linfadenectomía mediastínica[14] el motivo del estudio molecular es evitar una subestadificación (estadificar como estadio I pacientes que realmente tienen afectación molecular). Valorar el impacto en el pronóstico y las posibilidades de tratamiento de este subgrupo de pacientes es un segundo paso más ambicioso.

Sin embargo, la detección del GC en pulmón tiene una serie de particularidades. La administración del radiofármaco debe realizarse tras la toracotomía. La adecuada migración del marcador a través de la red linfática queda en duda, aunque Liptay[10] cita una sensibilidad del 92%, siendo superior a otras técnicas como la inyección de colorantes (isosulfato azul) descrita por Little et al.[15].

Por otro lado, el estudio ganglionar por hematoxilina-eosina ha mostrado afectación tumoral en 8 casos (5 en estaciones N1). La búsqueda de adenopatías en el campo quirúrgico con la sonda de detección, siguiendo las vías linfáticas descritas de forma anatómica, nos ha permitido un estudio más exhaustivo de lo habitual de las adenopatías pulmonares (N1) y detectar afectación tumoral a este nivel.

Como sabemos, los linfáticos subpleurales conectan directamente con las adenopatías a nivel de mediastino en el 20-25% de los pacientes[16]. Además, compartimos la opinión de Nomori et al.[17] de que el GC en la cavidad torácica es lóbulo específico. Es lógico pensar que las estaciones por donde circula la linfa sean desde la lesión hacia ganglios cercanos (subpleurales/intraparenquimatosos: considerados N1) y, en algunos casos, directamente a los considerados N2[18] como los de la ventana aorto pulmonar[19]. El estudio de los patrones teóricos de drenaje linfático y la correcta localización de los ganglios marcados con radio isótopo a nivel particular en el momento de la cirugía puede explicar, al menos en parte, el fenómeno de las *skip metastases* y verificar un patrón más lógico de migración aunque el pronóstico de los pacientes con *skip metastases* mediastínicas (N1- y N2+) sigue suscitando controversia[20].

En nuestro trabajo, los ganglios afectos en nivel N1 fueron 6/12 mientras que en N2 fueron 1/10, este en localización a nivel de ventana aorto pulmonar, resultados concordantes con lo expuesto en el párrafo anterior.

En cuanto al tipo histológico, se detectó GC en más de la mitad de los adenocarcinomas (57%) y el 25% de los carcinomas escamosos. Es conocida la diseminación metastásica más frecuente en los adenocarcinomas, hecho contrastado en nuestro estudio.

En conclusión, la detección del GC en pacientes con carcinoma pulmonar estadio I mediante marcaje con radioisótopo permite estudiar dicha adenopatía de forma más detenida. La aplicación de técnicas moleculares pone de manifiesto su afectación tumoral en casos estadificados como estadio I. Este dato explicaría, al menos en parte, la elevada incidencia de progresión de enfermedad en pacientes estadificados como I por métodos convencionales. El pronóstico y posibilidades de tratamiento de este subgrupo de pacientes es un reto a investigar.

Financiación

Este estudio ha sido realizado con una beca GIDO (Grupo de Investigación y Divulgación Oncológica).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sugi K, Kobayashi S, Yagi R, Matsouka T. Usefulness of sentinel lymph node biopsy for the detection of lymph node micrometastasis in early lung cáncer. Int Cardiovasc Thorac Surg. 2008;913–5.
2. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL. En:Trotti III A, editor. Cancer staging manual. 7 th ed. New York: Springer. 2010.
3. Ou S-H. I, Zell JA. Prognostic significance of the number of lymph nodes removed at lobectomy in stage IA non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol. 2008;3:880–6.
4. Varlotto JM, Recht A, Nikolov M, Flickinger JC, de Camp MM. Extent of lymphadenectomy and outcome for patients with stage I non small cell lung cancer. Cancer. 2009;115:851–8.
5. Whitson B, Groth S, Maddaus M. Surgical assessment and intraoperative management of mediastinal lymph nodes in non–small cell lung cancer. Ann Thorac Surg. 2007;84: 1059–65.
6. Giroux DJ, Rami-Porta R, Chansky K, Crowley JJ, Groome PA, Postmus PE, et al., on behalf of the International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee The IASLC lung cancer staging project. Data elements for the prospective project. J Thorac Oncol. 2009;4:679–83.
7. Gu CD, Osaki T, Oyama T, Inoue M, Kodate M, Dobashi K, et al. Detection of micrometastasis cells in pN0 lymph nodes of patients with completely resected nonsmalll cell lung cancer: Impact on recurrence and survival. Ann Surg. 2002;235:133–9.
8. Benlloch S, Galbis JM, Alenda C, Sanchez M, Rodriguez JM, Baschwitz B, et al. Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small cell lung cancer (NSCLC): Prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases. Ann Oncol. 2009;20:91–7.
9. Lash AE, Tolstoshev CM, Wagner L. SAGE map: A public gene expression resource. Genome Res. 2000;10:1051–60.
10. Liptay M, Masters G, Winchester D, Edelman B, Garrido B, Hirschtritt BA, et al. Intraoperative radioisotope sentinel lymph node mapping in non–small cell lung cancer. Ann Thorac Surg. 2000;70:384–90.
11. Darling GE, Allen MS, Decker PA, Ballman K, Malthaner RA, Inculet RI, et al. Randomized trial of mediastinal lymph node sampling versus complete lymphadenectomy during pulmonary resection in the patients with N0 or N1 non-small cell carcinoma: Results of the American College of Surgery Oncology Group Z0030 trial. J Thorac Cardiovasc Surg. 2011;141:662–70.
12. Minamiya Y, Ito M, Hosona Y, Kawai H, Saito H, Katayose Y, et al. Subpleural injection of tracer improves detection of mediastinal sentinel lymph nodes in non–small cell lung cancer. Eur J Cardio Thor Surg. 2007;770–5.
13. Nieweg OE, Estourgie SH, Valdes Olmos RA, Rutgers EJ, Hoefnagel CA, Kroon BB. Lymphatic mapping with tracer administration into the primary breast cancer. Eur J Surg Oncol. 2003;29:95–7.
14. Darling GE, Allen MS, Decker PA, Ballman K, Malthaner RA, Inculet RI, et al. Number of lymph nodes harvested from a mediastinal lymphadenectomy. Results of the Randomized, Prospective American College of Surgeons Oncology Group Z0030 Trial. Chest. 2011;139:1124–9.
15. Little AG, de Hoyos A, Kirgan DM, Arcomno TR, Murray KD. Intraoperative lymphatic mapping for non–small cell lung cancer: The sentinel nodel technique. J Thorac Cardiovasc Surg. 1999;117:220–4.
16. Nomori H, Kohno M, Izumi Y, Ohtsuka T, Asakura K. Sentinel nodes in lung cancer: Review of our 10-year experience. Surg Today. 2011;41:889–95.
17. Riquet M, Bagan P, Le Pimpec Barthes F, Banu E, Scotte F, Foucault C, et al. Completely resected non-small cell lung cancer: Reconsidering prognostic value and significance of N2 metastases. Ann Thorac Surg. 2007;84:1818–24.
18. Puma B. Isolated mediastinal skip metastasis in lung cancer: Is it real N2 disease? J Thorac Cardiovasc Surg. 2005;129:235.
19. Misthos P, Sepsas E, Kokotsakis J, Skottis I, Lioulias A. The significance of onestation N2 disease in the prognosis of patients with nonsmall-cell lung cancer. Ann Thorac Surg. 2008;86:1626–31.
20. Benoit L, Anusca A, Ortega-Deballon P, Cheynel N, Bernard A, Favre JP. Analysis of risk factors for skip lymphatic metastasis and their prognostic value in operated N2 non-small-cell lung carcinoma. Eur J Surg Oncol. 2006;32: 583–7.