

Universidad Autónoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Tesis Doctoral

**PERFIL MOLECULAR EN CÁNCER
ESCAMOSO DE PULMÓN**

Laboratorio de Oncología Translacional

Instituto Oncológico Dr. Rosell

Hospital Universitario Quirón Dexeus

2013

Autor: Amaya Gascó Hernández

Directores: Rafael Rosell Costa

Carlota Costa Ribalta

Tutor: Evarist Feliu Frasnado

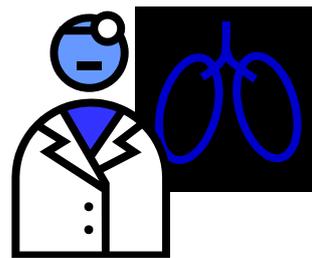
“A mis padres, a mis hermanas, a Juanito, a Ambrosia y a Ginebra”

*“Son tantas las personas a las que debo agradecer este sueño,
que la lista sería interminable.*

Gracias por el esfuerzo, el apoyo, la comprensión y sobre todo por vuestro cariño...”

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein



ÍNDICE

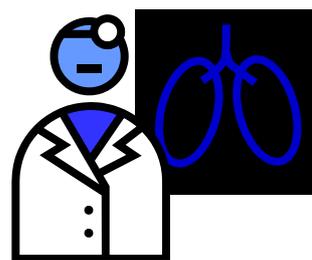
ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1.- CÁNCER DE PULMÓN	1
1.1.-INCIDENCIA	1
1.2.- FACTORES DE RIESGO	4
1.2.1.-Tabaco	4
1.2.2.-Polución ambiental	5
1.2.3.-Radón	6
1.2.4.-Asbesto	6
1.2.5.-Factores dietéticos	7
1.2.6.- Patología inflamatoria y benigna de pulmón.....	8
1.2.7.- Radioterapia	8
1.2.8.- Interacciones genéticas y ambientales.....	8
1.3.- HISTOLOGÍA.....	9
1.3.1.-Lesiones preinvasivas.....	12
1.3.1.1- DISPLASIA ESCAMOSA Y CIS	12
1.3.1.2- HAA Y AIS.....	13
1.3.1.3- HDCNEP	14
1.3.2.- Carcinoma escamoso.....	14
1.3.3.-Adenocarcinoma	15
1.3.4.- Carcinoma de células pequeñas	16
1.3.5.- Carcinoma de células grandes.....	18
1.3.6.- Carcinoma adenoescamoso.....	18
1.3.7.- Carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides.....	18
1.3.8.- Carcinoides típicos y atípicos	19
1.4.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS	21
1.4.1.-Manifestaciones locorregionales	21
1.4.1.1- TOS	21
1.4.1.2- HEMOPTISIS.....	22
1.4.1.3- DOLOR TORÁCICO	22
1.4.1.4- DISNEA.....	22
1.4.1.5- DISFONÍA Y SIBILANCIAS.....	23
1.4.1.6- DISFAGIA	23
1.4.1.7- DERRAME PLEURAL.....	23
1.4.1.8- DERRAME PERICÁRDICO	24
1.4.1.9- SVCS	24
1.4.1.10- LINFANGITIS CARCINOMATOSA	25
1.4.1.11- SÍNDROME DE PANCOAST	26
1.4.2.-Manifestaciones extratorácicas	27
1.4.2.1- CEREBRO	27
1.4.2.2- HUESO	28
1.4.2.3- HÍGADO, ADRENAL Y ADENOPATÍAS ABDOMINALES	29
1.4.3.- Síndromes paraneoplásicos	31
1.4.3.1- CAQUEXIA.....	31
1.4.3.2- HIPERCALCEMIA.....	31
1.4.3.3- SIADH	32
1.4.3.4- SÍNDROME DE CUSHING.....	33

1.4.3.5.- SÍNDROMES NEUROLÓGICOS.....	33
1.4.3.6.- MANIFESTACIONES HEMATOLÓGICAS	34
1.4.3.7.- MANIFESTACIONES CUTÁNEAS.....	34
1.4.3.8.- OSTEOARTROPATÍA HIPERTRÓFICA PULMONAR	35
1.5.- TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	35
1.5.1.- Técnicas de imagen.....	35
1.5.1.1- RADIOGRAFÍA SIMPLE DE TÓRAX	35
1.5.1.2- TC	36
1.5.1.3- PET	38
1.5.1.4- RM	40
1.5.1.5.- GGO	41
1.5.2.- Muestreo tumoral.....	42
1.5.2.1- TÉCNICAS NO QUIRÚRGICAS	42
1.5.2.2- TÉCNICAS QUIRÚRGICAS	43
1.6.- ESTADIFICACIÓN.....	45
1.7.- TRATAMIENTO	46
1.7.1.- Cirugía	46
1.7.2.- Radioterapia	47
1.7.3.- Tratamiento sistémico.....	49
2.- ALTERACIONES GENÉTICAS	50
2.1.-RECEPTORES DE MEMBRANA	50
2.1.1.- <i>AXL</i>	50
2.1.2.- <i>DDR2</i>	52
2.1.3.- <i>EGFR</i>	53
2.1.4.- <i>FGFR1</i>	58
2.1.5.- <i>KDR</i>	61
2.1.6.- <i>MET</i>	63
2.1.7.- <i>PDGFR</i>	64
2.2.-TRASDUCTORES DE SEÑAL	66
2.2.1.- <i>BRAF</i>	66
2.2.2.- <i>K-RAS</i>	68
2.2.3.- <i>NF1</i>	72
2.2.4.- <i>PIK3CA</i>	72
2.3.-FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	73
2.3.1.- <i>SOX2</i>	73
2.3.2.- <i>TP53</i>	76
2.4.-OTROS REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN	79
2.4.1.- <i>AEG1</i>	79
2.4.2.- <i>EZH2</i>	80
2.4.3.- <i>HES1</i>	81
2.4.4.- <i>SIAH2</i>	82
2.5.-REPARADORES DNA	83
2.5.1.- <i>BRCA1</i> y <i>RAP80</i>	83

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	87
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	91
3.1.-PACIENTES	91
3.2.- OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	94
3.2.1.-Valoración del patólogo	94
3.2.2.-Micro/macrodisección	95
3.3.- ANÁLISIS DE MUTACIONES	96
3.3.1.-Análisis de mutaciones en exones 19 y 21 de <i>EGFR</i>	96
3.3.2.-Análisis de mutación de <i>EGFR</i> T790M pretratamiento	98
3.3.3.-Análisis de las mutaciones de <i>PIK3CA</i>	99
3.3.4.-Análisis de mutaciones de <i>K-RAS</i>	100
3.3.5.-Análisis de mutaciones de <i>BRAF</i>	101
3.3.6.-Análisis de mutaciones de <i>TP53</i>	101
3.3.7.-Análisis de mutaciones de <i>DDR2</i>	104
3.4.- ANÁLISIS DE NÚMERO DE COPIAS DEL GEN MEDIANTE MLPA	106
3.5.- ANÁLISIS DE NÚMERO DE COPIAS DEL GEN MEDIANTE FISH	107
3.6.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE mRNA	109
3.6.1.-Extracción del mRNA	109
3.6.2.-Retrotranscripción y Real-Time-PCR.....	110
3.6.3.-Análisis de resultados de Real-Time PCR.....	114
3.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	114
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
4.1.-MLPA	119
4.2.-MUTACIONES	125
4.3.-RNA	131
4.4.-DISCUSIÓN GENERAL	138
CONCLUSIONES	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147
APÉNDICE.....	167



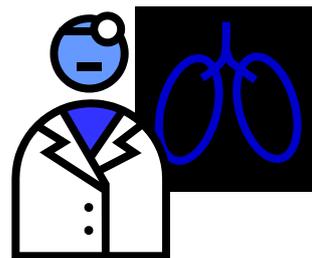
ABREVIATURAS

<i>AEG1:</i>	<i>Astrocyte Elevated Gene 1</i>
AINES:	Antiinflamatorios No Esteroideos
AIS:	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
ATS:	<i>American Thoracic Society</i>
<i>BRAF:</i>	<i>V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
<i>BRCA1:</i>	<i>Breast Cancer 1</i>
cDNA:	<i>Complementary DNA</i>
CIS:	Carcinoma <i>in situ</i>
COSMIC DB:	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer Data Base</i>
CPCNP:	Cáncer de Pulmón de Célula no Pequeña
CPCP:	Cáncer de Pulmón de Célula Pequeña
<i>DDR2:</i>	<i>Discoidin Domain-containing Receptor 2</i>
<i>DNA:</i>	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
EBUS:	Ecografía Endobronquial
EBUS-TBNA:	Ecografía Endobronquial con Biopsia
EE:	Enfermedad Estable
<i>EGFR:</i>	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERS:	<i>European Respiratory Society</i>
EUS-FNA:	Ecografía Transesofágica Endoscópica
<i>EZH2:</i>	<i>Enhancer of Zeste Homolog 2</i>
FDG:	Fluorodesoxiglucosa
<i>FGFR1:</i>	<i>Fibroblastic Growth Factor Receptor 1</i>
FISH:	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i>
GIST:	<i>Gastrointestinal Stromal Tumors</i>
GGO:	Gammagrafía Ósea
HAA:	Hiperplasia Adenomatosa Atípica
<i>HES1:</i>	<i>Hairy and Enhancer of Split-1</i>

HDCNEP:	Hiperplasia Difusa de Células Neuroendocrinas Pulmonar
HRM:	<i>High Resolution Melting</i>
HRR:	<i>Homologous Recombination Repair</i>
IASCL:	<i>International Association for the Study of Lung Cancer</i>
IHQ:	Inmunohistoquímica
IL-1:	Interleuquina 1
IMRT:	Radioterapia de Intensidad Modulada
ITQ:	Inhibidores de la Tirosina Quinasa
KDR	<i>Kinase Insert Domain Receptor</i>
K-RAS:	<i>V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
KRT6:	<i>Keratin 6A</i>
LSI:	Lóbulo Superior Izquierdo
MET:	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>
μM	Micromolar
μl	Microlitro
M:	Mol
mM:	Milimolar
MLPA:	Multiplex ligation-dependent Probe Amplification
mRNA:	<i>Messenger Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico mensajero)</i>
NF1:	<i>Neurofibromin 1</i>
NER:	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
NEG:	Negativo
ng:	Nanogramos
NR:	<i>Not Reached</i>
ON:	<i>Over Night</i>
OS:	<i>Overall Survival</i>
p:	Pacientes

PAAF:	Punción Aspiración con Aguja Fina
PAHs:	Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la Polimerasa)
<i>PDGFR:</i>	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor</i>
PE:	Progresión de la Enfermedad
PET:	Tomografía por Emisión de Positrones
PFS:	<i>Progression Free Survival</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphoinositide-3-Kinase, Catalytic, Alpha Polypeptide</i>
pmol:	Picomol
PNA:	<i>Protein Nucleic Acid</i>
PRC2:	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
PTHrP:	Proteína relacionada con la Hormona Paratiroidea
<i>RAP80:</i>	<i>Receptor-associated Protein 80</i>
RECIST:	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
RC:	Respuesta Completa
RF:	Radiofrecuencia
RM:	Resonancia Magnética
RP:	Respuesta Parcial
rpm:	Revoluciones por Minuto
RT:	Radioterapia
RTH:	Radioterapia Holocraneal
RT-PCR:	Retrotranscripción seguida de PCR
SBRT:	<i>Stereotactic Body Radiation Therapy</i>
SG:	Supervivencia Global
SIADH:	Secreción Inadecuada de Hormona Antidiurética
SLP:	Supervivencia Libre de Progresión
<i>SOX2:</i>	<i>Sex determining Region Y-Box 2</i>

SUV:	<i>Standardized Uptake Value</i>
TC:	Tomografía Computarizada
TE:	TRIS-EDTA
TNM:	<i>Tumor-Node-Metastasis</i>
TTF1:	<i>Thyroid Transcription Factor</i>
U:	Unidades
VEGFR2:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>
wt:	<i>Wild Type</i>



INTRODUCCIÓN

El cáncer no es sólo una enfermedad, es también uno de los mayores retos a los que se ha enfrentado nunca la humanidad. Cada año mueren en el mundo más de 7 millones de personas a causa de alguna de sus múltiples manifestaciones; de tal manera que, directa o indirectamente, el cáncer se ha convertido en una experiencia casi universal de nuestra especie. Una enfermedad que es sinónimo de dolor, sufrimiento y desesperación.

Sólo a través del desarrollo de la Genética y gracias a los avances tecnológicos de finales del siglo XX e inicios del siglo XXI ha sido posible empezar a comprender que el cáncer consiste en la proliferación incontrolada de las células a causa de un fallo en la sofisticada maquinaria que regula todas y cada una de sus funciones. A través de este conocimiento vislumbramos por primera vez la posibilidad de desarrollar tratamientos eficaces que nos acerquen a una potencial curación.

Pero aún queda mucho por comprender y será necesario el esfuerzo combinado de investigadores, médicos, industrias farmacéuticas, fuerzas políticas y pacientes para finalizar con éxito una tarea tan formidable.

El trabajo de investigación que ha realizado Amaya Gascó para su tesis doctoral es una muestra de ese gran esfuerzo. Su objeto de estudio es el cáncer no microcítico de pulmón de estirpe escamosa, una de las manifestaciones más letales de esta enfermedad y de la que apenas existen conocimientos detallados sobre los mecanismos alterados que subyacen en su biología molecular.

Este trabajo analiza en profundidad el vínculo entre el catálogo de aberraciones genéticas detectadas en los tejidos tumorales y la evolución clínica de cada paciente con la esperanza de encontrar dianas terapéuticas que puedan ser tratadas con fármacos específicos.

Esta es la clase de investigación que nos acerca paso a paso a la victoria definitiva sobre el cáncer.

Santiago Viteri
Coordinador Clínico del Instituto Oncológico Dr. Rosell

1.- CÁNCER DE PULMÓN

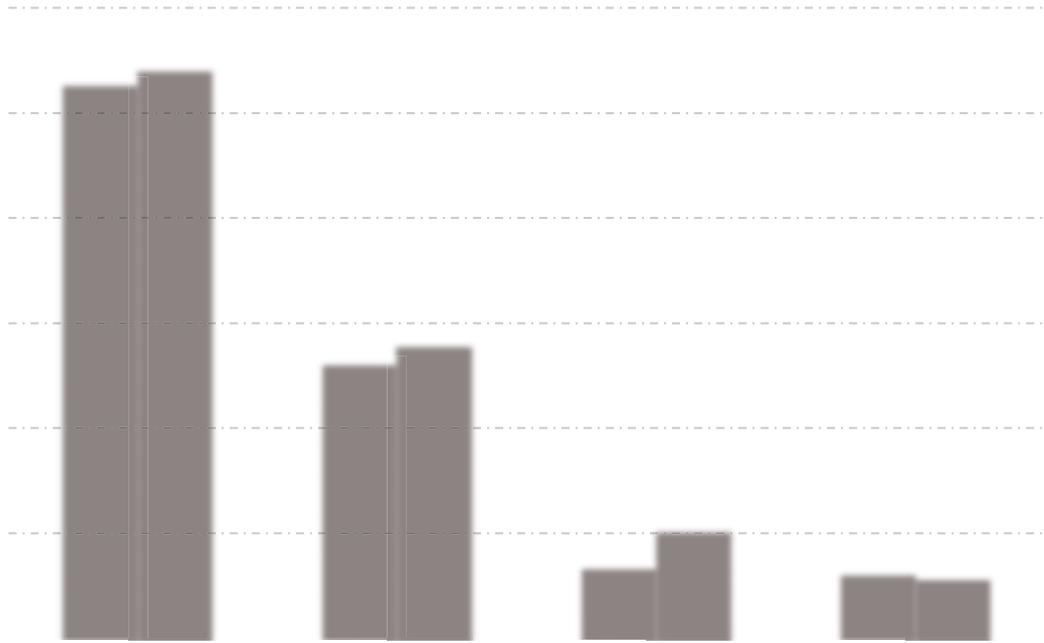
1.1.-INCIDENCIA

El cáncer de pulmón es el tumor más frecuente en el mundo y su incidencia continúa en aumento. Las tasas de incidencia varían de un país a otro y en España de una comunidad a otra. La estimación mundial en 2008 fue de 1.600.000 casos nuevos de este cáncer con 1.380.000 muertes (Jemal et al, 2011). Aproximadamente un 70% de las muertes por cáncer registradas en 2008 se produjeron en países de ingresos bajos y medios. En los varones representa el 16,6% de todos los tumores y en mujeres el 7,6% aproximadamente. Geográficamente la mayor incidencia de cáncer de pulmón se registra en Europa (sobre todo en el Este y en el Sur) y en Estados Unidos. Se prevé que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones en 2030.

En Estados Unidos la estimación en 2012 fue de 226.000 nuevos casos con una mortalidad de 160.000, siendo el cáncer de pulmón la causa más importante de muerte en hombres (Siegel et al, 2012).

En Europa se estimó, en 2008, una incidencia de 391.000 casos nuevos al año (12,2%); la principal causa de mortalidad por cáncer fue el de pulmón con 342.000 muertes (19,9%) (Ferlay et al, 2010).

En España la incidencia, comparado con otros países, se puede considerar alta, diagnosticándose al año 20.000 casos nuevos, 18,4% en hombres y 3,2% en mujeres (Figura 1 y 2) (Sánchez et al, 2010). En el año 2012 se registró un aumento de incidencia de cáncer de pulmón en las mujeres y una tendencia al descenso de la misma en los varones (Figura 1 y 2).

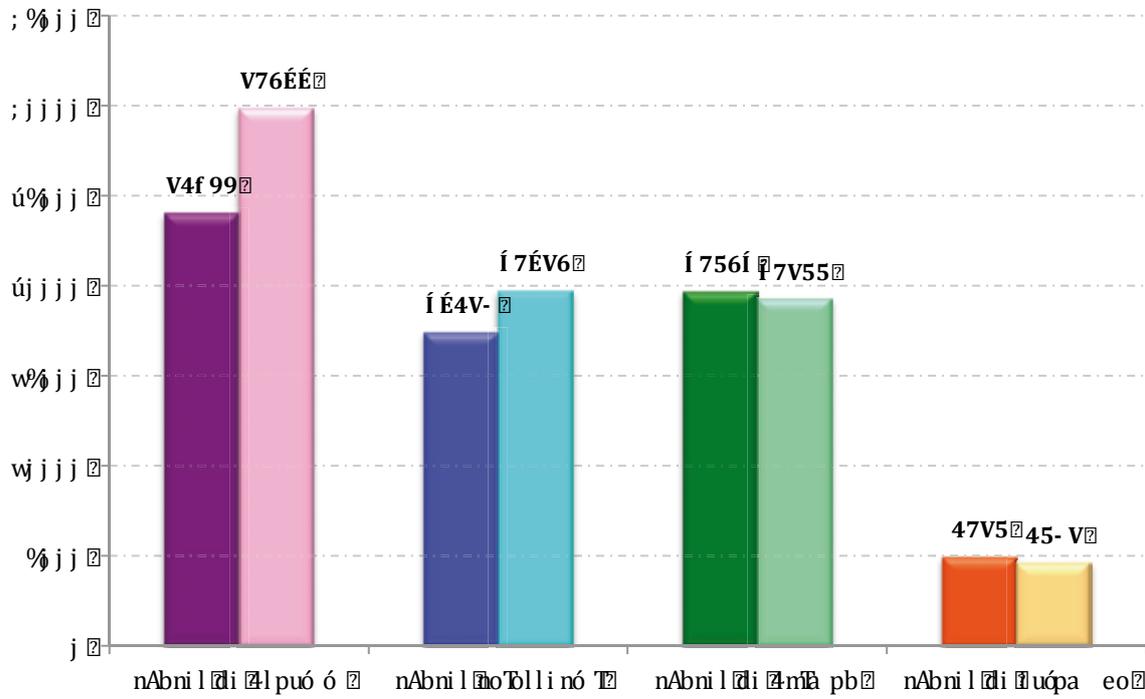


?

2022 r. 2022 d. 2022 G. 2022 A. 2022 y. 2022 m. 2022 DRDX

dDl n 2022 FM6 nv Áo er n ov erov nro FBnNer nFvDnMnvl ovr lrFó I F rtrpnoM Fro
 ó DA lr FBnl n nFnNnFVf f 5 EVf í V

?



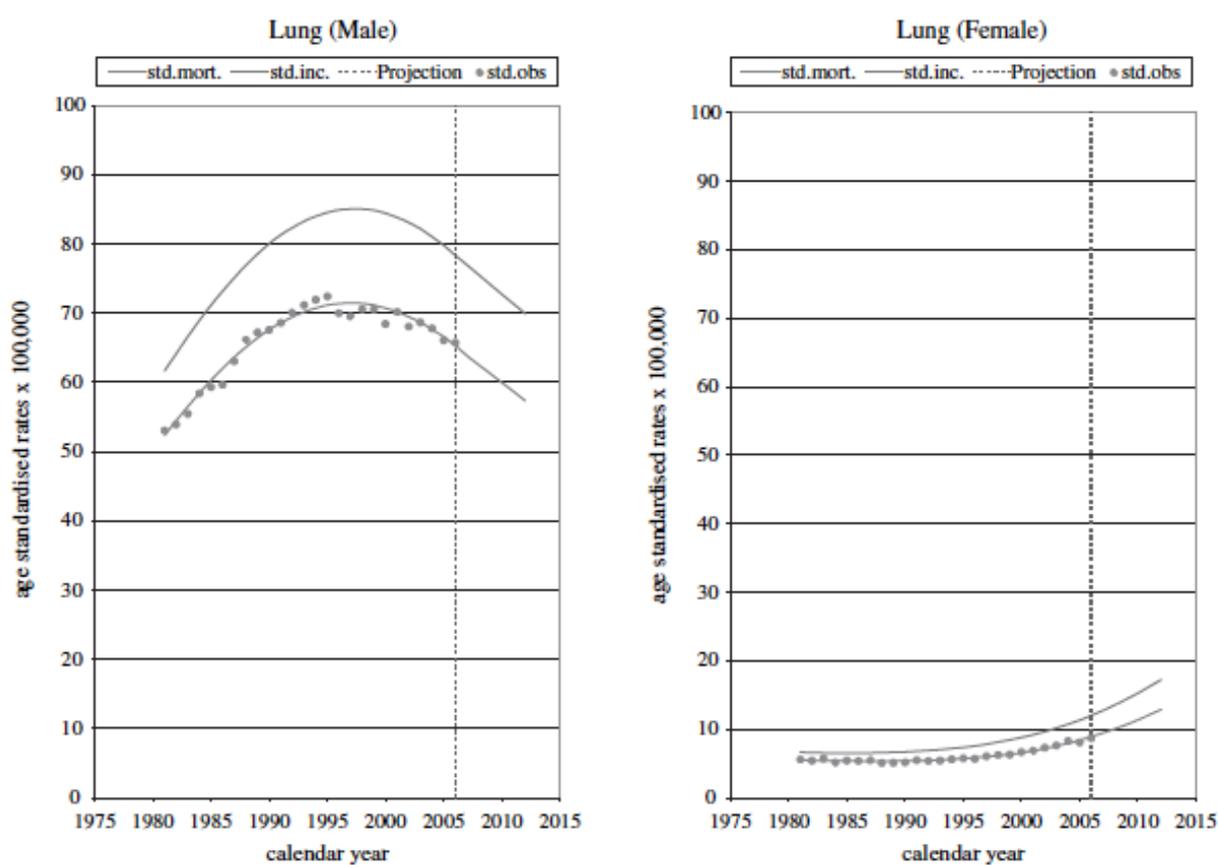
2022 r. 2022 d. 2022 G. 2022 A. 2022 y. 2022 m. 2022 DRDX

dDl n 2022 FM6 nv Áo er n ov erov nro FBnNer nFvDnMnvl ovr lrFó I F rtrpnoM Fro
 anó i lr FBnl n nFnNnFVf f 5 EVf í V

ú

?

La mortalidad está en torno a 16.000 casos al año en hombres y 6.000 en mujeres. En el sexo masculino, la incidencia y la mortalidad llegaron a su pico máximo en 1990 pero posteriormente las cifras fueron disminuyendo dado el descenso de consumo de tabaco. Sin embargo, cabe destacar que en mujeres sucede lo contrario y las cifras de mortalidad han ido aumentando en un 3,12% anual por el aumento de mujeres fumadoras (Figura 3) (Sánchez et al, 2010).



Sánchez et al (2010)

Figura 3.- Incidencia del cáncer de pulmón en España por sexo

1.2.- FACTORES DE RIESGO

El cáncer de pulmón se ha asociado a múltiples factores ambientales y estilos de vida, destacando el hábito tabáquico como el factor de riesgo más importante para desarrollar un cáncer de pulmón. A continuación se detallarán cada uno de estos factores de riesgo.

1.2.1.-Tabaco

Es el principal factor de riesgo para desarrollar un cáncer de pulmón (80-90% de todos los casos) (Alberg et al, 2003). El riesgo de padecer un cáncer de pulmón depende del número de cigarrillos fumados y de la duración del hábito tabáquico. En fumadores activos de 1 paquete al día durante 40 años, el riesgo es 20 veces superior comparado con una persona no fumadora. Asimismo el riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón en aquellas personas que cesan el hábito tabáquico, disminuirá gradualmente a lo largo de unos 15 años, pero este riesgo nunca se igualará y se mantendrá todavía superior al de un nunca fumador (Samet et al, 1991 y Newcomb et al, 1992). También se recomienda el cese del hábito tabáquico en pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón en estadios iniciales ya que se ha demostrado mayor beneficio en los tratamientos oncológicos, disminución de las comorbilidades, de las recurrencias y de los segundos tumores primarios (Parsons et al, 2010). Por otro lado, la reducción del número de cigarrillos fumados, sin el cese total, parece tener algún efecto positivo en la reducción del riesgo del desarrollo de cáncer de pulmón (Godtfredsen et al, 2005). Los no fumadores expuestos a altos niveles de tabaco (fumador pasivo) presentan un riesgo aumentado de padecer un cáncer de pulmón comparado con los que se han expuesto a niveles bajos (Janerich et al, 1990); este riesgo puede estar influido también por alteraciones genéticas debidas a la exposición tabáquica (Bennet et al, 1999).

La complejidad de la composición del tabaco (3000 compuestos químicos diferentes) ha dificultado la identificación concreta de diversos agentes carcinógenos, aunque más de 60 parecen ser potencialmente carcinógenos y unos 20 agentes han sido

confirmados como auténticos compuestos carcinógenos (Mahabir et al, 2007). Entre ellos podemos destacar los hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAHs) que son los más estudiados, siendo el benzo(a)pireno el primero en ser detectado en el tabaco y en estar implicado en las causas de mutación del gen *TP53* (Bell et al, 2005). Otros compuestos son las N-nitrosaminas que pueden inducir tumores de pulmón en ratones, las aminas aromáticas, los benzenos, el arsénico, y el acetaldehído.

El tabaco produce, sobre el tejido bronquial de pacientes fumadores con cáncer de pulmón, la formación de aductos de DNA que conduce a replicaciones erróneas de DNA y mutaciones. Los niveles de los aductos se correlacionan con la exposición tabáquica.

Como ya se ha explicado anteriormente, el tabaco es el responsable de casi el 90% de los casos de cáncer de pulmón, pero la mayoría de los fumadores crónicos no desarrollan cáncer, lo que sugiere que determinados pacientes presentan variaciones en la susceptibilidad genética, bien por polimorfismos (que es una variación en la secuencia de un lugar determinado del DNA entre los individuos de una población) durante la carcinogénesis o bien debidos a alteraciones durante la reparación de DNA u otras vías celulares.

1.2.2.-Polución ambiental

En países industrializados otros agentes contaminantes del ambiente han sido estudiados como posibles causas de cáncer de pulmón. Entre ellos destacan los hidrocarburos policíclicos, relacionados con el uso de combustibles fósiles que se emiten en centrales eléctricas, industrias, tubos de escape de motos y coches, etc. El ratio de las tasas de mortalidad por cáncer de pulmón ajustadas a la edad en zonas urbanas y rurales varía entre 1.1 y 2.0. Al existir una compleja mezcla de productos químicos que interactúan entre sí, así como la exposición activa o pasiva del tabaco, es complicado identificar el 'factor urbano' como una causa independiente de cáncer de pulmón. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que la exposición a la polución ambiental se asocia a disminución de la función respiratoria, mayores tasas de ingreso hospitalario por

patología respiratoria y aumento de las tasas de mortalidad por enfermedades cardiopulmonares (Pope et al, 1995). De forma particular, estudios recientes han demostrado asociación entre cáncer de pulmón y exposición al humo desprendido del tubo de escape de motores diesel (Olsson et al, 2011).

1.2.3.-Radón

Es un gas que proviene de la desintegración de uranio-238 y radio-226, con alta capacidad para dañar el epitelio de la vía respiratoria a partir de la emisión de partículas alfa. Un ejemplo a destacar son los mineros que trabajan expuestos a altas concentraciones de radón y tienen alto riesgo de cáncer de pulmón. También se ha observado un efecto sinérgico de la exposición al radón con hábito tabáquico (Grosche et al, 2006).

Es posible encontrar radón en las rocas, suelo e incluso en aguas subterráneas, sin embargo los resultados de los estudios que correlacionan la exposición de radón en los hogares y el cáncer de pulmón son contradictorios (Darby et al, 1998).

1.2.4.-Asbesto

La asociación entre la exposición a asbesto y cáncer de pulmón ha sido establecida a través de estudios epidemiológicos y en animales (Hughes et al, 1994). La exposición a asbestos puede dividirse en ocupacional (productos comerciales) y no ocupacional (edificios que contienen asbestos). Para la exposición ocupacional existen datos que confirman el elevado riesgo, no ocurre lo mismo en el caso de la exposición no ocupacional (Landrigan et al, 1998). Dicho riesgo depende de la dosis y del tipo de fibra de asbesto. En general, las neoplasias broncopulmonares inducidas por asbesto suelen aparecer en la periferia y en los lóbulos inferiores, acompañada de fibrosis pulmonar producida por la asbestosis (Hughes et al, 1994).

Por otro lado, el aumentado riesgo de sufrir cáncer de pulmón por asbesto, se magnifica con el hábito tabáquico. En un estudio se objetivó que el riesgo aumentaba 6 veces con la exposición a asbesto y sin exposición tabáquica, 11 veces con el tabaco pero

sin historia de exposición a asbesto y 59 veces con la asociación de ambos (Hammond et al, 1979).

Se han utilizado diferentes técnicas moleculares, morfológicas y bioquímicas, para documentar lo que ocurre en la célula. Una exposición prolongada a fibras de asbesto produce acumulación de macrófagos y células inflamatorias en el alveolo, lo que se acompaña de producción de radicales libres, peroxidación de membranas celulares y daño en el DNA. Asimismo, las fibras de asbesto que atraviesan el epitelio alveolar, son traslocadas a la pleura por los macrófagos, dando lugar al mesotelioma (Mossman et al, 1988).

1.2.5.-Factores dietéticos

Diversos estudios epidemiológicos han puesto en evidencia la influencia de excesos o deficiencias dietéticas sobre el desarrollo de cáncer de pulmón. La asociación más consistente es que el alto consumo de frutas y verduras frescas disminuye la incidencia de cáncer de pulmón entre fumadores, no fumadores o exfumadores para cualquier subtipo histológico (Miller et al, 2004).

Varios antioxidantes se han considerado como nutrientes potencialmente quimiopreventivos, especialmente los β -carotenos; sin embargo los datos no han sido concluyentes e incluso se ha observado aumento en la incidencia de cáncer de pulmón en personas expuestas (Nowak et al, 1994).

Por otro lado, los flavonoides (cítricos, cebollas, vino tinto, chocolate negro, etc.) y los vegetales crucíferos (col, brócoli, etc.) parecen tener un efecto protector, aunque los estudios son tan pequeños que los datos no son definitivos (Cutler et al, 2008; Brennan et al, 2005). También se ha investigado acerca de las vitaminas del grupo B pero sin resultados definitivos, por lo que se requieren más estudios (Johansson et al, 2010).

Un aumento de riesgo de cáncer de pulmón ha sido descrito en dietas ricas en colesterol y grasas saturadas (Shekelle et al 1992). No obstante, no se ha asociado el desarrollo de cáncer de pulmón a un elevado índice de masa corporal (Olson et al, 2002).

1.2.6.- Patología inflamatoria y benigna del pulmón

Se ha asociado un aumento de riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en pacientes con patología benigna pulmonar e inflamación crónica como historia de bronquitis crónica y procesos infecciosos tipo neumonía y tuberculosis. Esta relación se da en todas las histologías de cáncer de pulmón (adenocarcinoma, carcinoma escamoso y microcítico) y el riesgo es similar en fumadores, no fumadores y exfumadores (Brenner et al, 2012).

1.2.7.- Radioterapia

Antecedentes de tratamiento con radioterapia por otros tumores como en el cáncer de mama, puede aumentar el riesgo de sufrir un cáncer de pulmón (Kaufman et al, 2008).

1.2.8.- Interacciones genéticas y ambientales

Los factores ambientales y genéticos influyen en el riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón, sin embargo la fisiopatología de las interacciones ambientales y genéticas es compleja. Los genes que influyen en la susceptibilidad a sufrir un cáncer pueden ser alelos heterogéneos en un solo *locus* o bien la combinación de varios alelos en múltiples *loci*. Está claro que los tumores resultan de una secuencia compleja de mutaciones que pueden ser adquiridas a lo largo de la vida adulta y estar relacionados con exposiciones a carcinógenos ambientales.

Por otro lado el papel de los factores genéticos como propia causa de cáncer de pulmón no está claro y se requiere más investigación. Varios estudios sugieren que individuos con familiares de primer grado con cáncer de pulmón, tienen un riesgo más elevado de desarrollarlo también, independientemente de la edad, sexo y hábito tabáquico (Matakidou et al, 2005). Sin embargo, las bases moleculares de este riesgo familiar no están claramente identificadas ni definidas, aunque se cree que existe una interacción entre factores ambientales y genéticos.

Los avances en biología molecular están permitiendo identificar posibles polimorfismos que pueden influir en el desarrollo del cáncer de pulmón (Li et al, 2010).

1.3.- HISTOLOGÍA

A pesar del gran desarrollo y avances en las técnicas de diagnóstico y de biología molecular, la clasificación del cáncer de pulmón por subtipos histopatológicos sigue siendo la base fundamental para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de esta enfermedad. Asimismo el correcto diagnóstico histológico nos guiará en los estudios moleculares a realizar y por lo tanto en el tratamiento correcto y dirigido a las alteraciones genéticas encontradas.

La clasificación de tipos histológicos en cáncer de pulmón en vigencia hoy es la publicada por la OMS en el año 2004 (Tabla 1)(Travis et al, 2004). Sin embargo, en 2011, un panel multidisciplinar representado por la *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASCL), la *American Thoracic Society* (ATS) y la *European Respiratory Society* (ERS) propuso una revisión del sistema de clasificación (Tabla 2) (Travis et al, 2011) cuyos cambios afectaron principalmente a la diferenciación entre adenocarcinoma y carcinoma escamoso. Dichas recomendaciones se llevaron a cabo por varios motivos:

1. Nueva caracterización molecular de pacientes con adenocarcinoma de pulmón que requieren tratamientos dirigidos y específicos contra determinadas mutaciones (*EGFR, ALK*).
2. Necesidad de diferenciar adenocarcinoma de carcinoma escamoso, por la existencia de fármacos contraindicados en histología escamosa/epidermoide debido a una menor eficacia o a un aumento en la toxicidad de los mismos al ser empleados en este subtipo.
3. Presencia de anomalías radiográficas, como son las lesiones en vidrio deslustrado (subgrupo de adenocarcinomas) que presentan excelente pronóstico sólo con cirugía.

Tabla 2.- Clasificación propuesta por IASCL/ATS/ERS (2011)

No 2004 WHO counterpart: most are solid adenocarcinomas	Morphologic adenocarcinoma patterns not present (supported by special stains): Non-small cell carcinoma, favor adenocarcinoma
BAC (nonmucinous)	Adenocarcinoma with lepidic pattern (if pure, add note: an invasive component cannot be excluded)
BAC (mucinous)	Mucinous adenocarcinoma (describe patterns present)
Fetal	Adenocarcinoma with fetal pattern
Mucinous (colloid)	Adenocarcinoma with colloid pattern
Signet ring	Adenocarcinoma with (describe patterns present) and signet ring features
Clear cell	Adenocarcinoma with (describe patterns present) and clear cell features
Squamous Cell Carcinoma Papillary Clear cell Small cell Basaloid	Morphologic squamous cell patterns clearly present: Squamous cell carcinoma
No 2004 WHO counterpart	Morphologic squamous cell patterns not present (supported by special stains): Non-small cell carcinoma, favor squamous cell carcinoma
Small cell carcinoma	Small cell carcinoma
Large cell carcinoma	Non-small cell carcinoma, not otherwise specified (NOS)
LCNEC	Non-small cell carcinoma with NE morphology (positive NE marker): possible LCNEC
Large cell carcinoma with NE morphology	Non-small cell carcinoma with NE morphology (negative NE marker): see comment Comment: This is a non-small cell carcinoma in which LCNEC is suspected, but stains failed to show NE differentiation
Adenosquamous carcinoma	Morphologic squamous cell and adenocarcinoma patterns present: Non-small cell carcinoma, NOS (comment that glandular and squamous components are present) Comment: this could represent adenosquamous carcinoma
No counterpart in 2004 WHO classification	Morphologic squamous cell or adenocarcinoma patterns not present but immunostains favor separate glandular and adenocarcinoma component Non-small cell carcinoma, NOS (specify the results of the immunohistochemical stains and the interpretation) Comment: this could represent adenosquamous carcinoma
Sarcomatoid carcinoma	Poorly differentiated NSCLC with spindle or giant cell carcinoma (mention if adenocarcinoma or squamous carcinoma are present)

From Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. The new IASLC/ATS/ERS international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol* 2011;6:247.

region, which is an early event found in 78% of preinvasive bronchial lesions.³⁸ Followed by a series of other molecular events such as loss of heterozygosity at 9p21 (p16), 17p loss (hyperplasia), telomere activation, telomerase

reactivation, retinoic acid receptor (RAR) (mild dysplasia), p53 mutation, vascular endothelial growth factor overexpression (moderate dysplasia), p16 inactivation, Bcl-2 overexpression and cyclin D1 and E overexpression (CIS).³

1.3.1.- Lesiones preinvasivas

La carcinogénesis bronquial y bronquioloalveolar es un proceso secuencial que da lugar a un cúmulo de anormalidades genéticas y moleculares que ocasionan diversas alteraciones morfológicas del epitelio bronquial y bronquiolar. Estas alteraciones condicionan formación de lesiones preneoplásicas y posteriormente a las neoplasias. Los tres cambios pulmonares pre-neoplásicos son: la displasia escamosa bronquial y el carcinoma *in situ* (CIS), la hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) y el adenocarcinoma *in situ* (AIS) y por último, la hiperplasia difusa de células neuroendocrinas pulmonar (HDCNEP) (Lantuejoul et al, 2009).

La anatomopatología de estas lesiones en cáncer de pulmón ha adquirido interés en los últimos años, dada la importancia del diagnóstico precoz y su implicación en la potencial curación del paciente (Ishizumi et al, 2010).

1.3.1.1.- DISPLASIA ESCAMOSA Y CARCINOMA *IN SITU* (CIS)

Representan una continuidad de cambios en el epitelio de la vía aérea. Estos cambios incluyen la pérdida alélica de la región 3p, que es un evento precoz en el 78% de las lesiones preinvasivas bronquiales; seguido de otras alteraciones moleculares de diferentes tipos. La displasia escamosa puede ser leve, moderada o severa en función de la severidad de la atipia y del grosor anormal del epitelio bronquial. El CIS muestra un engrosamiento total del epitelio marcado por una importante atipia (Figura 4). Estas lesiones preceden al carcinoma escamoso infiltrante y al carcinoma basaloide.

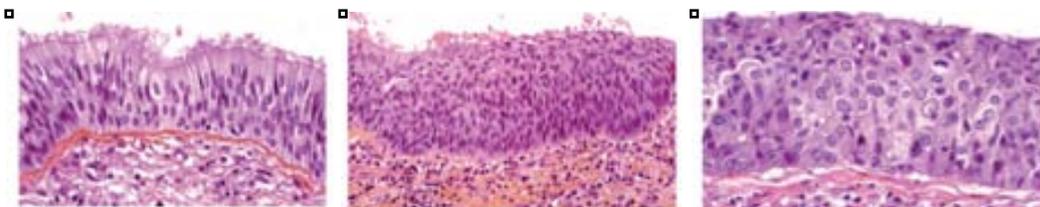


Figura 4.- Hiperplasia, displasia y carcinoma *in situ*

1.3.1.2.- HIPERPLASIA ADENOMATOSA ATÍPICA (HAA) Y ADENOCARCINOMA *IN SITU* (AIS)

HAA es una proliferación localizada de células con leve a moderada atipia que reviste los alveolos y a veces los bronquios respiratorios, con un tamaño menor de 5 mm de diámetro máximo, sin inflamación ni fibrosis y suele presentarse de forma múltiple. HAA es un precursor del adenocarcinoma de pulmón periférico (Figura 5). Suele ser hallazgo incidental en pulmones con carcinoma primario, especialmente en los adenocarcinomas (19% en mujeres y 9,3% en hombres con cáncer de pulmón; 30,2% en mujeres y 18,8% en hombres con adenocarcinoma). En autopsias se ha descrito en un 2-4% de los pulmones sin cáncer. Debe distinguirse de la hiperplasia reactiva secundaria a inflamación intersticial o a fibrosis, donde las células que recubren los alveolos no son hallazgo predominante y están distribuidas de forma más difusa. Puede ser difícil diferenciarlo del adenocarcinoma pulmonar *in situ*.

AIS ha sido añadida a HAA como nueva lesión preinvasiva para adenocarcinoma de pulmón en la nueva clasificación de IASLC/ATS/ERS. Se trata de una proliferación glandular de menos de 3 cm de crecimiento puramente lepidico pero sin invasión (Figura 5). Típicamente en la TC de tórax son lesiones tipo “*ground-glass*” si son células no mucinosas o nódulos sólidos si son mucinosas.

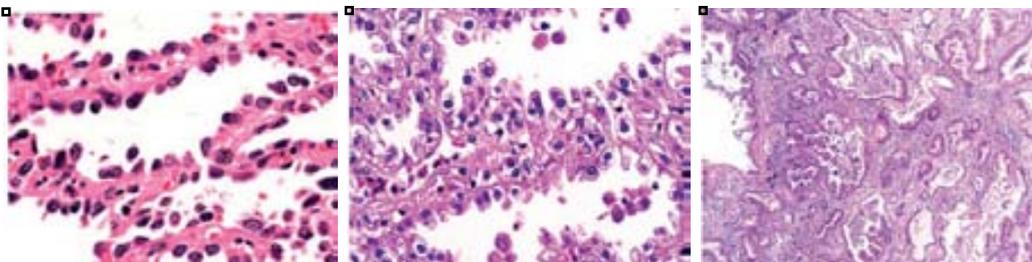


Figura 5.- HAA, AIS y ADC infiltrante

1.3.1.3.- HIPERPLASIA DIFUSA DE CÉLULAS NEUROENDOCRINAS PULMONAR (HDCNEP)

Se trata de una entidad poco frecuente. Es una proliferación de células neuroendocrinas de forma aislada, en pequeños nódulos o en forma de proliferaciones lineales. Cuando estas lesiones están más avanzadas (2-5 mm) se denominan “*tumorlets*” y cuando alcanzan los 5 mm se denominan carcinoides (Figura 6). Clínicamente la mitad de los pacientes pueden presentar obstrucción de la vía aérea causada por fibrosis bronquiolar. El resto presentan nódulos pulmonares incidentales, diagnosticados en el seguimiento de otra patología maligna. La HDCNEP idiopática debe diferenciarse de la hiperplasia de células neuroendocrinas, que acompaña a las enfermedades inflamatorias crónicas como las bronquiectasias y los abscesos pulmonares crónicos, ya que en estos casos no hay evolución a carcinoides.

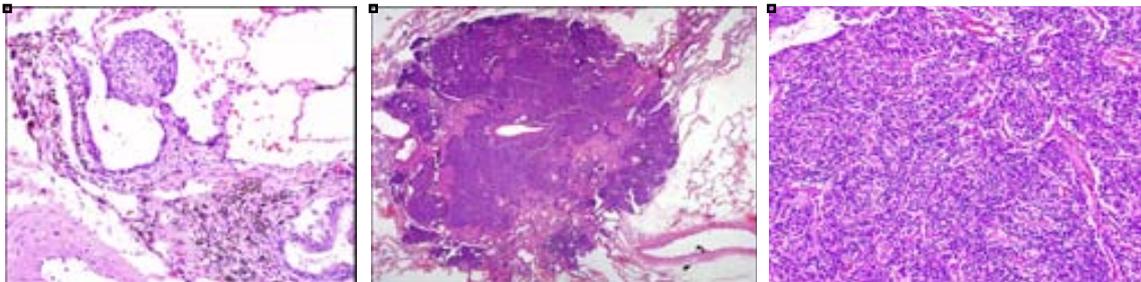


Figura 6.- HDCNEP, *tumorlet* y carcinoides típicos

1.3.2- Carcinoma escamoso

El carcinoma escamoso representa el 20% de todos los cánceres de pulmón en Estados Unidos. Históricamente las dos terceras partes eran tumores centrales, sin embargo estudios recientes confirman el aumento de carcinomas escamosos de localización periférica. Tiene una relación clara con la exposición tabáquica. Las características morfológicas típicas son la presencia de puentes intercelulares, la formación de perlas córneas y la queratinización (Figura 7) (Funai et al, 2003). En tumores bien diferenciados estas características son muy aparentes y el diagnóstico es

sencillo; sin embargo en tumores pobremente diferenciados son difíciles de observar, por ello, en estos casos, es necesario usar técnicas de tinción para poder identificarlos. En el carcinoma escamoso el patrón típico muestra una tinción negativa para TTF1 y p63 positiva. Generalmente el carcinoma escamoso se origina en el bronquio segmentario, por lo que la invasión lobar y del bronquio principal es por extensión. Puede clasificarse en diferentes subtipos: papilar, de células claras, basaloide o de células pequeñas, sin embargo esta clasificación debe revisarse ya que no define claramente las características de cada subtipo ni su correlación clínica, pronóstica y molecular.

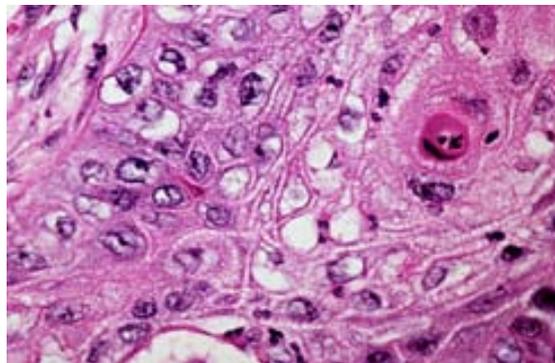


Figura 7.- Carcinoma escamoso de pulmón

1.3.3- Adenocarcinoma

Actualmente es el tipo histológico más frecuente, constituyendo casi el 50% de todos los casos. La mayoría son periféricos y se originan en el epitelio alveolar o en las glándulas mucosas bronquiales. El diagnóstico histológico requiere la evidencia de formaciones glandulares y/o presencia de mucina intracitoplasmática (Figura 8). El patrón de tinción de IHQ de un adenocarcinoma puro mostraría TTF1 positivo y p63 negativo. Es el tumor con menor relación con el tabaco y más frecuente en las mujeres no fumadoras. Generalmente tiene una diseminación ganglionar más temprana y metastatiza más rápidamente que los otros subtipos de cáncer no microcítico de pulmón. La nueva

clasificación de IASLC/ATS/ERS del 2011 recomienda múltiples cambios, tal y como se ha comentado previamente.

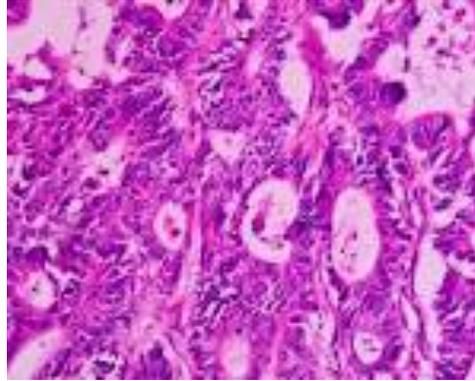


Figura 8.- Adenocarcinoma de pulmón

1.3.4- Carcinoma de células pequeñas

Representa el 14% de todos los cánceres de pulmón y en Estados Unidos se diagnostican más de 30.000 casos nuevos al año. La mayoría de los carcinomas microcíticos se presentan como una masa parahiliar, situándose a nivel peribronquial con infiltración de la submucosa bronquial y del tejido peribronquial. La obstrucción bronquial suele ocurrir por compresión circunferencial aunque raramente aparecen lesiones endobronquiales. La afectación ganglionar es común. Suele ser un tumor friable, blando y con extensa necrosis. Tras múltiples revisiones en la clasificación de los carcinomas de células pequeñas de pulmón, finalmente se divide en dos subtipos: el carcinoma microcítico de pulmón puro y el mixto (que combina microcítico con cualquier subtipo de célula grande de pulmón, aunque representa menos del 10% de los casos). Las células tumorales son pequeñas y redondas, con escaso citoplasma, cromatina nuclear fina y granular con ausencia de nucléolo. Generalmente hay mucha necrosis y el índice mitótico suele ser alto (Figura 9). Tras quimioterapia se han observado en rebiopsias adenocarcinomas, carcinomas escamosos y cánceres de células grandes entre un 15% y un 45% de los carcinomas de células pequeñas.

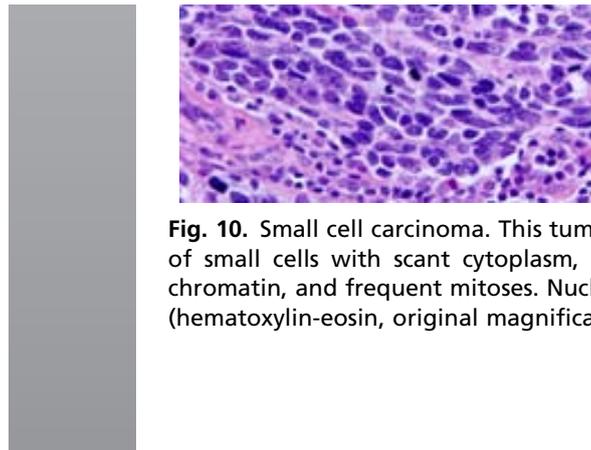


Fig. 10. Small cell carcinoma. This tumor consists of small cells with scant cytoplasm, hyperchromatic nuclei, and frequent mitoses. Nuclear molding is characteristic. (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 400$)

Figura 9.- Carcinoma de células pequeñas de pulmón

Este tumor tiene características clínicas diferentes, es más agresivo y suele diagnosticarse en estadio avanzado. Es el cáncer de pulmón más quimiosensible y el más asociado a síndromes paraneoplásicos (Krug et al, 2011).

En la Tabla 3 se exponen las diferencias microscópicas entre el carcinoma de célula pequeña y el de célula grande.

Tabla 3.- Diferencias microscópicas entre el cáncer de pulmón de células pequeñas y el de células grandes

HISTIOLOGIC FEATURE	Small Cell Carcinoma	LCNEC
Cell size	Smaller (less than diameter of 3 lymphocytes)	Larger
N/C ratio	Higher	Lower
Nuclear chromatin	Finely granular, uniform	Coarsely granular or vesicular Less uniform
Nucleoli	Absent or faint	Often (not always) present May be prominent or faint
Nuclear molding	Characteristic	Less prominent
Fusiform	Common	Uncommon
Polygonal with ample pink cytoplasm	Uncharacteristic	Characteristic
Nuclear smear	Frequent	Uncommon
Basophilic staining of vessels and stroma	Occasional	Rare

Data from Travis WD. Neuroendocrine lung tumors. Path Case Rev 2006;11:235–42; and Vollmer RT. The effect of immunohistochemistry on the pathologic diagnosis of small and large cell carcinomas of the lung. Cancer 1982;50:1380–3.

1.3.5- Carcinoma de células grandes

Representa el 3% de todos los cánceres de pulmón y se localizan en la periferia. Suelen ser grandes tumores necróticos. El diagnóstico de este subtipo histológico es por exclusión y debe realizarse en tumores resecados. Histológicamente se caracteriza por hojas y nidos de células poligonales con núcleo vesicular y prominente nucléolo (Figura 10) (Travis et al, 2004). Existen muchas variantes según la clasificación de la OMS del 2004: el carcinoma neuroendocrino de células grandes, el basaloide, el carcinoma linfoepitelial, el de células claras y el de células grandes con fenotipo rabdoide.

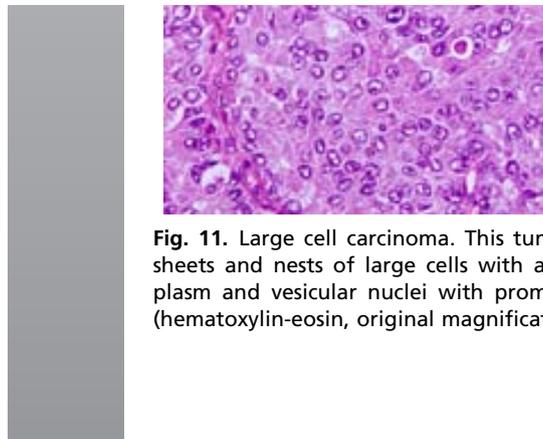


Fig. 11. Large cell carcinoma. This tum sheets and nests of large cells with at plasm and vesicular nuclei with promi (hematoxylin-eosin, original magnificati

Figura 10.- Carcinoma de células grandes de pulmón

1.3.6- Carcinoma adenoescamoso

Es diagnosticado entre el 0,6% y 2,3% de todos los cánceres de pulmón y se define como un carcinoma de pulmón que contiene al menos un 10% de carcinoma escamoso y de adenocarcinoma observado por el microscopio de campo claro y no reconocido exclusivamente por IHQ, siendo necesario una pieza tumoral resecada y no citología o pequeñas biopsias (Travis et al, 1999).

1.3.7- Carcinomas con elementos pleomórficos, sarcomatoides o sarcomatosos

Los carcinomas sarcomatoides constituyen el 0,3% de todos los tumores invasivos de pulmón. Este grupo de carcinomas son pobremente diferenciados y expresan un espectro pleomórfico, sarcomatoide y sarcomatoso. Los pleomórficos suelen ser tumores

grandes y periféricos con invasión de la pared torácica y mal pronóstico. Son muy heterogéneos y para ser diagnosticados se requiere observar al menos un 10% de células gigantes o fusiformes con presencia de adenocarcinoma o carcinoma escamoso (Figura 11) (Travis et al, 2004). Dentro de este grupo incluimos al carcinosarcoma (mezcla de carcinoma y sarcoma) y al blastoma pulmonar (compuesto por glándulas de adenocarcinoma fetal y componente primitivo sarcomatoso).

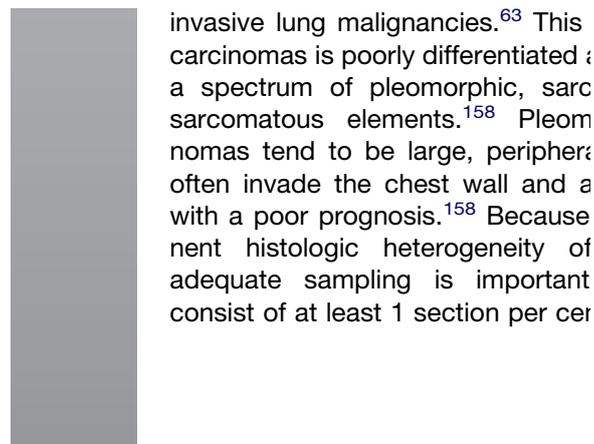


Figura 11.- Carcinoma pleomórfico de pulmón

1.3.8- Carcinoides típicos y atípicos

Los carcinoides representan el 1-2% de todos los cánceres de pulmón. El 50% de los pacientes suelen estar asintomáticos en el momento del diagnóstico (Krug et al, 2011). Tanto los típicos (Figura 12) como los atípicos (Figura 13) pueden ocurrir a cualquier edad aunque predominantemente entre los 45-55 años, sin predilección a nivel de sexo. Son los más comunes durante la infancia. Suelen ser centrales con componente endobronquial polipoideo. Cuando son sintomáticos pueden dar hemoptisis, neumonitis obstructiva, disnea y síndromes paraneoplásicos. El tratamiento de elección en este tipo de tumores es la cirugía. En la Tabla 4 se definen las características diferenciales de los carcinoides típicos y atípicos.

Characteristic	Percentage
Regional lymph node metastases at presentation (%)	5-15
Distant metastases at presentation (%)	Rare
Survival at 5 years (%)	90-95
Survival at 10 years (%)	90-95

Data from Colby TV, Koss MN, Travis WD. Tumors of the lower respiratory tract; Armed Forces Institute of Pathology, 1995 . p. 295; and Travis WD. Pathology of lung cancer. Clin Chest Med 2002;23:77.



different places in this class concepts of AIS and MIA have (3) comprehensive histologic subtypes recommended for evaluation of invasive carcinomas with classification by predominant subtype; (4) micropapillary carcinoma is introduced as a new subtype with a poor prognosis; (5) for tumors classified as mixed subtype with

Figura 12.- Carcinoide típico de pulmón

Figura 13.- Carcinoide atípico de pulmón

Tabla 4.- Características diferenciales entre carcinoide típico y atípico

Histologic or Clinical Feature	Typical Carcinoid	Atypical Carcinoid
Histologic patterns: organoid, trabecular, palisading and spindle cell	Characteristic	Characteristic
Mitoses	Absent or <2 per 2 mm ² area of viable tumor (10 high power fields on some microscopes)	2-10 per 2 mm ² or area of viable tumor (10 high power fields on some microscopes)
Necrosis	Absent	Characteristic, usually focal or punctate
Nuclear pleomorphism, hyperchromatism	Usually absent, not sufficient by itself for diagnosis of AC	Often present
Regional lymph node metastases at presentation (%)	5-15	40-48
Distant metastases at presentation (%)	Rare	20
Survival at 5 years (%)	90-95	50-60
Survival at 10 years (%)	90-95	35

Data from Colby TV, Koss MN, Travis WD. Tumors of the lower respiratory tract; Armed Forces Institute of Pathology, 1995 . p. 295; and Travis WD. Pathology of lung cancer. Clin Chest Med 2002;23:77.

1.4.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Los síntomas y signos del cáncer de pulmón dependen de la localización del tumor, la diseminación locorregional y la diseminación a distancia. Asimismo es el tipo de cáncer que más se asocia a síndromes paraneoplásicos. El hallazgo casual representa menos del 5% de todos los casos. La mayoría de los pacientes en fase sintomática presentan enfermedad avanzada (Tabla 5).

Tabla 5.- Síntomas de cáncer de pulmón al diagnóstico en 3.500 pacientes (Hyde et al, 1974; Chute et al, 1985)

Síntoma	%
Tos	45-74
Pérdida de peso	46-68
Disnea	37-58
Dolor torácico	27-49
Hemoptisis	27-29
Dolor óseo	20-21
Ronquera	8-18

1.4.1.- Manifestaciones locorregionales

1.4.1.1.- TOS

Es el síntoma más frecuente y suele estar presente al diagnóstico en el 50% de los pacientes. Suele estar relacionado con tumores centrales (por lo que suele ser más habitual en el carcinoma escamoso y en el carcinoma microcítico), neumonías obstructivas, afectación parenquimatosa en forma de nódulos pulmonares y derrame pleural (Patel et al, 1993).

El tratamiento de la tos suele ser más efectivo si se conoce la causa de la misma, así, en pacientes con tos crónica, la exacerbación de la misma o la aparición de otros síntomas que no mejoran con antibióticos, broncodilatadores o corticoides nos tienen que hacer sospechar la presencia de un tumor.

1.4.1.2.- HEMOPTISIS

La hemoptisis es descrita en el 25-50% de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón, aunque la causa más frecuente es la bronquitis (Hyde et al, 1974; Chute et al, 1985). En aquellos pacientes (sobre todo con historia de hábito tabáquico) con persistencia de la sintomatología y con radiografía simple normal, se aconseja completar estudio con citología de esputo, broncoscopia o TC torácica para descartar malignidad.

El manejo de la misma dependerá de la severidad. En general se recomienda hidratación y continuar con la terapia oncológica. En casos más severos se puede añadir antitusígenos y se recomienda colocación del paciente en decúbito supino sobre el hemitórax donde se encuentra la lesión. Hemoptisis masivas son muy poco frecuentes y el pronóstico suele ser infausto.

1.4.1.3.- DOLOR TORÁCICO

La molestia o dolor torácico es un síntoma común que suele aparecer en el 20% de los casos (Chute et al, 1985). Puede ocurrir en estadios precoces, incluso sin clara evidencia de infiltración pleurítica, de la pared torácica o del mediastino. No suele ser un síntoma de mal pronóstico y suele responder adecuadamente a analgesia (incluyendo opiáceos) y al tratamiento oncológico activo.

1.4.1.4.- DISNEA

Es la sensación subjetiva de falta de aire al respirar. Suele ocurrir en un 25% de los casos (Hyde et al, 1974; Chute et al, 1985). Puede aparecer por múltiples causas, incluyendo el propio tumor por sí mismo (atelectasia, colapso, neumonía, derrame pleural o pericárdico, fallo cardíaco, tromboembolismo pulmonar, etc.).

El manejo de la disnea requiere la adecuada identificación de la etiología. Suele ser un síntoma estresante tanto para la familia como para el paciente por lo que su tratamiento precoz es de suma importancia.

1.4.1.5.- DISFONÍA Y SIBILANCIAS

La disfonía suele ser persistente y generalmente es por afectación del nervio laríngeo recurrente con parálisis de la cuerda vocal izquierda (Chen et al, 2007). Cuando esto ocurre, el tumor suele ser irresecable. También puede aparecer disfonía tras la cirugía cuando se debe sacrificar el nervio laríngeo recurrente para realizar una resección completa del tumor.

Este síntoma debe mejorar si existe respuesta al tratamiento oncológico.

Las sibilancias (sonido silbante y chillón durante la respiración, que ocurre cuando el aire se desplaza a través de vías respiratorias estrechadas) aparecen cuando existe afectación de las vías aéreas, en especial a nivel del bronquio principal y deben ser distinguidas de las sibilancias del broncoespasmo.

1.4.1.6.- DISFAGIA

Es la dificultad para la deglución. Puede ocurrir por obstrucción esofágica por una gran masa adenopática mediastínica que lo comprima, aunque suele ser un síntoma poco frecuente. También puede aparecer por lesión en el nervio laríngeo recurrente y por la dificultad al tragar con el consiguiente riesgo de aspiración.

1.4.1.7.- DERRAME PLEURAL

El 15% de los pacientes presentan derrame pleural en el momento del diagnóstico. Suele ser maligno pero la mitad puede presentar al inicio citología negativa, por lo que realizar una tóracocentesis diagnóstica es necesario para la obtención suficiente de líquido pleural para estudio citológico. El diagnóstico diferencial incluye proceso infeccioso, atelectasia, fallo cardíaco, etc. Es de suma importancia catalogarlo ya que la presencia de derrame pleural maligno contraindica la cirugía y la radioterapia, considerando al paciente tributario de tratamiento paliativo.

La presencia de derrame pleural puede ocasionar disnea, tos y/o dolor torácico, sin embargo un 25% de los pacientes están asintomáticos (Chernow et al, 1977). Cuando es maligno es típicamente un líquido exudativo, seroso, serohemático o hemático. Su

manejo depende del contexto clínico del paciente y puede mejorar con tratamientos oncológicos activos (quimioterapia). Individuos con buen *performance status* (estado general) pueden beneficiarse de intervenciones invasivas como la vídeotoracoscopia con talcaje pleural (Kvale et al, 2003).

1.4.1.8.- DERRAME PERICÁRDICO

Puede aparecer en el 5-10% de los casos. Suele acompañarse de disnea y ortopnea inicial y posteriormente complicarse con síndrome ansioso, opresión torácica, ingurgitación yugular, hepatomegalia y taponamiento cardíaco. El derrame pericárdico mejorará con el tratamiento del tumor, a no ser que aparezca taponamiento cardíaco en el que la pericardiotomía o pericardiocentesis sería el tratamiento de elección.

El derrame pericárdico puede ser una complicación tardía de la radioterapia (asociada o no a la quimioterapia) y se debe descartar antes de diagnosticar a un paciente de recidiva.

1.4.1.9.- SÍNDROME DE VENA CAVA SUPERIOR

Se trata de la obstrucción directa de la vena cava superior provocando disnea y sensación de plenitud. Otros síntomas menos frecuentes son la tos, disfagia y dolor. En la exploración física destaca edema en esclavina (a nivel facial, de escote y de extremidades superiores) con dilatación venosa del cuello y aparición de circulación colateral (Figura 14).

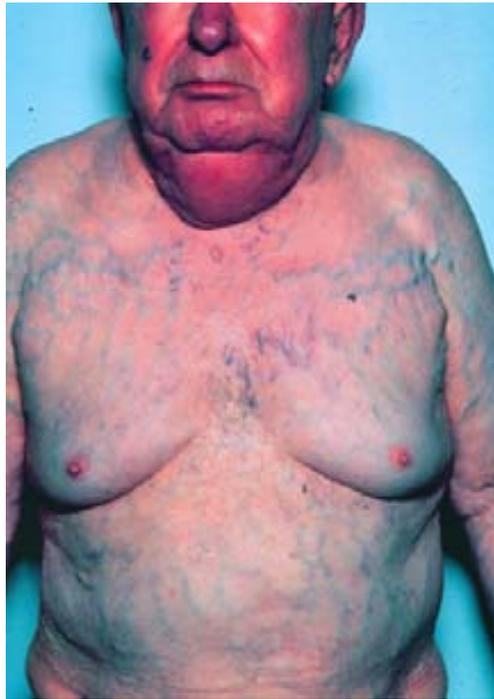


Figura 14.- Síndrome de vena cava superior

Este síndrome es más frecuente en carcinoma microcítico de pulmón que en el no microcítico. Puede ocurrir en el 2-4% de los casos (Salsali et al, 1969). El tratamiento consiste en corticoterapia, tratamiento depletivo, quimioterapia, radioterapia o colocación de prótesis vasculares.

1.4.1.10.- LINFANGITIS CARCINOMATOSA

Se caracteriza por disnea progresiva, tos, hipoxia e infiltrados parenquimatosos en las pruebas de imagen (Figura 15). También puede aparecer fiebre. Suele ser un diagnóstico difícil ya que los infiltrados parenquimatosos pueden corresponder a infecciones o a neumonitis post-radioterapia. A parte de la TC, la fibrobroncoscopia con lavado puede ayudarnos a establecer el diagnóstico correcto, así como la respuesta al tratamiento con corticoides.

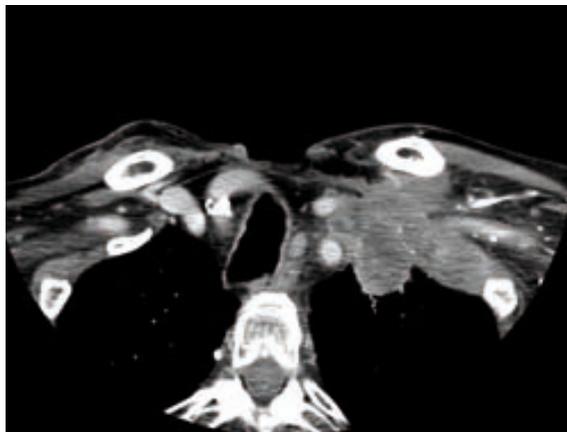


dDI n1 9x osnod MFBDt6 nonl vnl v om6 nMFnBnl

?

Í xÍ xÍ xÍ

m dlo li lo to bl on uob do b. ti Tli Tloa Í lo Rli T 4 li d lo Ann Am il. ol 4 ol T 4 li ui bn. di mb 6 ma ol b 7 A4 i 3 2 4 m a ob l Pmi 2 bt di T u 2 u d m6 ml u 2 d R ni b6 u 2 O 2. em 2 w x 2 i bil 7 a i b6 i 3. u6 2 bc T n. pb 2 R 2 di u d mn. pb 2 di T 4 l. a il 2 R 2 ui embd nou6 T u 2 i 2. bn T no 2 T embou 2 4 ni b6 u 2 4 mi di b 2 di u l lo T l 2 noa 4 li u. pb 2 a i d m l 2 4 ol 2 nob6 e. l. d d 2 m i di 2 noa 4 f lu i 2 di 2 mb 2 2 7 d lo a i 2 di 2 2 ol bil 2 0 6 i n6 n. pb 2 di T 2 bilt. o 2 ua 4 A6 no 2 nob 2 a . ou. u 2 4 6 u. u 2 4 T a í l T 2 i boc6 T a ou 2 R 2 b1. dl ou. u 2 mb. T 6 í l T 2 4 T 3 o 4 6 7 2 Í l Pm T 2 d oc 2 a munn l 2 li T u 2 3 d i a. d di u 2 Am il. oli u 2 R li T 2 a bo 2 u 2 7 noa o 2 l. u d oc 2 di T li c f 2 2 a 4 A6 no 2



dDI n1 5x D6 ml 2 r novmFMnl

ú' ?

Ed ó a .i bó di di uá du dloa i di 4i bdi di di uó d.o di Edma ol Ednd.i bdo
 noa í.b l obo T n.l me 7 Y T di d.oál 4. RUo T Pma .oál 4. xp di bil Ta i bá duob
 4 nibá u b bu Pmi T h ob d o Ti T o T l m i T u i l a Au d. c n T i P m l .i b d o b o b o b 4 . A n i o u
 u b o a í . é b o n n p b di h ó á l i u 4 . d m l T u b b d d m l T u p

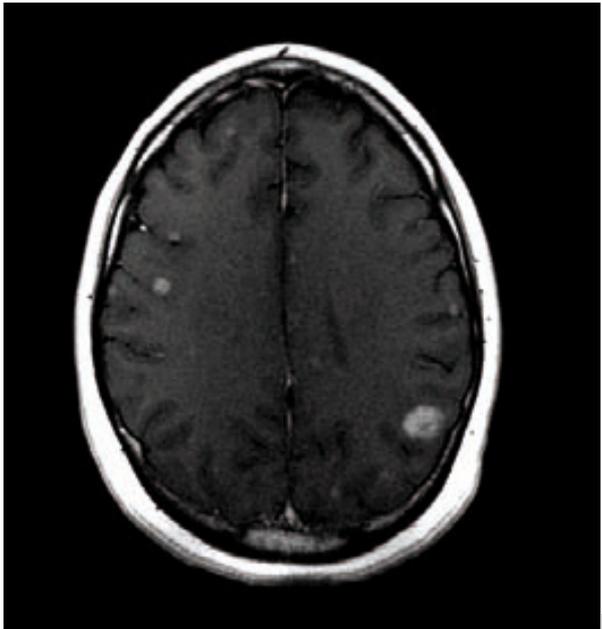
2

Í x v x no s r F M v n o r F r P M n M l i v v n F

Ed nAbni l di 4 m a p b 4 m i di di 3 á b d i l u i 2 2 n m T p m i l 4 l á di T n m i l 4 o p
 nobá b m n p b di di u n l . í i b b u e l i u a A u d i n m i b á u d i a i ó A u ó u u d u ó b n . p 2

Í x v x x x x x x x x x

Ed nAbni l di 4 m a p b u T h m u a A u d i n m i b á di a i ó A u ó u u h i l í l T u d i l n 1 m ó
 i ó T v k b k x p b 4 n i b á u h o b h l n . b o a a . n l o n o n o T d i n m i b n . u u T o Y b d i T i j ñ j <
 di b u 4 n i b á u 4 l i u i b o b a i ó A u ó u u h i l í l T u d T d . e b p u á n o 2 0 2 . e m l w x p b á i b u
 4 n i b á u h o b h n l n . b o a b o b a . n l o n o n o Y T d i n m i b n . di u a A u T b b 4 n i b á u h o b
 d i b o n l n . b o a P m i h o b h l n . b o a i u n a o u o p T i . i u e o m a i b ó h o b T o a f o d i T a o l
 4 m a o b l R T 4 l i u i b n . di d i n ó n p b e b e T o b l o m b o a d l i ó T i j j ' x p



Ed d D l n í É x r M F M F F r l r i l n t r F b m 2 2 v l n o r n t

La clínica de las metástasis cerebrales es variable y depende de la localización de la lesión así como de la cantidad de edema y/o hemorragia asociada. Los pacientes pueden presentar cefalea, náuseas/vómitos, confusión, ataxia, alteraciones visuales, convulsiones, déficits de pares craneales o debilidad motora.

La RM craneal es la prueba diagnóstica de elección para identificar metástasis cerebrales y es claramente más sensible que la TC craneal.

El tratamiento inicial es la corticoterapia oral o endovenosa en función de la edad, del estado general y sintomatología del paciente. El manejo posterior dependerá del número, tamaño y localización de las lesiones, así como de la enfermedad extracraneal y estado general del paciente.

Otra afectación neurológica es la carcinomatosis meníngea, también diagnosticada por RM. Puede manifestarse como parálisis de los nervios craneales y su pronóstico es nefasto (Kesari et al, 2003).

1.4.2.2.- HUESO

El cáncer de pulmón tiene la capacidad de metastatizar a todos los huesos, aunque afecta principalmente al esqueleto axial y a la zona proximal de los huesos largos. Son más frecuentes las lesiones osteolíticas que las osteoblásticas. Generalmente las metástasis óseas de los tumores pulmonares son sintomáticas y el 25% de los casos pueden presentarse con dolor óseo. Asimismo son más frecuentes en el carcinoma microcítico. Cuando hay importante afectación ósea puede observarse hipercalcemia y elevación de la fosfatasa alcalina en la analítica.

El diagnóstico se realiza mediante GGO y por PET asociada a TC (PET-TC) (Figura 18 y 19). Esta última técnica presenta mayor sensibilidad para detectar las metástasis de cáncer de pulmón de cualquier localización (Cheran et al, 2004).



Figura 18.- Metástasis óseas en GGO

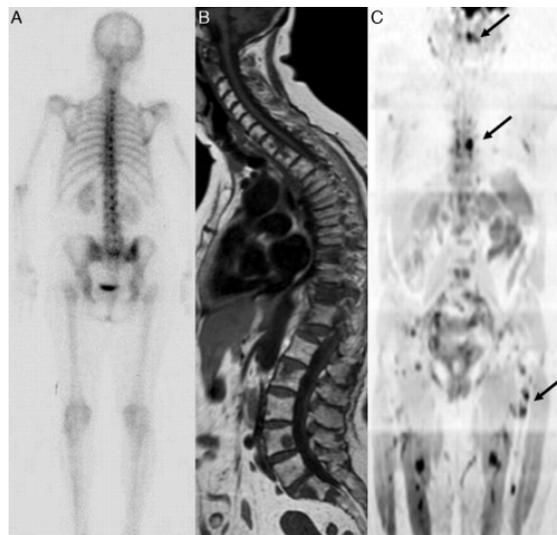


Figura 19.-Metástasis óseas en PET y RM

El dolor óseo responde a los AINES y se suele añadir tratamiento opioide cuando empeora. Asimismo se administran bifosfonatos como el ácido zoledrónico o el anticuerpo monoclonal dirigido contra el ligando RANK, denosumab, que disminuyen los eventos/complicaciones relacionados con las lesiones óseas (Bloomfield et al, 1998; Henry et al, 2011).

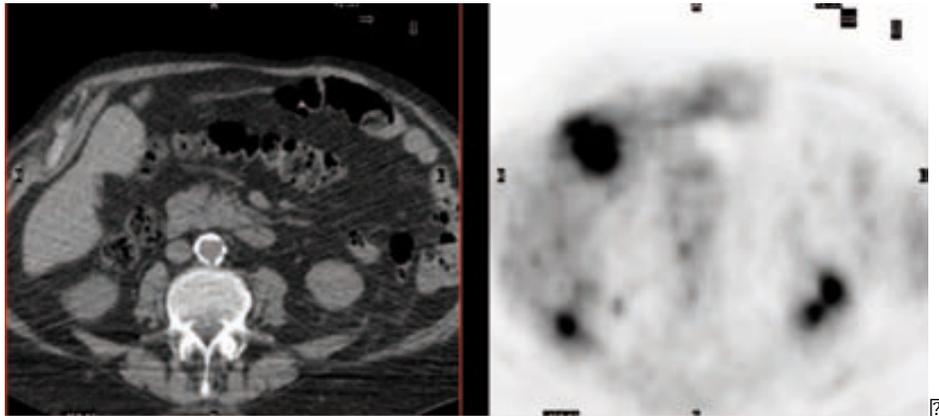
1.4.2.3.- HÍGADO, ADRENAL Y ADENOPATÍAS ABDOMINALES

La afectación hepática es bastante común en los pacientes con cáncer de pulmón. Cuando las metástasis hepáticas son asintomáticas pueden detectarse por alteración de las enzimas hepáticas en la analítica y diagnosticarse por TC o PET (o PET-TC) (Figura 20).

m bdo uob u. bóa Aón u24mi di b2h mu l2c óe Y4éld.d 2di 24i uoYa oT uó 2 Í doa .b T2
bAmi uR2pa .óu2 24i ui bn. 2i 2c nó n.pb2i 4Aón 2a 4Tn 2i ol 2lobpuóno2

2 u2AbdmT u2dlib Tu2ob2b2The l2i ni bú 2i 2i óAuó u2R2ibil 2i bía 2ob2
ubóa Aón u2 2c nó n.pb2um4l lib 2R2e beTob l2i 2o4il.óbi Tu Í doa .b 2uni T2
oÍ ui lt l ui 2i b2T 22222di 2i uó d.cn n.pb24ilo2nm bdo2uob2a u u2toTna .bou u24mi di b2
on uob l2oBl 22.em 2iwx2

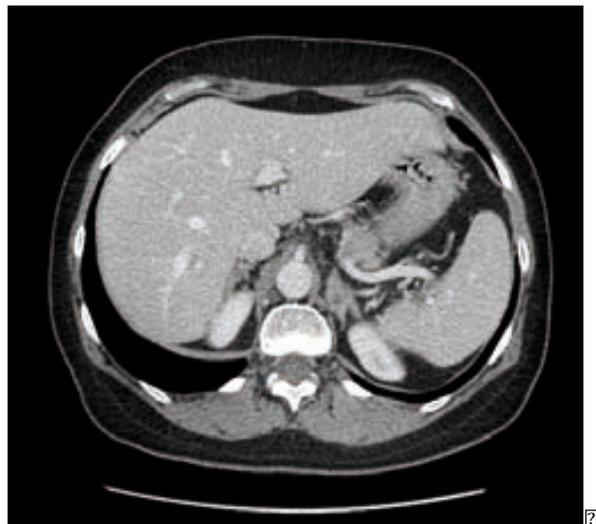
?



2 dDi n2Vf 22 rMFMF F2rBI Mv2Fro 22222222

?

?



2 dDi n2VÍ 22 rMFMF F2DBl nl l ront2ro 2222

?

?

; j 2

?

1.4.3.- Síndromes paraneoplásicos

Se definen como un conjunto de síntomas que se producen por sustancias proteicas segregadas por el tumor. Se tratan de efectos remotos del tumor primario, no relacionados con la invasión directa o a distancia, que pueden ocasionar disfunción orgánica (Hall et al, 1974). Diferentes síndromes paraneoplásicos son clínicamente aparentes en el 20-30% de los pacientes con cáncer de pulmón. Son más frecuentes en el CPCP, sin embargo nos centraremos en el CPCNP.

1.4.3.1.- CAQUEXIA

El síndrome de caquexia se caracteriza por anorexia, pérdida de peso y debilidad con el consecuente empeoramiento del estado general (Nathanson et al, 1997). Es muy frecuente en pacientes con cáncer de pulmón pero mucho más si se trata de enfermedad avanzada, lo que implica peor estado general, calidad de vida y pronóstico.

Este síndrome es multifactorial y en él se ven implicadas diversas citoquinas, factores tumorales y hormonas. Asimismo el metabolismo de estos pacientes puede estar alterado produciendo malabsorción de nutrientes y desnutrición proteico-calórica.

El manejo de este síndrome es complicado y requiere un cuidado integral del paciente que implica el tratamiento específico de diferentes síntomas como boca seca, mucositis, estreñimiento, dolor, etc, así como un soporte nutricional adecuado vía enteral o parenteral.

1.4.3.2.- HIPERCALCEMIA

La hipercalcemia es un problema metabólico bastante frecuente en patología maligna. Puede ocurrir por la presencia de metástasis óseas de tipo osteolítico o por factores humorales y citoquinas segregadas por el tumor como la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), el factor de necrosis tumoral, la interleuquina-1, las prostaglandinas, el factor de crecimiento alfa y la linfoxina (Mundy et al, 1989). Patologías benignas como el hiperparatiroidismo primario puede ser el responsable de la hipercalcemia en pacientes oncológicos. El carcinoma escamoso de pulmón es la histología

que presenta con mayor frecuencia este síndrome paraneoplásico, generalmente en enfermedad avanzada/metastásica (Coggeshall et al, 1986). Ocurre menos frecuentemente en CPCP.

La clínica asociada a la hipercalcemia puede variar en función de los niveles de calcio y de su rapidez de instauración. Los síntomas más precoces suelen ser náuseas, vómitos, letargia, fatiga, anorexia, estreñimiento, debilidad muscular, prurito, poliuria y polidipsia. Al ser síntomas tan inespecíficos, que pueden ser producidos por la propia enfermedad o por los mismos tratamientos, la hipercalcemia puede no ser detectada ni tratada dando lugar a una severa deshidratación, fallo renal progresivo, empeoramiento de la clínica neurológica con confusión, obnubilación, convulsiones, psicosis e incluso coma. Los síntomas gastrointestinales pueden también empeorar dando lugar a estreñimiento severo. Asimismo pueden aparecer cambios electrocardiográficos como alargamiento del intervalo PR, acortamiento del QT y amplias ondas T, dando lugar a bradicardia y arritmias auriculares o ventriculares. Bajo *performance status*, edad avanzada y alteración de la función hepática y/o renal preexistente, puede empeorar los síntomas ya producidos por la hipercalcemia.

Pacientes con niveles de calcio sérico superiores a 13 mg/dl o que presenten síntomas relacionados con hipercalcemia, suelen requerir tratamiento que incluye hidratación, inhibición de la reabsorción ósea y/o promover la excreción de calcio (tratamiento depletivo con furosemida, bifosfonatos, etc.), así como el tratamiento de la enfermedad oncológica de base.

1.4.3.3.- SIADH

El SIADH es muy frecuente en el CPCP (en un 10% de los casos) y produce hiponatremia (Hansen et al, 2010).

La severidad de los síntomas dependerá del grado de hiponatremia y de la velocidad de descenso del sodio en el suero. La clínica consiste en anorexia, náuseas y vómitos. Cuando la bajada de sodio en suero es muy rápida puede aparecer edema

cerebral que da lugar a irritabilidad, inquietud, cambios de personalidad, convulsiones, confusión e incluso coma y paro respiratorio.

El tratamiento de este síndrome se centra en el tratamiento del tumor; en el caso del CPCP, la hiponatremia se puede resolver a las pocas semanas de haber iniciado la quimioterapia. Asimismo se deberá realizar restricción hídrica, administrar antagonistas del receptor de la vasopresina y sueros hipertónicos si se trata de una hiponatremia aguda (Ellison et al, 2007).

1.4.3.4.- SÍNDROME DE CUSHING

Se trata de la producción ectópica de ACTH. Los pacientes suelen presentar debilidad muscular, pérdida de peso, hipertensión, hirsutismo, osteoporosis y alcalosis hipocaliémica con hiperglicemia. Este síndrome es muy frecuente en el CPCP y en los tumores carcinoides de pulmón. Cuando está presente empeora el pronóstico de la enfermedad de base. Su tratamiento consiste en la enfermedad de base.

1.4.3.5.- SÍNDROMES NEUROLÓGICOS

Los síndromes paraneoplásicos neurológicos son poco frecuentes, afectando a menos del 1% de la población oncológica. El cáncer de pulmón es el cáncer mayormente asociado a estos síndromes, en especial el CPCP. Estos síndromes son consecuencia de una reacción autoinmune; se han identificado diversos autoanticuerpos para los diferentes síndromes y tumores (Dalmau et al, 1997).

Es posible clasificar estos síndromes en síndrome miasténico de Eaton-Lambert (es el más frecuente, afectando al 3% de los carcinomas microcíticos de pulmón y puede preceder al diagnóstico de cáncer en meses o años en el 80% de los casos), ataxia cerebelosa, neuropatía sensorial, encefalitis límbica, encefalomielitis, neuropatía autonómica, retinopatía y opsomieloclonía.

El tratamiento de estos síndromes consiste en el tratamiento de la enfermedad oncológica de base y en la administración de terapia inmunosupresora.

1.4.3.6.- MANIFESTACIONES HEMATOLÓGICAS

La anemia es un problema común en los pacientes oncológicos y puede tener multitud de causas como el sangrado, el propio tratamiento, déficit nutricional o afectación de la médula ósea. Aquellas anemias sin causa aparente deben ser denominadas paraneoplásicas. Generalmente es una anemia normocrómica o ligeramente hipocrómica, con niveles de ferritina normales o elevados y el número de reticulocitos bajo.

La leucocitosis se observa en algunos pacientes relacionada con los efectos de la IL-1 o de los factores estimuladores de colonias granulocíticas. Se asocia a mal pronóstico. La leucopenia es poco frecuente. La presencia de eosinofilia es rara pero se ha descrito en cáncer de pulmón de célula grande.

La presencia de trombocitosis en cáncer de pulmón es frecuente y ha sido identificada como un factor predictivo independiente de peor supervivencia.

Asimismo, se han asociado diversas alteraciones de hipercoagulabilidad al cáncer de pulmón como el síndrome de Trousseau (tromboflebitis superficial migratoria), trombosis venosas profundas de extremidades inferiores, tromboembolismos pulmonares, microangiopatías, coagulopatía intravascular diseminada y la endocarditis trombótica abacteriana. A parte de las terapias anticoagulantes, el tratamiento de elección es el tratamiento del propio cáncer.

1.4.3.7.- MANIFESTACIONES CUTÁNEAS

Se han descrito gran variedad de síndromes cutáneos asociados al cáncer aunque todos son muy inespecíficos. El síndrome paraneoplásico cutáneo más frecuentemente asociado al cáncer de pulmón es la dermatomiositis que se acompaña de debilidad muscular. Las lesiones cutáneas son eritematosas en tronco y extremidades, violáceas en la zona parpebral y exfoliativa en los nudillos. Puede preceder al diagnóstico de la neoplasia, aparecer concomitantemente o años después (Dalakas et al, 2001).

1.4.3.8.- OSTEOARTROPATÍA HIPERTRÓFICA PULMONAR

Es un síndrome osteoarticular que se caracteriza por crecimiento y engrosamiento anormal de los huesos y las articulaciones (Martinez-Lavin et al, 1993). Se asocia más frecuentemente a los adenocarcinomas y carcinomas de células grandes. Se desconoce su origen, al parecer puede ser producido por un mecanismo humoral que implica a la hormona de crecimiento.

Clínicamente se caracteriza por una artropatía dolorosa y simétrica que engloba tobillos, rodillas, carpos y codos, así como los metacarpos, metatarsos y las falanges.

El diagnóstico se realiza con radiografía simple de huesos largos que muestra elevación del periostio. La GGO y el PET presentan captación difusa a lo largo del hueso y puede observarse más precozmente que con la radiografía simple.

El tratamiento implica la utilización de AINES y bifosfonatos, además del tratamiento de la enfermedad de base.

1.5.- TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS

Para el diagnóstico definitivo de un paciente con sospecha de cáncer de pulmón se requiere completar la historia clínica, realizar la exploración física, analítica de sangre, pruebas funcionales respiratorias, identificación de la histología con sus correspondientes estudios moleculares y la realización de exploraciones complementarias para determinar la extensión (estadificación) de la enfermedad y así tener el diagnóstico definitivo para poder determinar el pronóstico y tratamiento más adecuado.

1.5.1.- Técnicas de imagen

1.5.1.1.- RADIOGRAFÍA SIMPLE DE TÓRAX

La radiografía simple de tórax (Figura 22) no es suficiente para la estadificación del cáncer de pulmón ya que no puede determinar minuciosamente la afectación ganglionar o la invasión del mediastino y/o de la pared torácica. Sin embargo es una

2

2

2

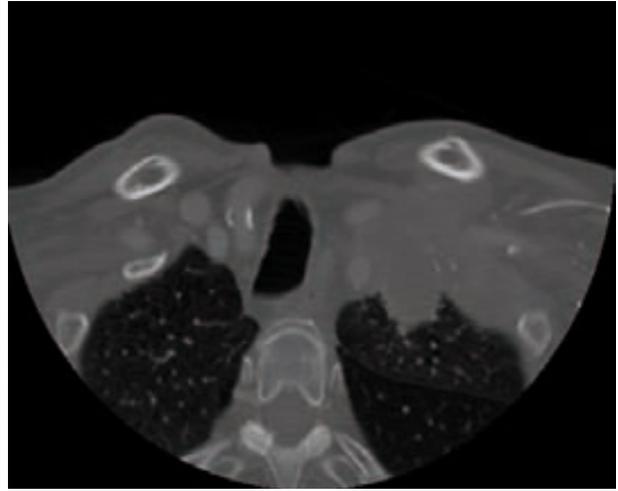
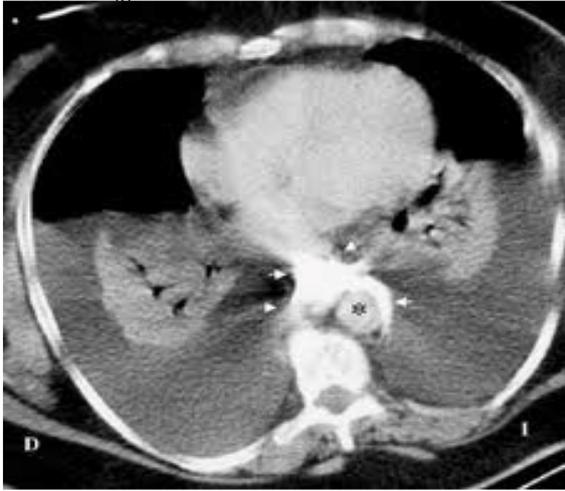


Fig. 1. Axial CT scan of the chest showing a large, well-defined, enhancing mass in the right lung base, indicated by a white asterisk (*).

Fig. 2. Axial CT scan of the chest showing a large, well-defined, enhancing mass in the right lung base, indicated by a white asterisk (*).

2

Fig. 3. Axial CT scan of the chest showing a large, well-defined, enhancing mass in the right lung base, indicated by a white asterisk (*). The mass is well-circumscribed and shows homogeneous enhancement. The surrounding lung parenchyma appears normal. The mediastinum and hilar regions are unremarkable. The pleural spaces are clear. The bony structures are intact.

2

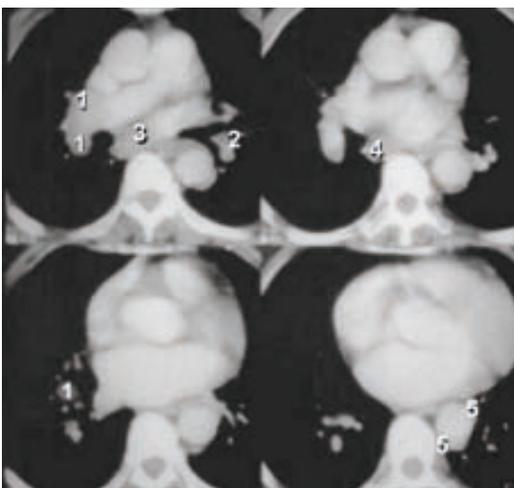
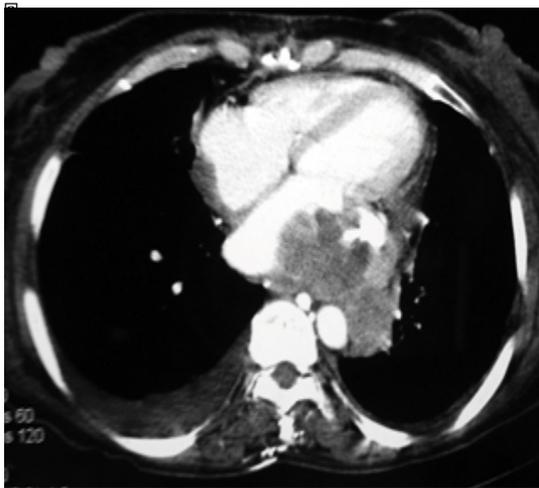


Fig. 4. Axial CT scan of the chest showing a large, well-defined, enhancing mass in the right lung base, indicated by a white asterisk (*).

Fig. 5. Axial CT scan of the chest showing a large, well-defined, enhancing mass in the right lung base, indicated by a white asterisk (*).

2

Fig. 6. Axial CT scan of the chest showing a large, well-defined, enhancing mass in the right lung base, indicated by a white asterisk (*). The mass is well-circumscribed and shows homogeneous enhancement. The surrounding lung parenchyma appears normal. The mediastinum and hilar regions are unremarkable. The pleural spaces are clear. The bony structures are intact.

; ' 2

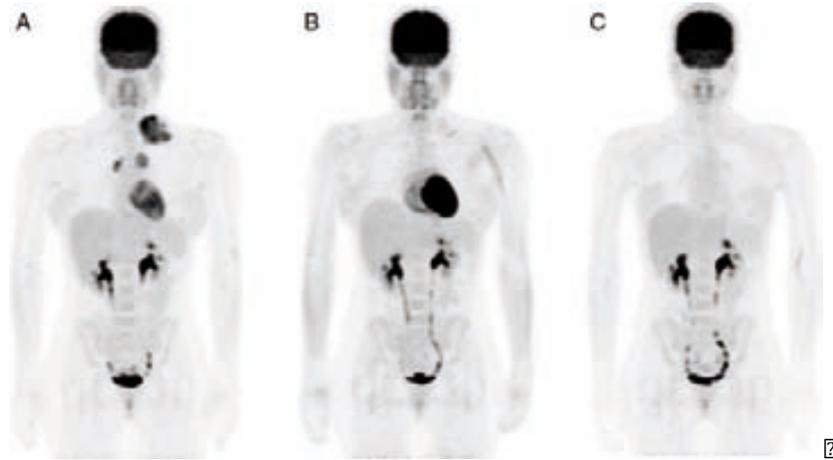
2

detectar metástasis a distancia tanto a nivel supra como diafragmático y a nivel craneal si realizamos una TC craneal.

1.5.1.3.- PET

Es la única prueba que aporta información funcional, es decir, distingue las estructuras basándose en la actividad metabólica. Para ello se administra por vía endovenosa un radiofármaco, existen varios pero el más importante es el Flúor-18 que es capaz de unirse a la 2-O-trifluorometilsulfonil manosa para obtener el trazador Fluorodesoxiglucosa (18FDG). De esta manera es posible identificar, localizar y cuantificar, a través de unas unidades denominadas SUV, el consumo de glucosa. En el caso del cáncer se usa 18FDG porque el metabolismo celular es anaerobio e incrementa la expresión de las moléculas transportadoras de glucosa (de la GLUT-1 a la GLUT-9), así el 18FDG es captado por las células malignas pero no se puede metabolizar y gracias a este "atrapamiento metabólico" se obtienen las imágenes que pueden ser axiales, coronales y sagitales. El 18FDG es metabolizado y excretado por la orina.

El PET no nos aporta suficiente información para poder clasificar el tumor en T1a, T1b, T2a, T2b, T3 o T4; sin embargo puede distinguir lesiones malignas de benignas (en función de la captación) de forma más precisa que la TC (Vansteenkiste et al, 2006). Asimismo el PET aporta mayor sensibilidad y especificidad en la detección de patología ganglionar (Figura 27). Tiene un buen valor predictivo negativo pero pobre valor predictivo positivo, lo que significa que resultados falsos positivos son comunes y se puede sobreestimar el estadio del tumor y disminuir la posibilidad de cirugías curativas. Por lo tanto adenopatías positivas por PET deben ser confirmadas mediante obtención de muestra ganglionar por ecobroncoscopia (EBUS), mediastinoscopia o mediastinostomía.

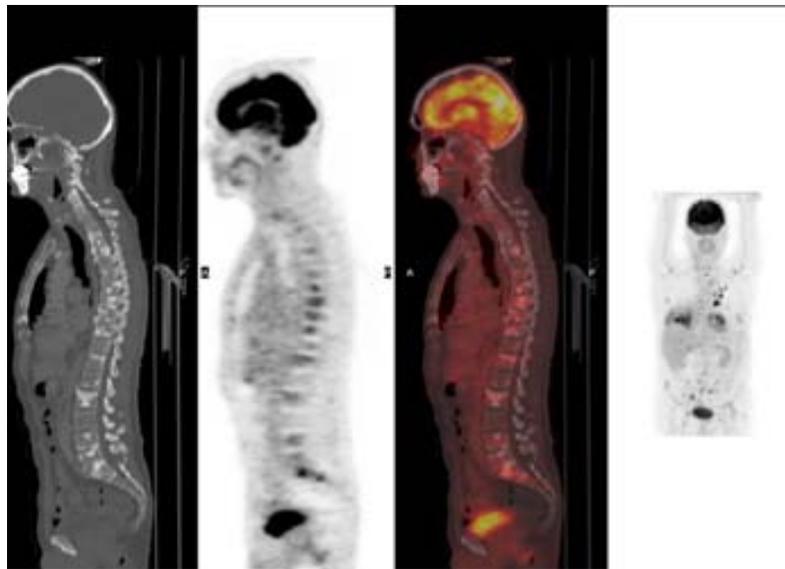


DDI nVÉ2srvmv Áo dnodt monl er ornBtnF n er BDtó Áo Bml

2

bT t Tbl npb di T uobi u i ó uAu.n u T u n Rai buÍ T Q2 eml úi xYub
 i a Í leoái bi b douTa .ó nobi u.a 4ol ó bá u hbozi u di nm do4 l T T di á mn.pb di
 a i óAuó u uhi li Í l T u 4ol T T Tozhobuma o di e T mou di T á 2do zhi li Í l T bola R R ui
 di unoboni T m#il.ol.d d di T i b á T T b T di á mn.pb di i óAuó u u i 4Aón u

2



DDI nV62I ovrl er BDtó Áo vmo ó rMFMF FÁFrnFBml

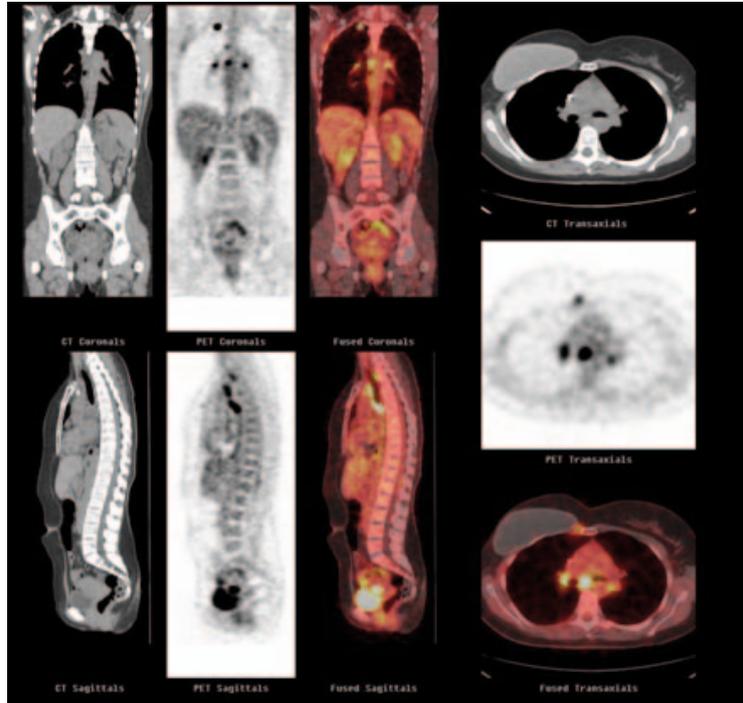
2

l a i z l l T ui buÍ .Td d Rzi u i n.c.n.d d i b z i Td. ebpuáno Vui ema .i b ó R
 l i n d di T Abn l di ma pb b T nóm Td d Yui ó T6 a T ho a Í .b do h ob
 x em ú k x 4ol ó on T6 npb b ópa .n b di ó T di T u T uobi u R .uábemi b b di

; k

2

4 óbe7 2a Teb Ríib.eb 00.0 ó2 Yij j' xq2 Lem TPmi 3 T2222noTbY T2222r2224li ui bó 2
 c Tou2ouátou2ol 2b2Pmi 3 u2Bi ni u l.o2nobcla l 2nob2mbn.pb1.o4u 2bu2i um6 dou2 l 2
 bo2uó1ii uóa l 2i 2i uó d.02R2i t.ó l 2Pmi 2ui 2di 2 b2di 2i T6 l 2n.lne7 u24oá bn. 2a i bá 2
 ml ót u2q



2 dDl n37x27I ovrl 2r 2Dtó Áo 2Bml 272222 22

2

Í 2X1 x277 2 2

2124 4i 22hi 2T 222 2 b2 22l. ebpuóno2R2 uó d.cn n.pb di 2nAbn l di 24n2a pb2 u2a Au2
 Ta .ó do2Pmi 3 22i 2T 222Y2b2a Í leoY2u2 ó22 l 2T 22i ó m.pb22i 22Emb u2a i óAu2 u.22ha o2
 Tu22ni li Íl Tu220a Rol 22ui bu.Í.Td d22Pmi 2T 22222nl bi 22nob22nob2 uá x2022.enl 2; j x2R2
 dlib Tu224 l 2 2bl l 2T 2bt upb22i 2T 24 li d22ol Ann 2RUo22i 2T 2a édmf 2u4.b 227

2

2

????????????????

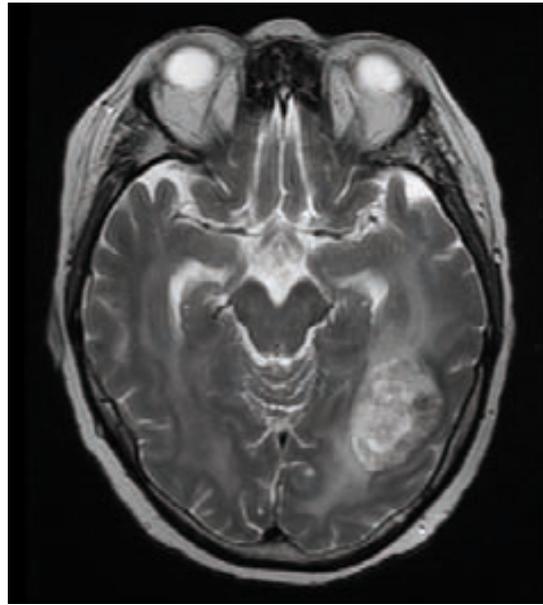
2

2

Jj 2

2

- ?
- ?
- ?
- ?
- ?
- ?
- ?
- ?

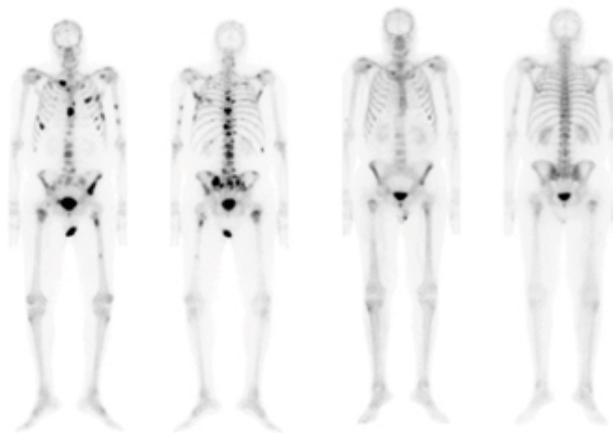


dDl n f x r M F M F Fr l r i l n t r F B n l

Í x í x

oa oñi i unl.ó bñ 47m bu b á l.oli uYT uó A bd.n d b n i b á uñob uebouñ bóa uRUoñ i l n.obi uñ b Tñ n uñ Pñ i bouñ e bñ ou4i n1 lñ i ñ a í Auó uñ pñ uñ Oñ.enl ñ wñ xñ uñ Auñ buñ Iñ Pñ i Tñ uñ lñ i ñ í nó lñ uñ obi uñ Auñ uñ i bouñ nouóuñ uñ bñ a Í leoñ uñ Añ i bdoñ i uñ Tñ 6 dñ olñ Tñ Rñ Pñ i uñ uñ bñ i bñ lñ Auñ i uñ i nñ noñ lñ i ñ í nó lñ uñ uñ obi uñ pñ uñ di a Auñ i bñ Tñ i bó 2ñ i ñ í nó lñ Tñ i 6ñ a í Auó uñ bñ dñ ouñ le bouñ.uni lñ Tñ uñ

?



?

dDl n í x r M F M F Fr l r i l n t r F B n l

?

?

a la zona hilar bilateral (estación 10R, 10L) (Figura 34). Es una prueba muy sencilla y fiable, aunque la mayoría de los pacientes no la requieren (Mentzer et al, 1997).

- Mediastinotomía anterior paraesternal izquierda: conocida como el procedimiento de Chamberlain, es una alternativa quirúrgica para el muestreo de adenopatías mediastínicas. Se utiliza para evaluar la zona paratraqueal izquierda (estación 4L), paraaórtica (estación 5) y sucarinal (estación 7) (Figura 34).

- Toracoscopia: se utiliza para los ganglios situados en la zona de ácigos (estación 4R), subaórtica (estación 5), paraaórtica (estación 6), paraesofágica (estación 8) y ligamento pulmonar (estación 9) (Figura 34). Asimismo, sirve para evaluar la extensión del tumor primario, especialmente cuando existe invasión mediastínica, infiltración de la pared torácica o de la pleura (Roberts et al, 1999).

Por otro lado, se debe destacar la importancia que tiene la confirmación histológica de un derrame pleural en un paciente con cáncer de pulmón. Si tras dos toracocentesis, el resultado sigue siendo negativo, se deberá confirmar mediante toracoscopia (Rivera et al, 2007). Lo mismo debe realizarse si la no confirmación de una lesión metastásica cambia el diagnóstico y por lo tanto el tratamiento de ese paciente. También se puede realizar citología de esputo (se aconsejan 3 muestras de la expectoración matinal) si el paciente expectora y rechaza la realización de broncoscopia o PAAF.

Í 5

Tu.ú a di nT u.c.n n.pb l nAbni l di 4má pb u2mb 2em7 t.ó T4 l di á la .b l T4lobpuóno ó a .i bó di 3mi ud ou ni bá uq b T 6 Í T 2 mi ud T z d.n.pb di T uó d.c.n n.pb l nAbni l di 4má pb 006 nR22R2.no Y2 2 2 2 2 2 2

ni tn52Éze v Áo

Supraclavicular	Scalene		Mediastinal		Subcarinal		Hilar		Peribronchial (ipsilateral)	Lymph Node (N)																																																															
	Contra-	Ipsi-	Contra-	Ipsi-	Contra-	Ipsi-	Contra-	Ipsi-																																																																	
Stage IV (Metastatic: M1a or M1b, any T, any N)																																																																									
+	+	+								N3																																																															
-	-	-	+ &/ +							N2																																																															
-	-	-	-	-	-	-	+ &/ +			N1																																																															
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N0																																																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Stage IA</th> <th colspan="2">Stage IB</th> <th colspan="2">Stage IIA</th> <th colspan="2">Stage IIB</th> <th rowspan="2">T3</th> <th rowspan="2">T4</th> <th rowspan="2">Primary Tumor (T)</th> </tr> <tr> <th>T1a</th> <th>T1b</th> <th>T2a</th> <th>T2b</th> <th colspan="2">Stage IIA</th> <th colspan="2">Stage IIB</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>≤2cm</td> <td>>2cm but ≤3cm</td> <td>>3cm but ≤5cm</td> <td>>5cm but ≤7cm</td> <td colspan="2">>7cm</td> <td colspan="2">Any</td> <td></td> <td></td> <td>a. Size</td> </tr> <tr> <td colspan="2">No invasion proximal to lobar bronchus</td> <td colspan="2">Main bronchus (>2cm distal to the carina)</td> <td colspan="2">Main bronchus (<2cm distal to the carina)</td> <td colspan="2">-</td> <td></td> <td></td> <td>b. Endo-bronchial location</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Surrounded by lung or visceral pleura</td> <td colspan="2">Visceral pleura</td> <td colspan="2">Chest wall/diaphragm/mediastinal pleura/parietal pericardium</td> <td colspan="2">Mediastinum/trachea/heart/great vessels/esophagus/vertebral body/carina</td> <td></td> <td></td> <td>c. Local Invasion</td> </tr> <tr> <td colspan="2"></td> <td colspan="2">Atelectasis/obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung</td> <td colspan="2">Atelectasis/obstructive pneumonitis of entire lung; separate tumor nodule(s) in ipsilateral primary tumor lobe</td> <td colspan="2">Separate tumor nodule(s) within the ipsilateral lung but different lobe as the primary mass</td> <td></td> <td></td> <td>d. Other</td> </tr> </tbody> </table>											Stage IA		Stage IB		Stage IIA		Stage IIB		T3	T4	Primary Tumor (T)	T1a	T1b	T2a	T2b	Stage IIA		Stage IIB		≤2cm	>2cm but ≤3cm	>3cm but ≤5cm	>5cm but ≤7cm	>7cm		Any				a. Size	No invasion proximal to lobar bronchus		Main bronchus (>2cm distal to the carina)		Main bronchus (<2cm distal to the carina)		-				b. Endo-bronchial location	Surrounded by lung or visceral pleura		Visceral pleura		Chest wall/diaphragm/mediastinal pleura/parietal pericardium		Mediastinum/trachea/heart/great vessels/esophagus/vertebral body/carina				c. Local Invasion			Atelectasis/obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung		Atelectasis/obstructive pneumonitis of entire lung; separate tumor nodule(s) in ipsilateral primary tumor lobe		Separate tumor nodule(s) within the ipsilateral lung but different lobe as the primary mass				d. Other
Stage IA		Stage IB		Stage IIA		Stage IIB		T3	T4	Primary Tumor (T)																																																															
T1a	T1b	T2a	T2b	Stage IIA		Stage IIB																																																																			
≤2cm	>2cm but ≤3cm	>3cm but ≤5cm	>5cm but ≤7cm	>7cm		Any				a. Size																																																															
No invasion proximal to lobar bronchus		Main bronchus (>2cm distal to the carina)		Main bronchus (<2cm distal to the carina)		-				b. Endo-bronchial location																																																															
Surrounded by lung or visceral pleura		Visceral pleura		Chest wall/diaphragm/mediastinal pleura/parietal pericardium		Mediastinum/trachea/heart/great vessels/esophagus/vertebral body/carina				c. Local Invasion																																																															
		Atelectasis/obstructive pneumonitis that extends to the hilar region but does not involve the entire lung		Atelectasis/obstructive pneumonitis of entire lung; separate tumor nodule(s) in ipsilateral primary tumor lobe		Separate tumor nodule(s) within the ipsilateral lung but different lobe as the primary mass				d. Other																																																															

Metastatic (M):

M1a:

Local intrathoracic spread:

- Malignant pleural/pericardial effusion
- Separate tumor nodule(s) in the contralateral lung

M1b:

Disseminated (extrathoracic) disease:

Liver, bone, brain, adrenal gland, etc.

n2b mb 2m 2ms2DRDX

1.7.-TRATAMIENTO

A lo largo de la historia, la cirugía ha sido la mejor opción de tratamiento curativo para pacientes con cáncer de pulmón reseccable. Cuando ésta no ha podido aplicarse, la radioterapia ha sido utilizada para el control del tumor primario y de los ganglios linfáticos locorreccionales. En pacientes con cáncer de pulmón, la quimioterapia es raramente curativa, sin embargo en algunas ocasiones se han observado respuestas completas y supervivencias prolongadas en enfermedad localmente avanzada y metastásica. Se han ido combinando diferentes modalidades terapéuticas para mejorar la calidad de vida y supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón reseccable y no reseccable.

El tratamiento se basa principalmente en el estadio del tumor, aunque existen otros factores que influirán en la decisión terapéutica definitiva, como es el *performance status* del paciente, su función pulmonar y su comorbilidad.

1.7.1.- Cirugía

La cirugía sigue siendo la mejor modalidad de tratamiento para aquellos cánceres potencialmente reseccables y limitados al tórax. La evaluación preoperatoria incluye, no solo el estadio del cáncer sino también una valoración cardiopulmonar del paciente.

En los estadios I y II se recomienda la intervención quirúrgica como tratamiento estándar y generalmente se aconseja lobectomía pulmonar (Carrillo et al, 2005). Se puede plantear la resección sublobar en pacientes con clara afectación de la función pulmonar, sin embargo las recaídas locales son superiores a la lobectomía y por lo tanto la supervivencia disminuye en un 5-10%. Otra opción terapéutica es la neumonectomía y se reserva en aquellos casos con afectación de la arteria pulmonar, afectación de 2 lóbulos simultáneamente o del bronquio principal. La mortalidad postoperatoria no debe ser superior al 4% para la lobectomía ni superior al 8% para la neumonectomía. Asimismo, se debe realizar una linfadenectomía y el número de estaciones linfáticas con biopsia o

extirpadas ha de ser como mínimo de 3 y/o el número de ganglios examinados ha de ser de 6 para poder clasificarse como un pN0.

En los estadios IIIA debe plantearse también la cirugía como tratamiento estándar. Sin embargo no queda definido el tratamiento inicial en los pacientes con cáncer de pulmón estadio IIIA (N2) que van a requerir tanto cirugía, como quimioterapia y/o radioterapia combinada para su tratamiento y curabilidad.

En general los estadios IIIB suelen ser inoperables de entrada y requieren quimioterapia y radioterapia para su tratamiento. En estadios avanzados el tratamiento inicial suele ser la quimioterapia pero en algunos casos con metástasis aisladas, la cirugía del tumor primario mejora los resultados del tratamiento y mejora también el pronóstico.

1.7.2.- Radioterapia

La RT consiste en la generación de rayos de fotones de alta energía mediante un acelerador lineal. Las dosis terapéuticas tienen que ser administradas sobre la lesión a tratar con mínima liberación de irradiación sobre los tejidos sanos. Se requiere una sesión de planificación previa al tratamiento con la realización de un TC de dosificación (Figura 35).

Será RT exclusiva en estadios I y II que no se puedan operar, con una dosis > 60 Gy (Scott et al, 2007). Se contempla la irradiación del tumor y de las áreas ganglionares afectadas, con márgenes de seguridad en los tres ejes.

La RT complementaria postoperatoria está indicada en estadio III con resección completa y opcionalmente si hay factores adversos como grupos seleccionados N2, márgenes escasos o afectos, etc. La dosis mínima es de 50 Gy y 60 Gy para márgenes positivos, en el lecho quirúrgico o en el mediastino, con márgenes de seguridad en los tres ejes.

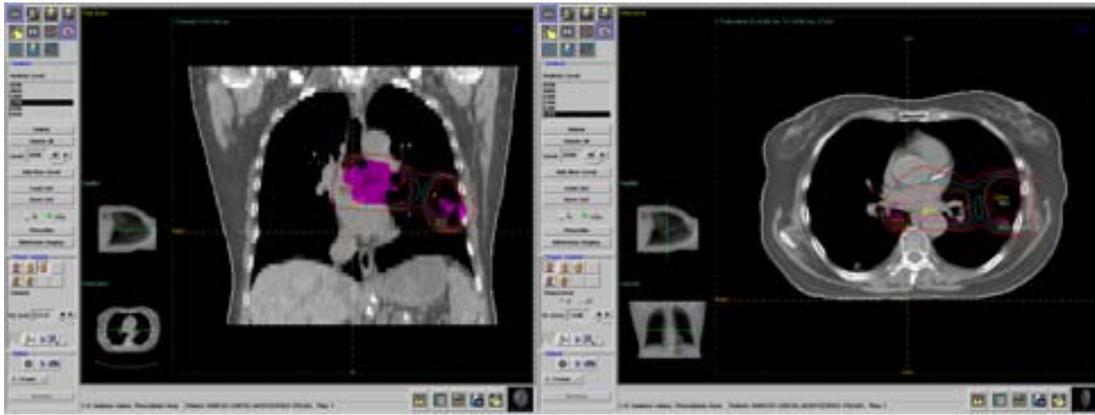


Figura 35.- Cálculos de dosimetría de radioterapia externa en cáncer de pulmón

En estadios III no operables, en los que se recomienda quimiorradioterapia concomitante, se aconseja administrar una dosis mínima de 60 Gy en el volumen macroscópico (tumor pulmonar y ganglios afectados), con márgenes de seguridad en los tres ejes también.

Existe también la llamada RT paliativa que variará en función de la localización y de los síntomas a controlar (RT antiálgica, RTH, etc).

Asimismo se utiliza la RT estereotáctica intracraneal (radiocirugía) para tratar lesiones cerebrales de pequeño tamaño con altas dosis de radiación y poca repercusión sobre los tejidos circundantes sanos. En caso de metástasis cerebrales se considerará su administración en aquellos pacientes con un pronóstico más favorable, buen estado general, ausencia de enfermedad extracraneal progresiva, con un máximo de tres lesiones cerebrales y menos de 40 mm de tamaño.

Una nueva técnica a destacar es la IMRT que permite administrar dosis de radiación precisas a un tumor maligno o áreas específicas dentro del tumor mediante la modulación (o el control) de la intensidad del haz de radiación en varios volúmenes pequeños. La IMRT también hace posible enfocar dosis más altas en regiones dentro del tumor, al tiempo que se minimiza la exposición a la radiación en las estructuras fundamentales circundantes normales.

1.7.3.- Tratamiento sistémico

Las combinaciones de quimioterapia basadas en cisplatino (o carboplatino en combinación con taxanos, gemcitabina/pemetrexed o vinorelbina) siguen siendo el tratamiento estándar del cáncer de pulmón avanzado sin mutaciones genéticas. En 1988 se demostró que la quimioterapia basada en cisplatino mejoraba la supervivencia de los pacientes (Rapp et al, 1988). Posteriores estudios han confirmado estos resultados y han demostrado beneficio clínico en pacientes con cáncer de pulmón en estadio IIIB-IV.

Asimismo la quimioterapia mejora los resultados terapéuticos en pacientes con enfermedad localmente avanzada cuando se administra previamente (neoadyuvancia) o posteriormente (adyuvancia) a la cirugía o concomitantemente a la radioterapia.

Son fármacos que impiden la reproducción de las células cancerosas alterando la síntesis de ácidos nucleicos, la división celular o la síntesis de proteínas. Sin embargo tienen escasa especificidad, dando lugar a efectos secundarios por afectación de órganos o tejidos sanos. Además a medida que el tumor va progresando las células se pueden hacer resistentes a estos agentes quimioterapéuticos, requiriendo el cambio de tratamiento.

En la actualidad, la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado sigue siendo corta a pesar de los avances en la quimioterapia. El beneficio de añadir a la quimioterapia otras moléculas como son los anticuerpos monoclonales (antiangiogénicos y/o anti-*EGFR*) y los ITQ no queda claro. Se ha demostrado que pacientes con mutaciones determinadas como *EGFR* responden a tratamientos específicos contra dichas alteraciones y por lo tanto se mejora la calidad de vida y supervivencia de este subgrupo de pacientes. De ahí radica la importancia de estudiar el perfil genético de cada tumor para poder determinar las alteraciones genéticas y obtener terapias antitumorales específicas, eficaces y bien toleradas por nuestros pacientes (Rosell et al, 2010). En el próximo capítulo definiremos diversas alteraciones genéticas descritas en cáncer de pulmón.

2.- ALTERACIONES GENÉTICAS

En este estudio se analizaron diversos genes que se pueden agrupar en cinco categorías de acuerdo con su función biológica (Tabla 7).

Tabla 7.- Genes estudiados en el presente trabajo

Función biológica	Genes estudiados
Receptores de membrana	<i>AXL</i> <i>DDR2</i> <i>EGFR</i> <i>FGFR1</i> <i>KDR</i> <i>MET</i> <i>PDGFR</i>
Transductores de señal	<i>BRAF</i> <i>K-RAS</i> <i>NF1</i> <i>PIK3CA</i>
Factores de transcripción	<i>SOX2</i> <i>TP53</i>
Otros reguladores de la transcripción	<i>AEG1</i> <i>EZH2</i> <i>HES1</i> <i>SIAH2</i>
Reparadores DNA	<i>BRCA1</i> <i>RAP80</i>

2.1.- RECEPTORES DE MEMBRANA

2.1.1.- *AXL*

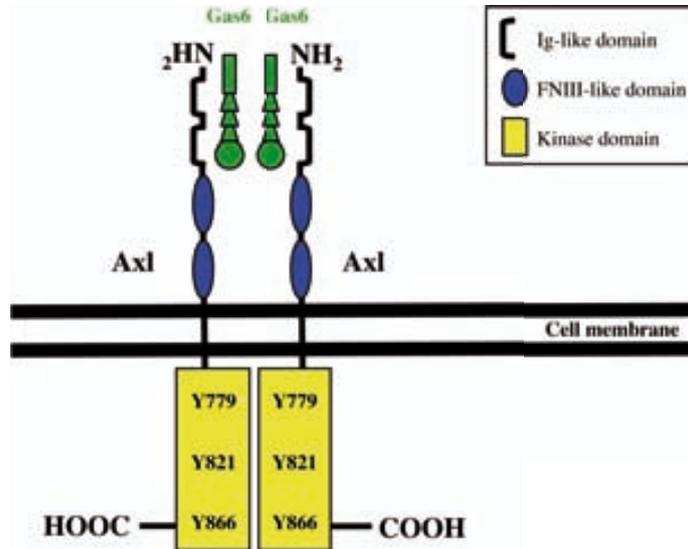
AXL es un receptor transmembrana tirosina quinasa que pertenece a la familia de receptores TAM (Tyro3, *AXL*, Mertk). Tiene un dominio extracelular (N-terminal) y un dominio intracelular (C-terminal) con actividad tirosina quinasa (Figura 36). Gas 6 , junto con otras moléculas, es uno de los ligandos, con el que tiene elevada afinidad.

Su sobreexpresión y aumento de actividad es evidente en muchas condiciones patológicas crónicas y en cáncer. Cuando está activado, está implicado en la supervivencia celular, en la apoptosis e incrementa la proliferación y migración de las células tumorales

u7hoa oT be.oeebi u2 2i t eu2di 2a I 4T u7 7 u2hi TmT li u2ol 2b 26 bo2b1.Í.n.pb2i 2

2222i dmi 2 2ma oloeebi u2R2Li t.i bi 2i 2T u2a i 6Auó u2D2R nli uT R2i 62 2Yij wúx2

2



2

2s a 22222 2a 22222 DR2 X22

2 ddi n2 5x222FMDvMI n2a 22222 rvrBMi 2MnoFó ró i l non22222

2

2 2 2 7 22 u' U22222i emT 2l.tilu u2mbnobi u2R2i bi 2hb2 4i 22a 4oló bá 2bo2pT2 2b2

i 2hAbni l 2u.bo26 a 2.é2b 2b2T u2b2la id di u2h ld.ot umT li u202il - 2 62 2Yij j wx2R2 b2T u2

2i l n.obiu2ba mboTpe.n u202i a - i 2 62 2Yij j 2x22222 u2hi 2bu24onou2i ni 4óli u26lou.b 2

Pmb u 2Pmi 2mi di b2i l 2bdm.dou2ol 2a I 4T u2a in b.ua ou2a oT nmT li u2m bdo22 u' 2i 2

nbi 2 22222Yéu2 2ui 2d.a il.6 22ola bdo2hoa 4T 2u2Yd bdo22re l 2 2um2 nóoucol.T.n.pb2R2

nát n.pb2i 2um2loa .b.22b2d ni TmT l 2Yb2ál m.ob bdo22hob2d.tilu u27 u2p2b24 uo2hi b2d 2

di 2T 2nát n.pb2i 222222 u2T 2nát n.pb2i 2T 2 7 2222F22U22222Pmi 2t.ó 2T 2 4o4óou22i 2T 2

néTmT 2a id. bá 2 l.ou2a in b.ua ou2

2 2ol 2od o2T do2YT 2uo2lí i 34li u2pb2di 222222d 22re l 2 2li u2u2á bn. 2 22a 2ób.Í 2i b2

2ma oliu22 1 dit b 262 2Yij j' x2R2 2T 4 2ób.Í 2b2hAbni l 2i 2a 202.mí 62 2Yij j kx2

2d2ou2i u2m.ou21 b2it 2m do2i 224 4i 22di 2T 2uo2lí i 34li u2pb2di 222222noa o2

a in b.ua o2i 2li u2u2á bn. 2 dPml.d 2 222222b24 ni b2a u2hob2a mó n.pb2i 222222Y2hbó2 2T 2

uo2lí i 34li u2pb222a 4Tcn n.pb2i 2d2ou2i bi u2Y2 T u2hoa o2 222222m - i 2 62 2Yij j wx2

2

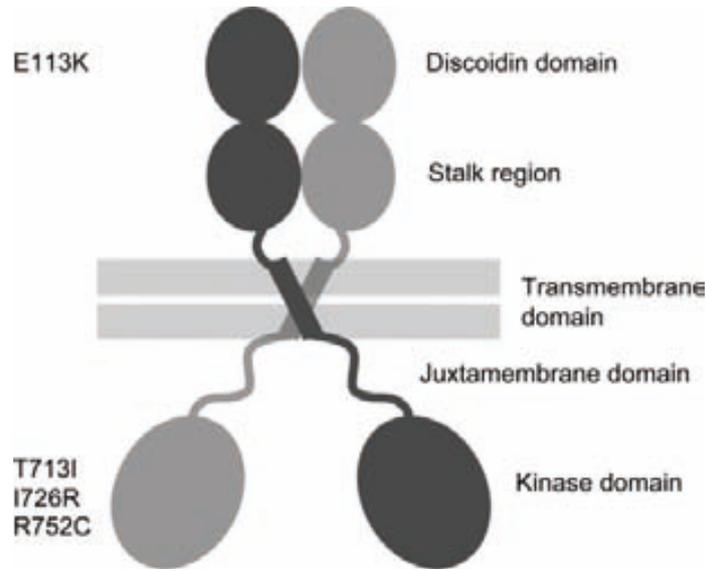
Estudios preclínicos y preliminares están evaluando inhibidores de *AXL* en combinación con otras moléculas.

2.1.2.- *DDR2*

DDR2 es otro receptor de membrana tirosina quinasa que se une al colágeno y a su ligando endógeno promoviendo la migración, proliferación y supervivencia celular (Figura 37).

Mutaciones en este gen han sido identificadas recientemente en carcinoma escamoso de pulmón en la secuenciación de 201 genes con un potencial papel en el cáncer (Hammerman et al, 2011). Este estudio se inició con la secuenciación de 20 tumores, identificándose mutaciones en seis genes tirosina quinasa (incluido *DDR2*). Posteriormente, se analizaron también 48 tumores y líneas celulares. En éstos se secuenciaron sólo los seis genes candidatos y se encontraron cuatro mutaciones de *DDR2*. Por último, se realizó una validación con 222 ejemplares donde se secuenció *DDR2*, encontrándose mutaciones en cinco casos (2,2%).

Un análisis reciente demostró que los inhibidores de la quinasa ABL como el imatinib, nilotinib y dasatinib tienen actividad contra *DDR2* (Day et al, 2008). Se observó que el dasatinib inhibe el crecimiento tumoral en líneas celulares de cáncer de pulmón con mutación de *DDR2* y se demostraron regresiones en xenoinjertos de ratones mutados. Desafortunadamente, el dasatinib no es especialmente activo contra el CPCNP, con una única respuesta parcial observada en un estudio fase II de 34 pacientes (Jonhson et al, 2010), aunque sólo seis de estos pacientes tenían carcinoma de células escamosas. Curiosamente, en otro estudio fase II, un paciente con cáncer de pulmón de células escamosas y mutación puntual de *DDR2* respondió a dasatinib con erlotinib (Hammerman et al, 2011).



J p . ds a n DRDX

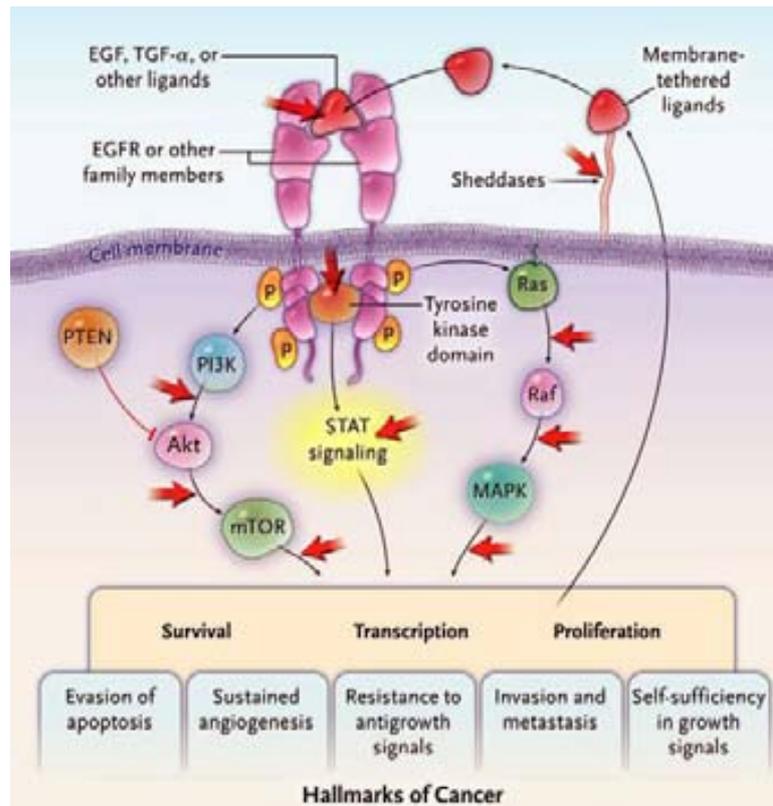
dDl n É x FMDvMl n r t

?

? ? i u l ? i ? p m i ? u á ? i b ? m i d i ? i b i l ? b ? b ? n ? m ? o ? i ? ó a . i b ? o u ? u ? i n ? c ? n o u ? u ? e m i b ?
 1 Í . i b d o ? T e m b u ? l i e m b ? u ? b ? i u o ? t i l ? o l ? 2 a 4 T ? u i ? i ? í l A ? h o b o n i l ? R ? i ? á l a . b l ? T ?
 u i b u í . T d d ? d ? u ? ó b . í ? d i ? T ? u ? d . a l i b á u ? a m ? n o b i u ? i b ? ? ? ? ? ? ? ? T o n T 6 d u ? i b ? t l . o u ?
 n o d o b i u ? ? d . n o b ? a i b á ? u i ? d i ? í ? n o b ? d o ? t l ? n b ? ó 3 . n d d ? . a 4 o l ? b á ? n o a o ? i u ? i ?
 d i u l l o ? b ? i ? b u ? i l l a i u ? t m ? T u ? o í u i l t d ? b ? u ? m d . o u ? i T 6 d o u ? n o b ? u ? ó b . í ? b ?
 T m i a . ? a . i ? b . d i ? n l p b . n x ? R ? P m i ? i b ? 4 n i b á u ? n o b ? ? ? ? ? ? ? ? ? P m i ? á i b i b ? T a . ó n p b ?
 l i u 4 . l ? o l . ? i ? í u i ? 4 m i d i ? a 4 i o l l ? m ? u ? o d ? i b i l ? ? ? l ? n ? t l l ? o d o ? u ? o ? u ? o ? a b ? b ?
 a l n 1 ? d o u ? b u R o u ? t u i ? ? ? ? ? d i ? d u ? ó b . í ? b ? n l n . b o a ? d i ? 4 m ? p b ? d i ? n ? t ? u ? u n a o u u ?
 O ? ? ? j w j k w ; ; Y ? ? ? j w % w j β ' J x ?

Ví x x ? ? ? ? ?

? ? ? ? ? ? ? ? ? a Í . é b ? h o b o n . d o ? n o a o ? ? , ? z ? R ? b ? ? ? ? R ? u ? n b ? i n i 4 ? o l ? d i b u a i a í l b ?
 O ? . e m l ? ; β x ? P m i ? 4 i l á b i n i ? ? T ? c a . T ? d i ? b u ? i n i 4 ? o l i u ? d i ? c n ? o l ? d i ? n l i n a . i b ? o ?
 i 4 . d é l a . n o ? c a . T ? ? ? ? ? x ? ? ? o b ? n m ? d o ? i n i 4 ? o l i u ? d i ? a i a í l b ? n o b ? n á t . d d ? l o u b ?
 P m b u ? i u ? d i n 1 a i b á ? l i T n o b d o u ? ? ? ? ? R N ?
 E ? ? ? F X ?
 ?
 ?



NEJM (2009)

Figura 39.- Activación *EGFR/K-RAS/PIK3CA*

Las mutaciones de sensibilidad de *EGFR* son más frecuentes en mujeres, no fumadoras, con adenocarcinoma o carcinoma broncoalveolar y en raza asiática. Así pues, la respuesta a ITQ depende del sexo, etnia, hábito tabáquico y subtipo histológico, como se ha observado en estudios con gefitinib y erlotinib, (SLADB y EURTAC) (Rosell et al, 2010).

Mutaciones del gen *EGFR* representan un factor pronóstico favorable en cuanto a supervivencia y es factor predictivo de respuesta a los ITQ. Sin embargo las diferentes respuestas y supervivencias objetivadas en pacientes con mutación de *EGFR* que reciben estos fármacos, están también relacionadas con otras alteraciones genéticas (Shepherd et al, 2006).

Tabla 8.- Frecuencia de alteraciones de *EGFR/K-RAS/PIK3CA/BRAF* en diferentes tumores (COSMIC DATA BASE)

<i>PrimaryTissue</i>	<i>EGFR</i>	<i>K-RAS</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>BRAF</i>
	% Mutated	% Mutated	% Mutated	% Mutated
Adrenal gland	4,17	0,47	---	1,94
Biliary tract	2,49	27,04	7,65	5,21
Bone	0,68	0,61	0,44	1,81
Breast	1,19	1,56	24,80	1,18
Central nervous system	4,71	0,68	4,76	3,71
Endometrium	6,62	14,78	22,48	1,38
Eye	2,01	2,01	0,78	9,89
Haematopoietic and lymphoid	0,79	4,94	1,37	10,10
Kidney	1,02	0,61	2,13	3,19
Large intestine	2,58	34,50	13,51	12,40
Liver	0,39	4,08	5,91	4,53
Lung	27,02	15,94	3,37	2,09
NS	0,49	3,17	4,40	51,40
Oesophagus	2,02	2,90	5,62	0,69
Ovary	2,24	12,47	8,73	8,22
Pancreas	0,31	57,20	2,51	1,48
Peritoneum	9,82	6,82	---	---
Pleura	1,10	4,10	1,23	2,03
Prostate	4,17	5,51	1,74	1,69
Salivary gland	3,24	3,47	---	1,08
Skin	0,79	2,23	10,68	44,21
Small intestine	1,67	20,82	---	4,86
Soft tissue	0,40	4,68	2,10	2,08
Stomach	4,03	6,24	9,45	0,77
Thymus	0,85	2,15	0	---
Thyroid	2,30	2,09	4,13	39,15
Upper aerodigestive tract	3,02	2,77	6,03	0,95
Urinary tract	1,38	4,34	17,48	1,31
Total	19	21,35	11,43	19,67

Paralelamente a los estudios de mutaciones, también se ha analizado el valor pronóstico de la sobreexpresión de *EGFR*, que ocurre en aproximadamente un 40-80% de los pacientes con CPCNP (Normanno et al, 2006) y la relación de ésta a la respuesta a ITQ. La correlación entre niveles elevados de expresión de *EGFR* y mejores resultados en pacientes con CPCNP tratados con gefitinib ha sido descrito en diversos estudios (Capuzzo et al, 2005; Hirsch et al, 2006). Sin embargo, el análisis de la expresión de la proteína *EGFR* en pacientes randomizados en los ensayos INTEREST e INVITE no mostraron ninguna correlación (Douillard et al, 2010; Crino et al, 2008). Tampoco fue encontrada ninguna correlación entre la expresión de *EGFR* y beneficio de erlotinib en el ensayo SATURN, en el que erlotinib se administró como terapia de mantenimiento (Brugger et al, 2011).

La falta de correlación entre la expresión de *EGFR* y la actividad de los ITQ en CPCNP se puede atribuir a las técnicas comúnmente utilizadas para la IHQ de *EGFR* y a varios factores relacionados con la conservación y la fijación de los tejidos, que puede dar lugar a resultados falsamente negativos. Sin embargo, no hay datos disponibles que apoyen la hipótesis de que la detección por IHQ de *EGFR* sea un marcador adecuado para la selección de los pacientes que podrían beneficiarse de ITQ (De Luca et al, 2010).

En el caso de número de copias de este gen, un aumento ha sido observado en más de un 65% de los pacientes con CPCNP (Cappuzzo et al, 2005). Sin embargo, la amplificación del gen y la alta polisomía (definida como la presencia de más de 40% de las células tetraploides) se produce en aproximadamente el 30% de los pacientes. La amplificación del gen *EGFR* se correlaciona frecuentemente con la sobreexpresión de la proteína *EGFR* y con la progresión del tumor (Yatabe et al, 2008). Dado que las mutaciones del gen *EGFR* están frecuentemente asociados con un alto número de copias de *EGFR*, el verdadero valor predictivo del número de copias por sí sólo es desconocido.

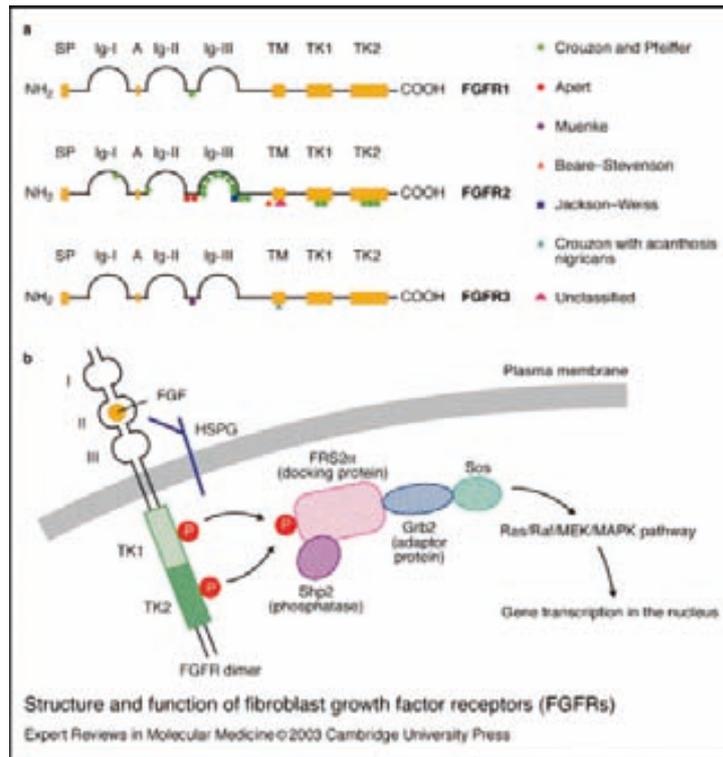
Los estudios no han confirmado una asociación entre el número de copias del *EGFR* y la actividad de los ITQ. El aumento del número de copias tampoco predijo mejor supervivencia global ni altas tasas de respuesta en los pacientes incluidos en el estudio

TRIBUTE (Hirsch et al, 2008) con similares resultados obtenidos en el INTEREST (Kim et al, 2008). Por otro lado, más concluyentes fueron los resultados obtenidos en el análisis *FISH* de los pacientes incluidos en el ensayo IPASS (Wu et al, 2012). Los subestudios moleculares demostraron que el beneficio en la SLP de los pacientes con alto número de copias está correlacionado en su totalidad con la presencia de mutación, por ello, el alto número de copias por sí sola no debe utilizarse como una herramienta de selección para el tratamiento de primera línea del CPCNP con ITQ (Fukuoka et al, 2011).

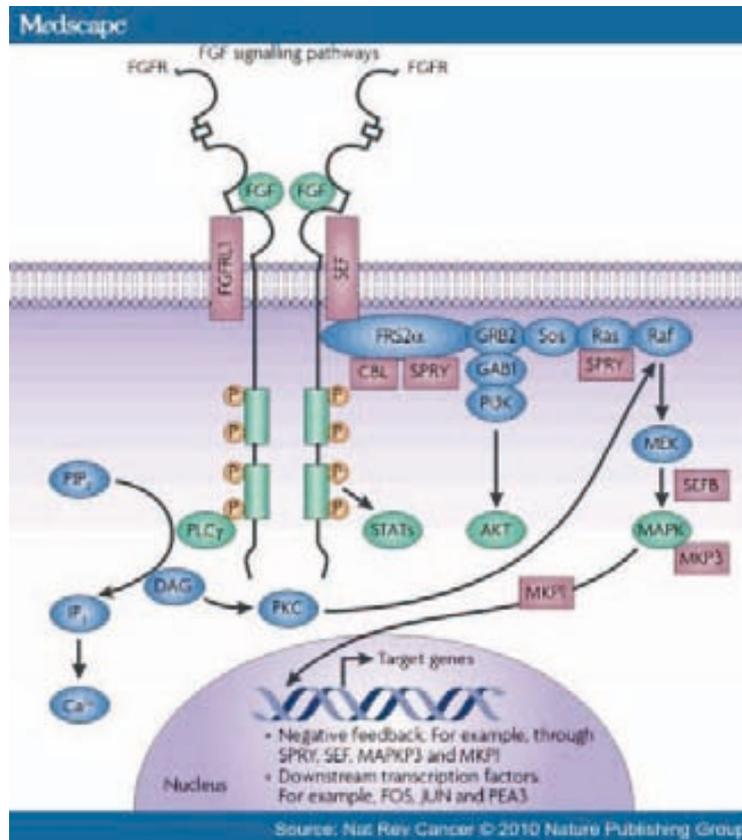
Existen diversos estudios en adenocarcinoma de pulmón con gefitinib (IPASS; TARGET) y erlotinib (EURTAC; OPTIMAL) que muestran la eficacia de estos fármacos en los pacientes con mutaciones de *EGFR* (Wu et al, 2012; Rosell et al, 2012). Sin embargo la mayoría de los oncólogos no solicita estas mutaciones en carcinoma escamoso por la falta de ensayos clínicos similares a los realizados en adenocarcinoma aunque se ha descrito, en baja frecuencia, la presencia de estas mutaciones en este tipo tumoral.

2.1.4.- *FGFR1*

FGFR1 es un miembro de la familia de los receptores de la tirosina quinasa, existen cuatro tipos (*FGFR1-4*). Estas proteínas son receptores transmembrana compuestos por un dominio extracelular donde se une el ligando, un dominio transmembrana y una parte intracelular que contiene la actividad tirosina quinasa (Figura 40). La activación tiene lugar por ligandos específicos de los que se conocen 18 diferentes. Cuando el ligando se une al receptor forma complejos que dimerizan con otros receptores, provocando un cambio en la conformación del mismo y dando lugar a la activación del dominio tirosina quinasa y a la transfosforilación. Todo esto conlleva la activación de diferentes vías moleculares tales como la vía de transcripción *STAT*, de la vía *PIK3CA-AKT* y de la vía *RAS-RAF-MAP* quinasa (Turner et al, 2010) (Figura 41). La activación de *FGFR* estimula la proliferación y supervivencia de las células así como la angiogénesis.



dDI n4f x??FNdVMDI nEESDov ÁoEr



dDI n4Í x??vMpnv Áo

La alteración de *FGFR1* se ha asociado a diversos tumores malignos. La activación de este gen ocurre principalmente a través de tres mecanismos: amplificación, translocación y mutación. La frecuencia de alteraciones de *FGFR* en los diferentes tumores se describe en la Tabla 9.

Tabla 9.- Frecuencia de alteraciones de *FGFR1* en diferentes tumores

FGFR1 alterations	Tumor entities (estimated frequency)
Amplification	Breast cancer (10%)
	Ovarian cancer (5%)
	Bladder cancer (3%)
	Rhabdomyosarcoma (3%)
	Squamous cell carcinoma of the lung (20%)
	Small cell carcinoma of the lung (5%)
	Head and neck squamous cell carcinomas (17%)
Translocation	Esophageal squamous cell carcinoma
	8p11 myeloproliferative syndrome [<i>ZNF198-FGFR1</i>]
	Chronic myeloid leukemia (rare)
	Rhabdomyosarcoma [<i>FOXO1-FGFR1</i>]
Activating mutation	Glioblastomamultiforme [<i>TACC-FGFR1/3</i>] (3%)
	Melanoma (rare)

Adapted from Schildhaus Transl Lung Cancer (2012)

Recientemente se ha descrito que la frecuencia de amplificación del gen *FGFR1* en los carcinomas escamosos de pulmón es de un 20% (Schildhaus et al, 2012). Junto a *EGFR* es una de las alteraciones genéticas más frecuentes que pueden ser tratadas por fármacos específicos (*driver lesions*). La alta frecuencia y la larga lista de potenciales fármacos inhibidores de *FGFR1* está en actual estudio (Tabla 10), haciendo valer que la amplificación de *FGFR1* es uno de los biomarcadores más prometedores en el tratamiento

del cáncer de pulmón. Se ha observado en algunos tumores adenoescamosos de pulmón, de célula grande y de célula pequeña, sin embargo, parece estar estrechamente relacionado con la morfología escamosa.

Tabla 10.- Inhibidores *FGFR1* en investigación mediante ensayos clínicos fase I-III

Drug	Company	Main Targets	Clinical Dev
Small-molecule TKIs			
E3810	Ethical Oncology Science	FGFR, VEGFR	I
BGJ398	Novartis	FGFR	I
TSU-68	Taiho Pharmaceutical	FGFR, PDGFR, VEGFR	I/II
AZD4547	Astrazeneca	FGFR	I/II
AP24534 (Ponatinib)	Ariad	FGFR, BCR-ABL	II (in CML)
E7080	Eisai	FGFR, PDGFR, VEGFR	II/III
BMS-582,664 (Brivanib)	Bristol Myers Squibb	FGFR, VEGFR	II/III
TKI258 (Dovitinib)	Novartis	FGFR, PDGFR, VEGFR	II/III
BIBF1120	Boehringer Ingelheim	FGFR, PDGFR, VEGFR	III
LY2874455	Lilly	FGFR	n/a
FGFR antibodies and FGF ligand traps			
R3Mab	Genentech	FGFR3-specific Ab	II
FP-1039	Five Prime Therapeutics	FGF ligand trap (multiple FGFs)	I/II

Heist et al, JTO (2012)

Los efectos terapéuticos de los inhibidores tirosina quinasa de *FGFR* parecen depender del número de copias de dicho gen, sin embargo sigue sin clarificarse la correlación entre el número de copias del gen y la expresión proteica. Por el momento una de las técnicas más utilizadas para detectar la amplificación de *FGFR1* es el *FISH*, sin embargo los criterios de dicha técnica no están del todo definidos ampliamente.

2.1.5.- *KDR*

El gen *KDR* (localizado en 4q12) o también llamado *VEGFR2* es un receptor de membrana que pertenece a la familia de los receptores de los factores de crecimiento del

demostrado que los niveles de *VEGFR2* pueden cambiar en función de la histología y tener actividad diferente, así pues un estudio preclínico de Larrayoz en 2011, observó que niveles altos de *VEGFR2* disminuyen el crecimiento celular en carcinoma escamoso. Otro estudio de Pajares et al, observó que niveles altos de *VEGF*, *VEGFR1* y *VEGFR2* se correlacionan con mejor pronóstico en carcinoma escamoso en estadios precoces. Se necesitan más estudios para acabar de entender el mecanismo biológico de este receptor. Sin embargo, dado su importante papel en la angiogénesis tumoral, se han realizado grandes esfuerzos para inhibir este gen. Inhibidores tirosina quinasa y anticuerpos monoclonales anti-*VEGFR2* han demostrado beneficio clínico en CPCNP (Bagri et al, 2010), como el Bevacizumab (aunque contraindicado en histología escamosa por riesgo de sangrado).

2.1.6.- *MET*

MET es otro receptor de transmembrana con actividad tirosina quinasa con un papel importante en la proliferación, migración celular y angiogénesis. Se ha observado sobreexpresado en varios tipos de cáncer (siendo el cáncer papilar hereditario de riñón donde primero se describió) y en el CPCNP con histología papilar, relacionándose con estadios avanzados y corta supervivencia (Matsubara et al, 2010).

En el cáncer de pulmón las mutaciones del gen *MET* se han encontrado tanto en el dominio extracelular como en el intracelular. El dominio extracelular, codificado por el exón 2, es fundamental para la dimerización y activación de *MET* (Ma et al, 2005). La presencia de estas mutaciones han sido claramente definidas en cáncer de pulmón pero su relevancia biológica necesita ser todavía definida. En 2007, Lutterbach et al demostraron amplificación y sobreexpresión del gen *MET* en líneas celulares de cáncer de pulmón. Posteriormente, Engelman et al confirmaron que la amplificación de este gen causaba resistencia a gefitinib. Interactúa con *ERBB3* y con la vía de *PIK3CA/AKT*. Otros estudios han descrito amplificación de *MET* en un 20% de los pacientes con resistencia adquirida a

ITQ. Por lo tanto, esta resistencia adquirida puede ser neutralizada bloqueando de forma simultánea a *MET*.

Existen varios ensayos clínicos con inhibidores de *MET* en cáncer de pulmón como por ejemplo el tivantinib, cabozantinib, crizotinib y foretinib.

2.1.7- *PDGFR*

PDGFR es uno de los numerosos factores de crecimiento o proteínas que regulan el crecimiento y división celular. Juega un rol esencial en el desarrollo embriogénico, proliferación, migración celular y angiogénesis. Existen cinco isoformas diferentes de *PDGFR* que activan la respuesta celular a través de dos receptores, los cuales presentan actividad tirosina quinasa intrínseca. Se han identificado dos clases, el tipo alfa y el tipo beta. Tras la activación estos receptores se dimerizan y se autofosforilizan, dando lugar a la activación de la cascada de señales, por ejemplo, a través de la vía *PIK3CA* (Figura 43). El efecto cascada incluye la regulación de la expresión génica y el ciclo celular.

Se ha descrito una activación aberrante del *PDGFR* en enfermedades mieloides asociadas a hipereosinofilia, debido a alteraciones cromosómicas que producen fusión de genes.

En lo que al tratamiento se refiere, se descubrió que imatinib, una molécula utilizada para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica, bloqueaba también a *PDGFR* a bajas concentraciones (David et al, 2007). Aunque el papel de *PDFGR* está bien establecido en neoplasias mieloides, es desconocido su papel en la hematopoyesis (Demoulin et al, 2012).

En lo que a mutaciones de este gen se refiere, se ha visto que varias patologías presentan alteraciones en bajos porcentajes (Tabla 11). En los tumores de GIST, pacientes con mutaciones de *PDGFR* tratados con imatinib presentan buenas respuestas.

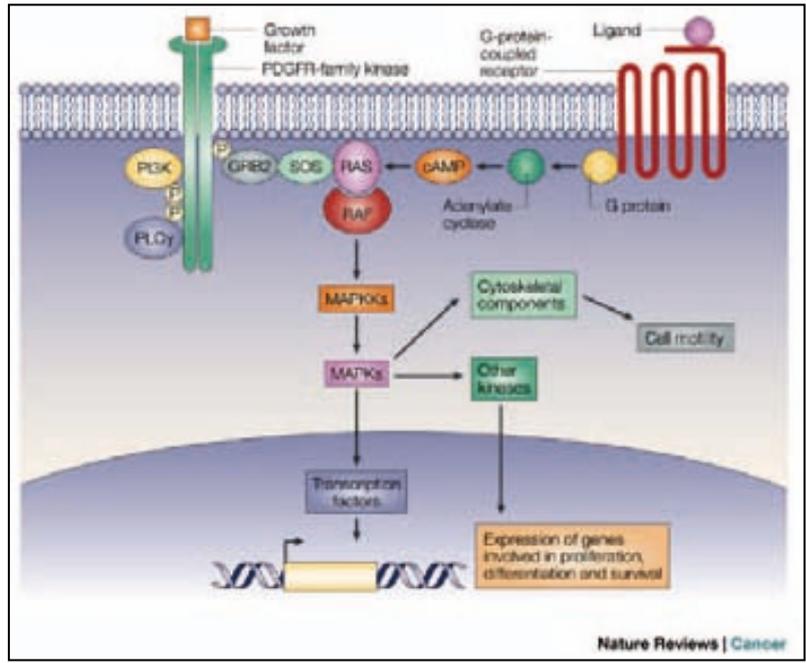


Fig. 1. The RAS/MAPK signaling pathway.

ni tní x mlvro MA eró DMv Áo r e s lrom FMDó m r F

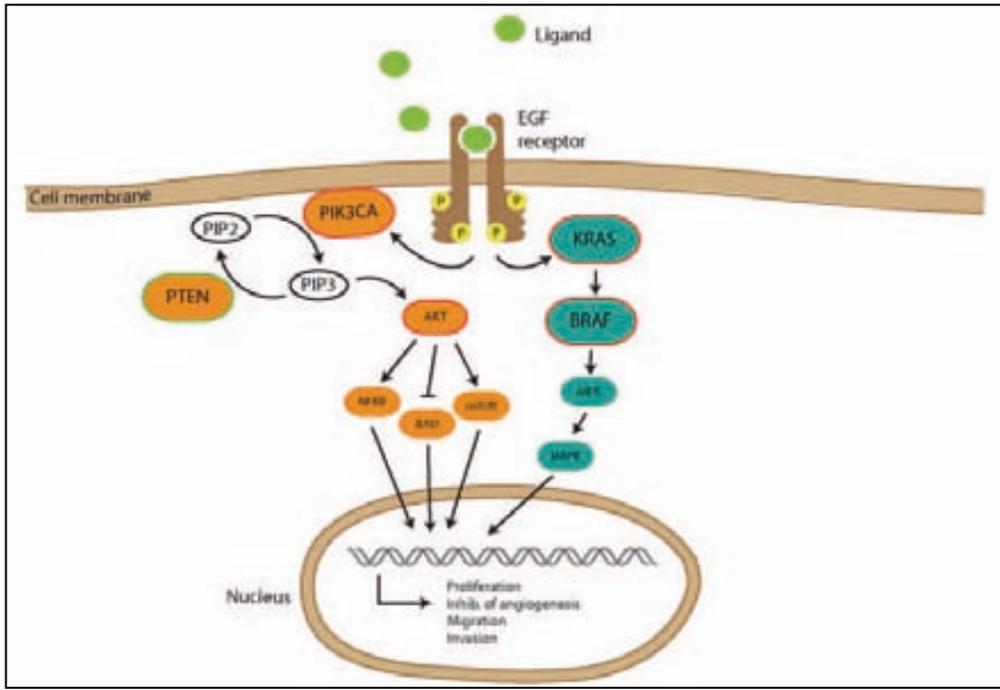
2 2 2 T 2 2 2 2 2	r 2 2 2 2 2 2 2
2 2	j Y ú
2 n ó b o a . n e b e T	j Y 0
2 . T l R 2 n ó	j 2
2 o b i	j Y ú 2
2 l i u ó	j Y 2
2 i b d T b i l t o m i R u á a	w j w 2
2 i l t . 3	j 2
2 b d o a i d . m a 2	ú Y % 2
2 R i	j Y j 2
2 u d o . b á u ó b T a n ó 2	ú Y ; 2
2 i a ó 4 o . i ó n 2 b d 2 R a 4 1 o . d 2	w X v , 2
2 . d b i R	j Y 2
2 l e i 2 b á u á b i	% j 2
2 t i l	ú Y j 2
2 n b e	; Y β 2
2 t l R	j Y ' 2
2 b n l i u	j 2
2 l o u ó á	w ú ' 2
2 . b	w X j 2

Small intestine	33,33
Soft tissue	11,43
Stomach	7,69
Testis	0
Thymus	0
Thyroid	0
Upper aerodigestive tract	0
Urinary tract	4,62
Total	5,87

2.2.- TRANSDUCTORES DE SEÑAL

2.2.1.- *BRAF*

BRAF es un miembro de la familia de RAF de las serina-treonina tirosina quinasas. La estructura de estas proteínas consiste en un extremo amino-terminal que contiene el dominio regulador y un extremo carboxi-terminal que contiene el dominio quinasa. Forman parte de la cascada de señalización de *RAS*; estimulando a *RAF* y activándolo, da lugar a la activación consecutiva de *MEK* y *ERK* (Garnette et al, 2004). Una vez activado, *ERK* se trasloca al núcleo donde fosforiliza factores de transcripción, regula la expresión de genes, ordenamientos citoesqueléticos, proliferación celular, diferenciación, angiogénesis y apoptosis (Figura 44). Las tres proteínas RAF no presentan la misma habilidad para activar *MEK*, siendo *BRAF* el mayor activador con gran afinidad a *MEK-1*, *MEK-2* y *RAF-1* (Papin et al, 1998).



hdu b α EDR2
 dD n442 On r

2

mó nobi uá b. do di un. ó uá b. til uou ma oli uó Í T β x p b T h uo
 di γ T b n. di bn. di úo uá u. d b d i T W R < Y u o b a I á m a i b á 3 n T r i b á u
 nob T uá di γ z T R T q a R o l 7 d i T o n T 6 b b T d o a . b . o P m b u R n a i b ó b T
 n á t . d d P m b u d i n . T q a A u z h o a I b u T u m u ó ó m . p b d i z a . d . b o l
 di bou b b T b m T p á d o w k k b b T 3 p b w P m i d i u m b b T h a í . o d i T b o l
 e t r o a ó b T h o d p b j j ' j j x t . i u á ó T Y i j j ú x p b b A T u u a mó nob T i T 6 d o
 i b T p d , s s d a z z m a " a z z a n z h o b c l a p T b n . di úo uá mó nobi uá
 i b di bon ln . b o a u d i 4 m a p b . T ó T Y i j w x h i u ó n b d o P m i d o d o u z o u 4 n i b á u h o b
 a mó n . p b d i l b a m a d o l i u b 3 m a d o l i u d 4 [j q j w R T a R o l 7 d i b a m d i u q
 d o d u á m . o d i T 6 d o d b T Y i b n b e l m o d i w q j ' 4 n i b á u b 4 i l d o u d i γ
 di a o u d p P m i Y n b Y < d i d i bon ln . b o a u R m b Y < d i d i un a o u o u 4 i u i b ó í b
 a mó nobi uá i u á i b l n i ó ó T Y i j w x p

Rol 7 di 4 n i b á u P m i d i b i b T a mó n . p b j j d i h o b a m R i b u í T u
 . b 1 . í . d o l i u d i R T q o u . b 1 . í . d o l i u d i j j a A u d i u á m . d o u z o u b z i T

' 2

vemurafenib y el dabrafenib. Un ensayo clínico fase III comparó vemurafenib con dacarbazina en melanoma con resultados a favor del vemurafenib (Chapman et al, 2011). Asimismo, otro fase III con dabrafenib versus dacarbazina ha demostrado eficacia en supervivencia en paciente con melanoma (Hauschild et al, 2012). Ante estos datos se han iniciado estudios en CPCNP, concretamente un fase II internacional, multicéntrico, no randomizado en 69 centros de Estados Unidos de América, Europa y Asia, utilizando dabrafenib en pacientes con CPCNP en progresión.

A pesar de que la mayoría de los pacientes responderán a tratamientos específicos contra estas mutaciones, el cáncer suele desarrollar resistencias por lo que se están abriendo ensayos en melanoma a la progresión de los inhibidores de *BRAF*, asociándolos a inhibidores de *MEK* como el trametinib (Flaherty et al, 2012).

2.2.2.- K-RAS

El gen *K-RAS* junto con v-Ha-ras (Harvey rat viral oncogene-HRA) y con el oncogene viral RAS de neuroblastoma (ARN), codifica una familia de proteínas de membrana que regulan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis mediante la interacción con múltiples efectores, incluyendo las cascadas de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAPK*), los transductores de señales y activadores de la transcripción (*STAT*) y el fosfoinosítido 3-quinasa (*PI3K*) (Riely et al, 2009).

Las mutaciones en el gen *K-RAS* se encuentran con frecuencia en diferentes tipos de cáncer tales como el de pulmón, intestino grueso, páncreas y el de tracto biliar (Tabla 8). Entre el 15%-25% de los pacientes con CPCNP tienen mutaciones *K-RAS*, desconcentrándose éstas en un 97% en los exones 2 y 3 (G12, G13 y Q61) (Brose et al, 2002). Estas mutaciones afectan a la actividad GTPasa (*GAP*) intrínseca del gen y confieren resistencia a los activadores de *GAP*, lo que provoca que *RAS* se acumule en su estado activo manteniendo la activación de la cascada de señalización de dicho gen (Trajey et al, 1987).

En cáncer de pulmón, las mutaciones de *EGFR* y *K-RAS* son mutuamente excluyentes, tal y como han demostrado diversos estudios, lo que sugiere que tienen papeles funcionalmente equivalentes en la tumorigénesis de pulmón (Shigetmasu et al, 2005; Taron et al, 2005). Las mutaciones de *K-RAS* son más frecuentes en adenocarcinomas de pulmón (aproximadamente el 30%) y menos frecuentes en carcinomas escamosos (aproximadamente 5-10%). También afectan más comúnmente a los caucásicos, con una frecuencia de 25-50% versus el 5-15% observados en asiáticos (Mao et al, 2010). A diferencia de las mutaciones del *EGFR* un gran número de estudios han encontrado una asociación significativa entre el tabaco y la presencia de mutaciones de *K-RAS* (Le Calvez et al, 2005).

Diversos estudios han investigado acerca de la correlación entre las mutaciones de *K-RAS* y la supervivencia, sin encontrar asociación ninguna (Grazione et al 1999). Por el contrario, Slebos et al, describieron que mutaciones puntuales en el codón 12 de *K-RAS* son un factor pronóstico negativo para la SLE y la SG en una serie de 69 pacientes tratados quirúrgicamente (Slebos et al, 1990). En otros dos estudios, se encontró que el grupo mutado de *K-RAS* tenía peor supervivencia que el grupo con *K-RAS* negativo. En 2005, un meta-análisis de 28 estudios con un total de 3.620 pacientes mostró que la presencia de mutaciones del gen *K-RAS* confiere un pronóstico significativamente peor y, en un análisis de subgrupos de acuerdo con la histología, la mutación *K-RAS* era factor pronóstico negativo para el adenocarcinoma (Mascaux et al, 2005).

Tal y como ya se ha mencionado, el *EGFR* activado puede fosforilar una gran variedad de cascadas de señalización intracelulares, tales como la vía de *RAS/RAF/MEK* (Figura 45), interviniendo en la proliferación del cáncer, en el aumento de formación de metástasis y en la angiogénesis (Cataldo et al, 2011).

mantenimiento con erlotinib) los pacientes tratados con este ITQ experimentaron una mayor SLP, sobretodo en la población con mutaciones de *K-RAS*, mientras que la presencia de mutaciones en el brazo placebo fue un factor pronóstico negativo (Capuzzo et al, 2010). En el estudio ATLAS (mantenimiento con Bevacizumab y Erlotinib) los pacientes sin *K-RAS* mutado y tratados con el mantenimiento presentaron mayor SLP, sin diferencias en aquellos con *K-RAS* mutado (Miller et al, 2009). Y en el estudio INTEREST, que comparó gefitinib y docetaxel como terapia de segunda línea en CPCNP metastásico, no se detectaron diferencias en la SLP ni en SG en ambos brazos de tratamiento en función del estado mutacional de *K-RAS* (Kim et al, 2008).

En la actualidad no hay comercializados fármacos específicos contra esta mutación, pero existen moléculas en investigación en ensayos clínicos fase II y III. Datos recientes sugieren que las mutaciones de *K-RAS* también pueden influir en la respuesta a la quimioterapia. En el meta-análisis LACE-BIO se investigó el papel pronóstico y predictivo de las mutaciones del gen *K-RAS* en 1.532 pacientes tratados con quimioterapia adyuvante y aquellos con mutación *K-RAS* en el codón 13 tuvieron resultados significativamente peores con quimioterapia adyuvante (Tsao et al, 2010). Otros estudios han descrito la influencia de las mutaciones del gen *K-RAS* en la sensibilidad a la quimioterapia en CPCNP avanzado y no se ha detectado ninguna diferencia significativa en SLP y SG entre pacientes con *K-RAS* no mutado y mutado, indicando esto que estas mutaciones no tienen ningún papel en la predicción de la respuesta a la quimioterapia estándar (Kalikaki et al, 2010). Existen varias hipótesis que postulan que las mutaciones de *K-RAS* confieren diferente sensibilidad a los tratamientos (Garassino et al, 2011). Por todos estos descubrimientos, sería necesario identificar a los pacientes con mutaciones de *K-RAS* y así poder crear nuevas estrategias de tratamiento para este tipo de tumores (Karachaliou et al, 2013).

2.2.3.- NF1

Es una proteína llamada neurofibromin (que es supresora de tumores) que en humanos es codificada por el gen *NF1*. Mutaciones en el gen *NF1* se han asociado a neurofibromatosis tipo I (conocida también como la enfermedad Von Recklinghausen) y al síndrome de Watson. Al parecer, la proteína neurofibromin es un regulador negativo de la vía de transducción de señal de *RAS*, también interactúa con *CASK* y está involucrada en la vía de señalización de *ATP-PKA-cAMP*.

Las mutaciones asociadas a la neurofibromatosis tipo 1 permitieron identificar a este gen. *NF1* puede estar mutado en multitud de maneras, dando lugar a diferentes entidades clínicas (Thomson et al, 2002). Las mutaciones incluyen las tipo *frameship*, *missence*, deleciones y pérdida de heterocigosis. La degradación y expresión de *NF1* son esenciales para el adecuado mantenimiento de los niveles de Ras-GTP. Al igual que *TP53*, *NF1* puede ser inactivado en cáncer, sin embargo los mecanismos involucrados son, hasta el momento, desconocidos (Hollstein et al, 2013).

2.2.4.- PIK3CA

PIK3CA pertenece a una familia de enzimas capaces de fosforilar , que participan en diversas funciones celulares como el crecimiento, proliferación, movilidad, supervivencia celular y tráfico intercelular (Fiona et al, 2003). Se encuentra mutado en varios tipos de cáncer (Tabla 8).

En el CPCNP se han encontrado mutaciones en un 1-3% (Samuels Y et al, 2004). Son más frecuentes en carcinoma escamoso frente al adenocarcinoma y ocurren tanto en fumadores como en no fumadores. Además, estas mutaciones pueden coexistir con mutaciones de *EGFR*. Hoy en día se conoce que la vía *PIK3CA/AKT/mTOR* tiene un papel fundamental en el metabolismo, crecimiento y supervivencia de la célula neoplásica (Figura 46). Esta vía puede presentar alteraciones activadoras o de pérdida de función que desencadenan la activación constitutiva de la vía. Sin embargo el papel de estas

Tabla 12.- Porcentaje de mutación *SOX2* en diferentes tumores

Primary Tissue	% Mutated
NS	0
Autonomic ganglia	0
Breast	0,10
Central nervous system	0
Endometrium	0,44
Haematopoietic and lymphoid tissue	0
Kidney	0,22
Large intestine	1,43
Liver	0
Lung	0,47
Oesophagus	0,58
Ovary	0
Pancreas	0,27
Prostate	0
Skin	0,58
Upper aerodigestive tract	0
Urinary tract	0,96
Total	0,29

□

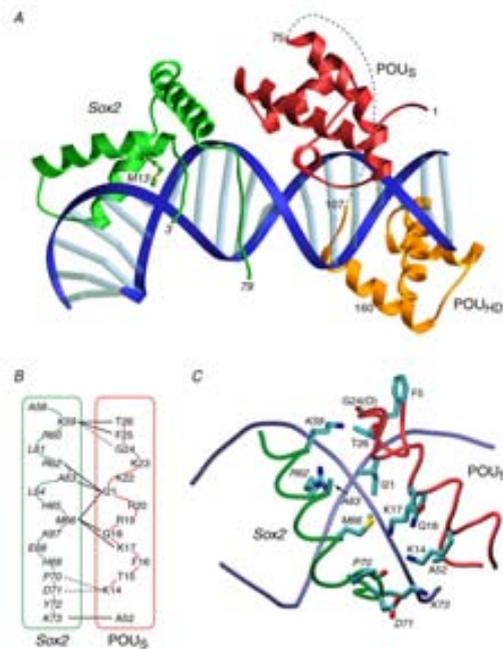
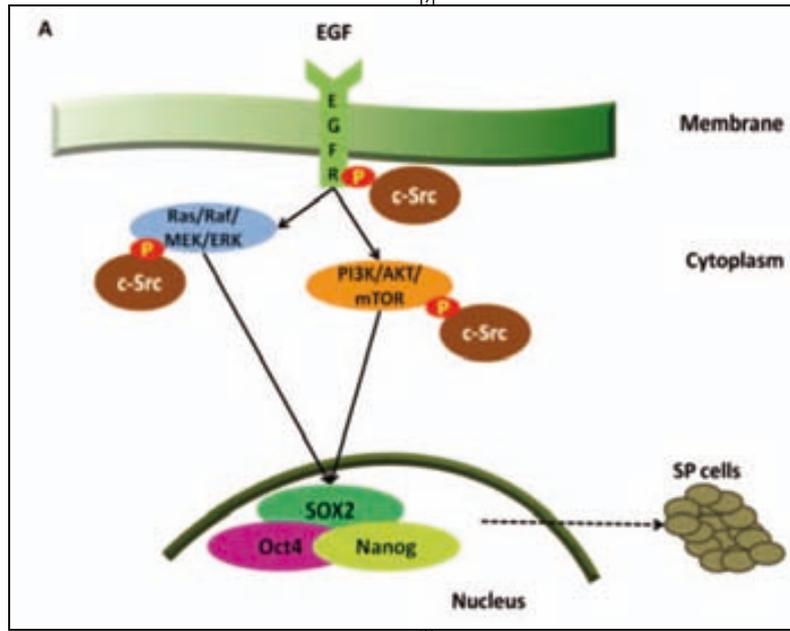
*J. Biol. Chem.* (2004)

Figura 47.- Estructura tridimensional SOX2

La expresión de *SOX2* se ha descrito en el CPCP, tanto en adenocarcinoma como en carcinoma escamoso de pulmón, siendo más frecuente en este último ya que al parecer *SOX2* se correlaciona con marcadores de diferenciación escamosa como por ejemplo TP63 y Keratin 6A (KRT6A) (Bass et al, 2009). Asimismo, la expresión de *SOX2* es menos frecuente en adenocarcinomas que en carcinoma escamoso, cuando aparece en estadios I de adenocarcinoma se asocia con peor pronóstico (Sholl et al, 2010). La amplificación de *SOX2* y la consecuente sobreexpresión proteica representa un importante mecanismo de iniciación tumoral y progresión en muchos carcinomas escamosos (Maier et al, 2011) (Tabla 12). Diversos datos sugieren que *SOX2* puede ser un gen importante que active diferentes cascadas involucradas en la progresión tumoral y mantenimiento del estado indiferenciado del mismo. En el caso de cáncer escamoso de pulmón se ha descrito que entre un 20-60% presenta sobreexpresión; se cree que este rango tan amplio es debido a la variación que existe entre las diferentes técnicas de laboratorio utilizadas y a la heterogeneidad tumoral (Sasaki et al, 2012).

Se ha visto que en el carcinoma escamoso de pulmón suele presentar la región genómica 3q amplificada, comprometiendo diferentes genes como *PIK3CA*, *DCUN1D1* (Figura 48) pero recientes datos aportan evidencia de que la amplificación de *SOX2* en esta región es fundamental para la biología del tumor (Hussenet et al, 2010).

Toschi et al evaluaron el número de copias de *SOX2* y *FGFR1* por *FISH* en 447 piezas resecaadas, para investigar su relevancia y pronóstico. Informaron que el número de copias de estos dos genes suele encontrarse alto en los carcinomas escamosos y que *SOX2* representaba un factor pronóstico positivo en estadios precoces de CPCNP resecaado (Toschi et al, 2012). También observaron que niveles altos de amplificación de *SOX2* predecían mejor la diferenciación del grado histológico con características clínico-patológicas favorables en carcinoma escamoso de pulmón y al parecer mejor supervivencia, pero los datos todavía no son concluyentes (Wilbertz T et al, 2011).



2, 2ahs2nda 2s2y a“ 222a 22 22h22, 2A72DRFX2

2 dDl n246x277 Onert772 2t 2

2

2ol 2d o2T do2Y 2 bATu.u222 22i 222 2ú2 b2l.ti luou24ou2.uó 2e.nou22i 2nAbni l 22i 2
 4n2a pb2 24mi uó2 b2t.di bn. 2b.ti Tu2a Au2 Tou22i 2 34i u.pb22i 222 222 2 b222222Pmi 2 b2
 22222 2021i b2 22 22i2 w2x27

2ol 2b 2b bó2Y2odou2 uóu22i 2ou2me.ili b2Pmi 222 222 2ái bi 2nb2 2b l 24lobpu2no2Y2i lo2
 d d 2T 2 2 22i nmi bn. 22i 2a 4Tcn n.pb22i 222 222Y2 uóu22i 2ou22i bi b2Pmi 22i l 2nobcla 2ou2
 nob2 Au2 uó2m2.ou222 l n1 Tom2 22 22i2 w2x27 uó 2 2a oa i bó2Y2m2 4i 22b2 2u2A22i cb.do2R2
 bo23.u2 b22Al a 2nou22u4i n2c nou22nob2 272 222 27

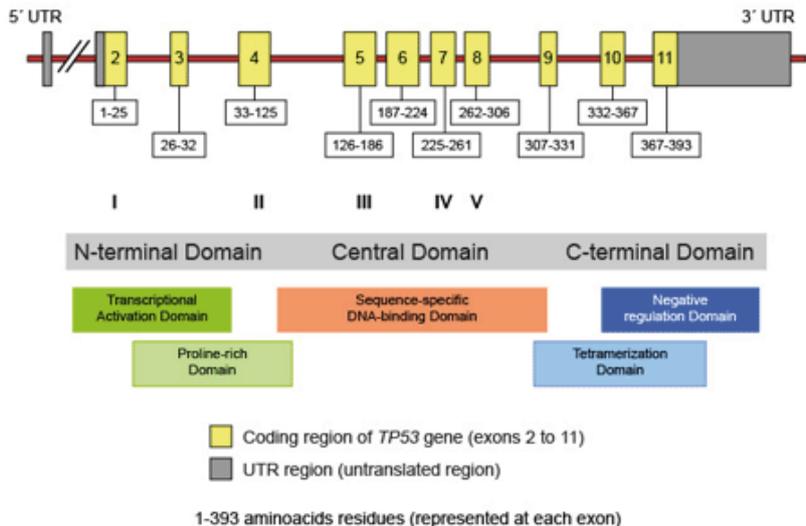
Vx 2x277 2mu2

22ei b22um24i uol 22di 222a oli u222 22KF22i u2T 2d. b 22a Au22di nmi b2 22di 2 22i l nobi u2
 ei bé2n u2022o12i 22 22i2 w2x27Pmi 2nobdmi b2 2T 2d bu2ola n.pb22a Teb 22di 2T u22né2T2i u2
 i 4.2T Tu2Y2T 2bt upb22di 222 2dou2 dR ni b2u2RY2cb 2a i b2 22di 22bu22e beTou2T2bcA2nou2R2
 a i 2Au2 u.u2 2d.uó bn. 222od.cn 2nb 24lo2 2b 22di 2k; 2a .boAn.dou22nob22di u22do2a .b.ou2
 d.uób2ou222.eml 2 kx27222lo2a .b.o22i 22 bu n2t n.pb2 222ob22i 22i 24lodmi 2T 2a od.cn n.pb2
 4ou22i bunl.4n.ob 24ol 24lo2 2b u22 Tu222oa o22222 2b22 222 2ú22m2 22 22i2 j; x27222lo2a .b.o2
 di 2nb.pb2 272 222Y22od.cn do2ol 22u2 23obi u22i 222 22Y2i noboni 2nb 22i nmi bn. 2b2 22lo2a o22l 2

di mb t l.i.d ddi eibi u2a 4Tn dou bT i 4 l n.pbd i T2 2 2 Y bT di á bn.pbd i Tn.nT2
 ni Tnl l2 bT 2 4o4óu.u24úw2j ñ ñ / Y2 u22 3Y2j βR2d ou222i tlilo2 ó2 Y2ij j j xp22
 a in b.ua o2l.a old. T2i u4obu Í T2i T2 mbn.pbd i uol 2 u2T 2 nót.d d2i bunl.4n.ob T2
 ui nmi bn. ñ u4in7cn 22T2oa .b.o22ñ la .b T2 u2i u4obu Í T2i T2 Teoa il.6 n.pbd i T2
 li emT n.pbd i e ót 2di T2 24loá 2 22i tlilo2 ó2 Y2ij j j xp22 22nobd.nobi u2bola T u2T 2
 4loá 2 24% 2i 2mbi 2 T2 2ñ.Pmáb 2Te u 22 22 ú2R2 u2 A4.d a ibá 2di el d d 22T2nb u2
 uóm nobi u2di 2 u2éu2ni Tnl l2Od fo2 b2 T22 2 2 2 2 boa T2 u2di Tn.nT2ni Tnl l2T 2l.4o3. x2
 Í T2Pmi T2 mb.pbd i 22 22 ú2 24% Y2Pmi 22 nobóbm n.pbd i Teoa il.6 2 mb2i d Aa ilo2 náo2
 02i 1a b2 ó2 Y2ij wúxp2

2

Structural organization of TP53 gene and p53 protein



2

Arr iNt t t .hnh 22d, "N2

2 dDl n24722FMDvMDl n2229- 2

2

2 u2a mó nobi u2di T2i b22KF2 uóAb24li ui bó u2 b2 T2' < 2di 22ou2ma oli u2di 22m2a pb2
 ui el b2T2 2í ui 2di 2d 2óu222222 22222olÍ i u2i ó2 Y2ij wj xp22 2a Rol 7 2di 2 T2 u2i uóAb2 b2 T2
 doa .b.o2di mb.pbd 22222Pmi 2i b2T2ne l2 2mb 24loá 2 2 uó Í T2 22 2óu2i ni bó u2bd.n b2
 ó a Í.éb2Pmi Y2 di a Au2di T2 2 bml n.pbd i T2 u2mbn.ob i u2am4li uol u2di 22ma ol Y2 T2nb u2di 2
 i uó u2a mó nobi u2nobcili b2bni t u2mbn.ob i u2 T2 24loá 2 24% 2a mó d 22(e b bn. 2di 2

, ' 2

función, GOF") que contribuyen a la progresión del tumor (Xu et al, 2011). Mecanismos de p53 mutado GOF incluyen la interacción con otras proteínas que promueven la progresión del cáncer (tales como NFkB) o la resistencia a fármacos (Do et al, 2012).

La determinación de mutaciones de *TP53* por técnicas estándar, tales como PCR, más secuenciación de Sanger o polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) requieren una gran cantidad de material que a menudo sólo está disponible en los tumores resecados. Por esta razón, la mayoría de los estudios sobre el papel del estado de *TP53* como marcador predictivo o pronóstico en el CPCNP se han realizado en pacientes en estadio I-III. El pequeño número de pacientes incluidos en alguno de estos estudios, las diferencias en el seguimiento y los distintos criterios utilizados para clasificar las mutaciones de *TP53* han dado lugar a resultados contradictorios. Este último aspecto es particularmente importante, ya que la heterogeneidad de las mutaciones *TP53* se ha demostrado que se correlaciona con los resultados clínicos heterogéneos de manera similar, en otros tipos de tumor. Por ejemplo, las mutaciones disruptivas se han asociado con una peor supervivencia global en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (Poeta et al, 2007) y las mutaciones 'missense' en el dominio de unión a DNA se correlacionan con un peor supervivencia sustancialmente en la leucemia linfocítica crónica y carcinoma de mama (Trbusek et al, 2011; Végran et al, 2013).

En nuestro centro hemos analizado un total de 318 pacientes con CPCNP avanzado, 125 sin mutaciones de *EGFR* tratados con quimioterapia y 193 con *EGFR* mutado tratados con Erlotinib. Se ha podido demostrar que los pacientes portadores de mutaciones de *TP53* constituyen dos subgrupos pronósticos distintos. Sólo las mutaciones no disruptivas del gen *TP53* presentan peores datos de supervivencia, independientemente del estado mutacional de *EGFR* y el tipo de tratamiento recibido.

2.4.- OTROS REGULADORES DE LA TRANSCRIPCIÓN

2.4.1.- *AEG1*

Es un oncogén multifuncional que juega un papel fundamental en varios procesos carcinogénicos, incluyendo la supervivencia bajo condiciones de estrés como lo que ocurre con la quimioterapia (Sarkar et al, 2009). Diversos estudios han identificado homólogos de *AEG-1* en rata y ratón proporcionado evidencia de una implicación en la progresión del cáncer y desarrollo de metástasis (Britt et al, 2004).

La sobreexpresión de *AEG-1* puede activar varias vías de señalización, incluyendo la vía del *AKT*, del factor nuclear κB (*NF- κB*) y las vías de *Wnt*/ β -catenina, estimulando la proliferación tumoral, invasión y quimiorresistencia. La sobreexpresión de este gen activa la vía de *PI3K/AKT*, inhibiendo la apoptosis. A través de *PI3K/AKT*, *AEG-1* también activa *IKK*, que fosforila y desestabiliza al inhibidor de *NF- κB* , *NFKBIA* (también conocido como *IKB*), activando de este modo *NF- κB* (Emdad et al, 2009) que está implicado en la muerte celular (Figura 50).

Su significado funcional no queda del todo claro en el CPCNP. Recientes estudios han descrito su papel esencial en la carcinogénesis de estos tumores, pudiendo inhibir la apoptosis activando vías de señalización de supervivencia celular (incrementando el nivel de antiapoptosis de la proteína Bcl-2 y activando la vía de *PIK3CA/AKT*, tal y como ya se ha comentado (Figura 50) (Ke et al, 2013).

La desregulación de *EZH2* contribuye a la aparición y desarrollo de varios tumores, incluyendo el de pulmón, mama, próstata, páncreas, ovario, glioma, linfoma y sarcoma (Chang et al, 2011). Sin embargo, las funciones exactas de *EZH2* y su mecanismo de acción en detalle no es del todo conocido por lo que requiere investigaciones más profundas.

2.4.3- *HES1*

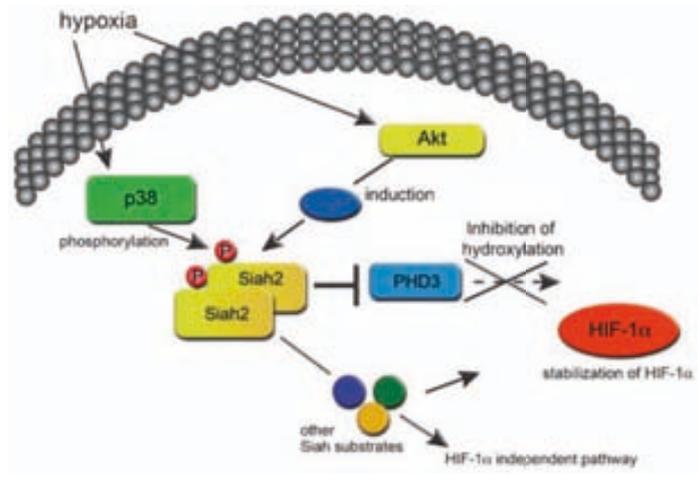
Es una proteína que está codificada por el gen *HES1*, homólogo de mamífero del gen de *Drosophila*. Forma parte de los siete miembros de la familia de genes *hes* (*HES1-7*). Estos genes codifican proteínas nucleares que suprimen la transcripción (Kageyama et al, 2007), por lo tanto es un represor de transcripción de varios genes. *HES1* no está implicado en el mantenimiento del estado indiferenciado de la células madre (*stem cells*) pero juega un papel importante en la diferenciación de estas células, por lo tanto, influye en la proliferación y la diferenciación celular durante la embriogénesis (Taeko et al, 2010). Regula su propia expresión a través de un bucle de retroalimentación negativa que oscila aproximadamente entre 3-5 horas. Se ha demostrado que *HES1* desempeña un papel importante en el sistema nervioso y en el sistema digestivo a través de la vía de señalización de Notch. Diferentes niveles de *HES1* pueden indicar diferencias en las características entre los elementos anatómicos del sistema nervioso central y digestivo (Kageyama et al, 2007).

HES1 también juega un papel importante en la vía de señalización de *NOTCH* (Taeko et al, 2010). *NOTCH* es una proteína que regula el mantenimiento de varios tipos de células madre. Mediante la interacción con ligandos de *NOTCH* como Deltalike1 (*Dll1*) y Jagged1 (*Jag1*), la proteína *NOTCH* de trans-membrana es rota por la enzima c-secretas y el dominio intracelular de *NOTCH*es liberado (*NICD*). *NICD* se transloca al núcleo formando un complejo con las proteínas ligadoras de DNA e induce la expresión de efectores tales como los genes represores transcripcionales *HES1* y *HES5* (Kageyama et al. 2007). Así *HES1* y *HES5* inhiben la expresión de genes implicados en la diferenciación de células madre o progenitoras.

Vx4.27777 t

l.ouú úrd.ouúbd.n bPmi T uTe u uáí n. Pmáb 2ni e b3b4 4i Th 6no3 bT 2
li u4mi uó 2 T 1.4o3. 2i Th l qbbdi 2 Tb u2222222 u3b3 i emf dol 2a 4ol ó bá 2i T u7 u2
ui bdo2 nát do3 b3.ám nobi uáí 2.4o3. qbb3.n1 u3.ám nobi u2222222n. Pmáb 2222; 2
i u3b3 i emf dol 2ie áto2i T 2 uó Í.Td d2i T3 nóol 2i 2i bunl.4n.pb22 22wÓq22i um6 do2
i u2 2 nna mT n.pb2i 22 22wÓR2T 2hobu.emi bá 2uó l i 34li u pb2i 22u3i bi u3i T n.ob dou2
nob2.4o3. q

2 2 2 i u4mi uó 2 T 1.4o3. 2i Th l 2bt oTml 2a I 24T u7 u3i 2i f T6 n.pb2bn7m2 2
T 27 2i 222222Pmb u 22 2222222 ó 2 22 22ij j úx22i 2i 2b í uilt do2Pmi T 2bdmn.pb24ol 2
1.4o3. 2di 2T 2i 34li u pb2di 2222222202.emf 2%ix2ui 2i 2Pmi 24ol 2i 22d ó a .i b3o2nob2mb2
.b1.Í.dol 2i 2222222i boa .b do222úkJ j j úPmi 2a Í.éb2l.ua .bnRi 2T 2nát.d d2i 2222222ol 2
i Thob2 l.o2222222i 2bdmi 2m bdo2T 2ola 2nát 2i 2222222i 2b2 odmi 2b2T u3é mT u2ol 2
226 b3o22T 2nát n.pb2i 2222224ol 21.4o3. 2i i 7 2rb 2di 2T u2i f T u2n 4 62di 2bdm.l 2T 2
i 34li u pb2i 22222222q



2 d272a 22 22h2 DDPX2

2 dDl n9V277 BmP nE2222 t 2

2

2222222i bi 2rb 2mbn.pb2a 4ol ó bá 2b3 2i u lloTb2R2T 24loeli u pb2ma ol 2b 2R2
noa o2i 2i 2b í uilt do2 b2 ThAbnli 2di 24Abnli u2 b3ma oli u2i 2a a 2R2 b2a odi 2u2di 2
l óbi u3ob2a i Tboa 22 - R a 2 22 22ij j kx24ol 2rb 2a l á 2i Í.do2 T 1.4o3. 2bn 2Pmi 2

βú2

producen los tumores y la activación de múltiples vías de señalización que responden a estas situaciones. *SIAH2* regula la tumorigénesis y el desarrollo de metástasis actuando sobre diferentes vías como *SPRY/RAS* o *PHD3/HIF*. A la luz de estos hallazgos se requieren más estudios para plantear el desarrollo de inhibidores de *SIAH2*.

2.5.- REPARADORES DNA

2.5.1- *BRCA1* y *RAP80*

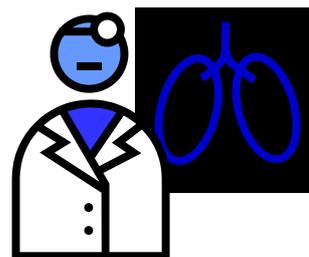
Son dos genes supresores de tumores que regulan el ciclo celular y evitan la proliferación descontrolada. Las proteínas, productos de estos genes, forman parte del sistema de detección y reparación de los daños de DNA.

Alteraciones de estos genes están implicadas en algunos tipos de cáncer (por ejemplo el cáncer de mama, donde mutaciones de *BRCA1* se asocian al cáncer hereditario). Estas alteraciones causan que la célula no sea capaz de reparar los daños de DNA, que se acumulan produciendo descontrol en el crecimiento celular dando lugar a un tumor.

BRCA1 y *RAP80* forman un complejo que repara los daños celulares producidos por irradiación, quimioterapia, etc y juegan un papel esencial en la respuesta celular ante dichos daños (Figura 53) (Rosell R et al, 2010).

Asimismo se cree que estos genes confieren diferente sensibilidad a la irradiación y a los citostáticos que dañan el DNA como los platinos y los antimicrotúbulos. Por eso, se han hecho varios estudios clínicos donde se han randomizado los pacientes en función de los niveles de ambos genes, permitiendo individualizar el tratamiento. El más reciente ha sido el estudio BREC donde se han incluido 480 pacientes, pero los resultados no han sido concluyentes (estudio BREC, 2013).

Estudios recientes del complejo *RAP80/CCDC98/Abraxas* y *RNF8* han descubierto una compleja cascada de eventos (Figura 53) en los que varias modificaciones después de la traducción, incluyendo la fosforilación y la ubiquitinación, contribuyen con las funciones de *BRCA1*, que desempeña un papel clave en la respuesta al daño celular y es de



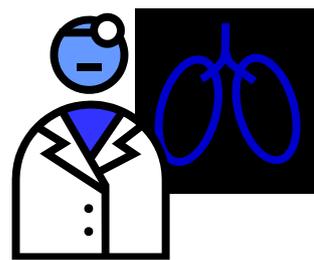
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS:

“Desde el punto de vista molecular, el carcinoma escamoso de pulmón constituye una entidad diferenciada del adenocarcinoma”

OBJETIVOS:

1. Realizar una caracterización molecular del carcinoma escamoso de pulmón analizando mutaciones, amplificaciones y niveles de expresión de genes clave.
2. Analizar el posible valor pronóstico de dichos rasgos moleculares en este subtipo histológico.
3. Identificar marcadores moleculares útiles para predecir respuesta a la quimioterapia y terapia dirigida en el carcinoma escamoso de pulmón.
4. Definir una firma con valor predictivo de respuesta o pronóstico que integre diversos rasgos genéticos.



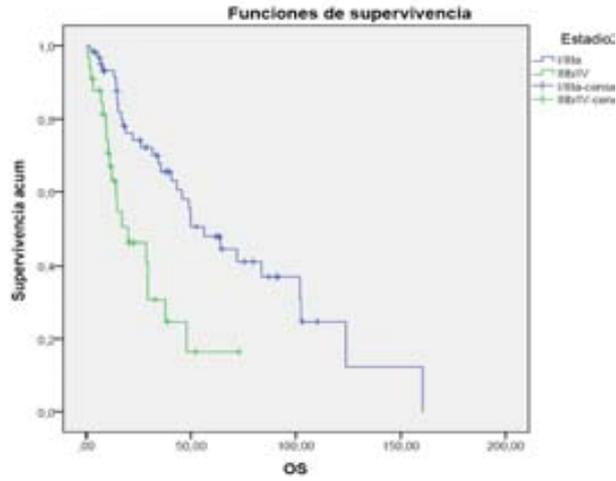
MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- PACIENTES

Se incluyeron 95 pacientes diagnosticados de carcinoma escamoso de pulmón del Hospital Universitario Quirón Dexeus y del Hospital Universitari General Germans Trias i Pujol. De todos ellos se recogieron los datos clínicos de edad, sexo, *performance status* (estado general), habito tabáquico, estadio clínico y TNM al diagnóstico (Tabla 13).

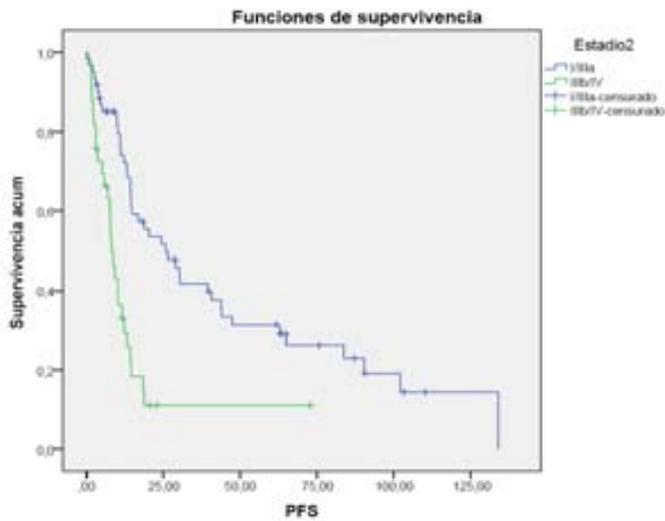
Tabla 13.- Características clínicas de los pacientes incluidos en este estudio

PATIENTS (n=95)	N (%)
Median age (range)	64 (47-80)
Gender	
Male	83 (87,4)
Female	12 (12,6)
PS	
0	34 (35,8)
1	54 (56,8)
2	4 (4,2)
3	1 (1,1)
Unknown	2 (2,1)
Smoking status	
Current smoker	19 (20)
Former smoker	72 (75,8)
Never smoker	4 (4,2)
Stage	
I	27 (28,4)
II	12 (12,6)
IIIA	23 (24,2)
IIIB	12 (12,6)
IV	21(22,1)
TNM	
M1	18 (18,9)
T1-2/N0-1	31 (32,6)
T3-4/N2-3	44 (46,3)
Unknown	2 (2,1)



Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Estadio2	Media ^a				Mediana	
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico
			Límite inferior	Límite superior		
I/IIIA	70,368	8,578	53,553	87,179	56,267	10,352
IIIB/IV	28,133	4,917	18,496	37,771	20,033	7,959
Global	59,368	7,026	45,596	73,136	43,133	7,009



Medias y medianas del tiempo de supervivencia

Estadio2	Media ^a				Mediana	
	Estimación	Error típico	Intervalo de confianza al 95%		Estimación	Error típico
			Límite inferior	Límite superior		
I/IIIA	46,026	6,549	33,190	58,862	25,833	6,678
IIIB/IV	15,251	3,889	7,629	22,874	8,067	,876
Global	36,103	5,021	26,262	45,944	14,200	1,581

Figura 54.- OS y PFS por estadio (I-IIIa frente IIIB-IV)

3.2.- OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Como ya se ha comentado en el apartado 3.1, los pacientes recogidos en este estudio provenían de dos centros. De manera coordinada, los patólogos de ambos centros hicieron una selección de las muestras a estudiar. Todas ellas se encontraban fijadas en solución convencional de formalina con posterior inclusión en parafina. Para llevar a cabo la valoración, se utilizaron los criterios definidos en el punto 3.2.1.

3.2.1.- Valoración del patólogo

A partir de un corte del bloque teñido con Hematoxilina/Eosina (H/E), las muestras fueron valoradas al microscopio de campo claro por el patólogo. Se realizó una valoración cuantitativa (porcentaje de infiltración tumoral, estroma, necrosis e infiltrado inflamatorio), cualitativa y de tipo de disección.

Valoración cuantitativa

- Adecuado: se consideró adecuado para el análisis de mutaciones, *copy number* y expresión de mRNA cuando hubo un 20% de células tumores en la muestra.
- Material insuficiente: se consideró material insuficiente, en el caso del análisis de mutaciones, cuando el tejido contuvo menos de 8 células tumorales y, en el caso de expresión de mRNA, cuando hubo menos de un 5% de infiltración tumoral.

Se definió el porcentaje de infiltración tumoral, estroma, necrosis e infiltrado inflamatorio, en todos los casos.

Tanto para los análisis de mutaciones, *copy number* o expresión de mRNA, se procesaron las muestras “adecuadas” .

Valoración cualitativa

El patólogo responsable indicó si en el tejido a examinar era posible distinguir las células tumorales de las zonas no neoplásicas, o si por artefactos u otras incidencias de fijación o de procesamiento del tejido no era posible realizar dicho análisis.

- Valorable: era posible distinguir las células tumorales de las áreas no tumorales y era posible realizar un informe anatomopatológico con el diagnóstico adecuado.

- No valorable: no era posible distinguir las células tumorales de las áreas no tumorales y no era posible realizar un informe anatomopatológico con el diagnóstico adecuado.

Microdissección/Macrodissección

En el mismo corte donde se realizó la valoración de la muestra, se seleccionó la zona a macro/microdissecar (Figura 55). Cuando el porcentaje de infiltración tumoral fue inferior al 85% se procedió a microdissecar, en los casos en los que fue superior, se macrodisecó.

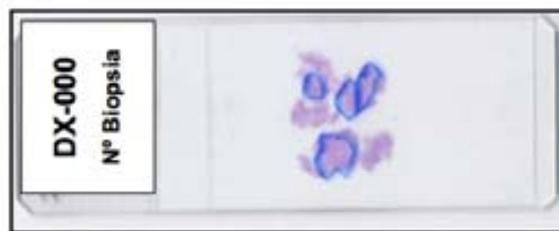


Figura 55.- Imagen de una valoración por patólogo sobre una H/E

3.2.2.- Micro/macrodissección

En el caso de la microdissección, se utilizó el sistema laser de Palm, Oberlensheim (Germany). En el caso de la macrodissección, ésta se realizó utilizando una punta de pipeta y rascando la zona de interés.

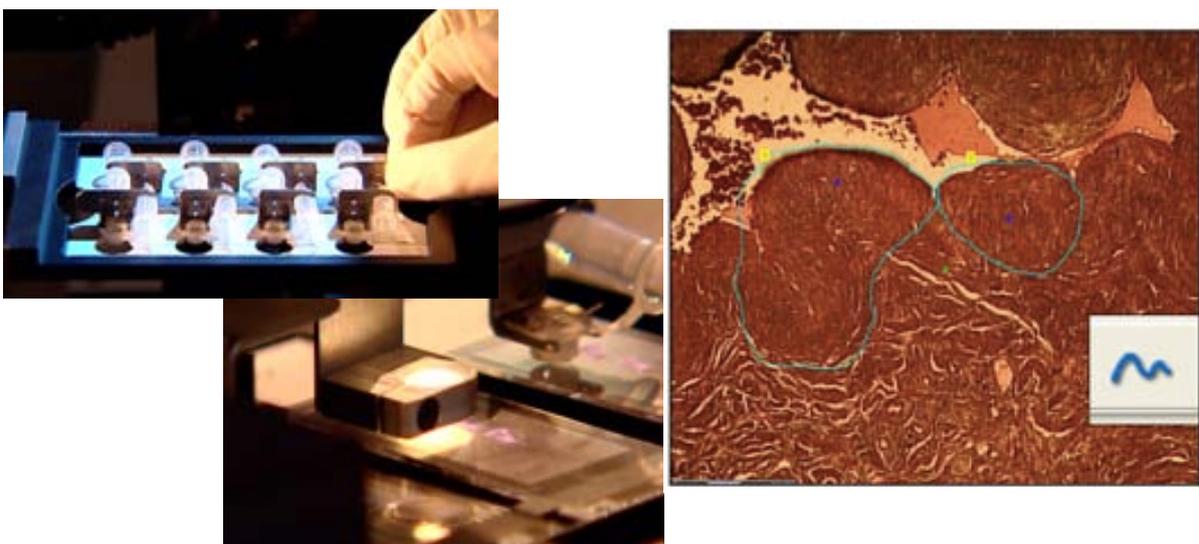


Figura 56.- Imagen de la platina de microdisector y de un dibujo realizado sobre una muestra

En el caso de las muestras para análisis de mutaciones, el producto de microdissección obtenido se resuspendió en 20 μ L de PCR buffer (Ecogen, Barcelona, Spain) con proteinasa K y se incubó entre 4 horas y ON a 60°C. Posteriormente, se pasó a inactivar la proteinasa incubando la muestra a 95°C durante 10 minutos.

En el caso del producto microdisecado para el estudio de expresión de mRNA y el análisis del número de copias génicas por MLPA, éste se resuspendió en 200 μ l de solución de digestión (SDS, EDTA y Tris) e incubó a 60°C durante 16 horas.

3.3.- ANÁLISIS DE MUTACIONES

3.3.1.- Análisis de mutaciones en exones 19 y 21 de *EGFR*

El análisis de los exones 19 y 21 del gen *EGFR* se realizó mediante PCR, seguido de análisis del fragmentos (deleciones del exón 19) o discriminación alélica (mutación puntual L858R en el exón 21).

Los *primers* utilizados en la PCR inicial se describen a continuación:

Exón 19

F: 5' GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC 3'

R: 5' CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG 3'

Exón 21

F: 5' CTAACGTTCCGCGCCATAAGTCC 3'

R: 5' GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG 3'

Como controles positivos internos de la técnica, se utilizaron DNA de la línea celular PC9, como control mutado del exón 19 y como wt para exón 21. El DNA de la línea celular H1975 fue utilizado como control wt para el exón 19 y como control mutado para el exón 21.

Con un volumen final de 50 μ L, las concentraciones de los reactivos de la PCR fueron: 2U de Ecotaq Polimerase (Ecogen, Barcelona, Spain), 7,5 μ L de PCR buffer x10, 250 μ M de dNTPs, 3.5 mM MgCl₂ y 0.5 pmol de cada primer. La amplificación fue de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 64°C y 1 minuto a 72°C.

En el caso del análisis del exón 19, se emplearon 2 ul del producto de 1ª PCR en una segunda amplificación, utilizando los siguientes *primers*:

F: 5'-ACTCTGGATCCCAGAAGGTGAG-3'

R: 5'-FAM-CCACACAGCAAAGCAGAACTC-3'

La amplificación fue de 32 ciclos (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C). Con un volumen final de 50 µL, las concentraciones de los reactivos de la PCR fueron: 1U de Ecotaq Polymerase, 250 µM dNTPs, 1 mM MgCl₂ y 0,5 pmol de cada primer.

Una vez acabada la PCR, 1 µL de una dilución 1/50 a 1/200 del producto amplificado, fue mezclado con 0,25 µL del estándar GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems) y desnaturalizado en 9 µL de formamida a 90°C durante 5 minutos.

Posteriormente, la mezcla fue introducida en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) para su separación por fragmentos. Los datos recogidos fueron evaluados con el software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

En el caso de análisis del exón 21 (L858R), 1 ul del producto de PCR se analizó mediante un ensayo de discriminación alélica usando sondas TaqMan (Applied Biosystems). Los *primers* y las sondas empleados se describen a continuación:

F: 5' AACACCGCAGCATGTCAAGA 3'

R: 5' TTCTCTTCCGCACCCAGC 3'

Sondas 5' FAM CAGATTTTGGGCGGGCCAAAC TAMRA 3'

5' VIC TCACAGATTTTGGGCTGGCCAAAC TAMRA 3'

La amplificación se realizó en un volumen de 12,5 µL, 6,25 µL de Taqman 2x Master Mix (Applied Biosystems), 7,5 pmol de cada primer y 2,5 pmol de cada sonda. Las muestras fueron sometidas a 40 ciclos de 15 segundos a 94°C y 1 min al 60°C, usando el equipo 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems).

3.3.2.- Análisis de la mutación de *EGFR* T790M pretratamiento

Para el análisis de la mutación de *EGFR* T790M fue necesario un mínimo de 4,5-5 ng of DNA/ μ L, usando en todos los casos dos microdisecciones independientes por paciente. El extracto celular se analizó mediante un ensayo de discriminación alélica usando sondas TaqMan, en presencia de una sonda PNA específica (es una sonda peptídica que se une de manera específica al DNA), que está diseñada para inhibir la amplificación del alelo wt. Los *primers*, sondas y PNA utilizados fueron los siguientes:

F: 5' AGGCAGCCGAAGGGCA 3'
R: 5' CCTCACCTCCACCGTGCA 3'
Sondas: 5' VIC CTCATCACGCAGCTCATG MGB 3'
5' FAM CTCATCATGCAGCTCATG MGB 3'
PNA: 5'-TCATCACGCAGCTC-C 3'

La amplificación se hizo en un volumen final de 12,5- μ l donde se incluyó 1 μ l del extracto celular, 6,25 μ l de TaqMan 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems), 7,5 pmol de cada primer, 2,5 pmol de cada sonda y 6,25 pmol de PNA.

Las muestras fueron amplificadas durante 50 ciclos a 15 segundos a 94°C y 1 minuto a 60°C, en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Todas las muestras fueron analizadas por cuatriplicado, por lo tanto, todos los tumores fueron analizados ocho veces. En paralelo, las muestras también fueron amplificadas sin la presencia de PNA para confirmar la presencia de DNA. Como controles internos se utilizó DNA de PC9 como control negativo y DNA de H1975 como control positivo (mutado). Una muestra se consideró positiva en el caso en que al menos 1 de las 8 réplicas presentara amplificación de T790M en presencia de PNA.

3.3.3.- Análisis de las mutaciones de *PIK3CA*

Para el análisis de estas mutaciones *hotspots* de *PIK3CA* incluidas en este estudio, se utilizó un ensayo de discriminación alélica mediante sondas TaqMan, utilizando para ello las sondas y los *primers* descritos a continuación:

POSICIÓN E542K (G1624A) EXON 9

F: AAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTAC
R: ACTCCATAGAAAATCTTTCTCCTGCT
Sondas: **mut:** 5' FAM CCTCTCTCTAAAATC 3'
wt: 5' VIC TCCTCTCTCTGAAATC 3'

POSICIÓN E545K (G1633A) EXON 9

F: CAAAGCAATTTCTACACGAGATCCT
R: CACTTACCTGTGACTCCATAGAAAATCTT
Sondas: **mut:** 5' FAM TCTGAAATCACTAAGCAGGA 3'
wt: 5' VIC TGAAATCACTGAGCAGGA 3'

POSICIÓN H1047R (A3140G) EXON 20

F: GCAAGAGGCTTTGGAGTATTTCA
R: GAAGATCCAATCCATTTTTGTTGTC
Sondas: **mut:** 5' FAM TGATGCACGTCATGGT 3'
wt: 5' VIC ATGATGCACATCATGGT 3'

La amplificación se hizo en un volumen final de 12,5- μ l donde se incluyó 1 μ l del extracto celular, 6,25 μ l de Taqman® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), 0,6 pmol de cada primer y 0.2 pmol de cada sonda. Las muestras fueron amplificadas durante 50 ciclos a 15 segundos a 92°C y 1:30 minutos a 60°C, en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

El DNA de la línea celular NCI-H460 se utilizó como control mutado (mutación puntual E545K) y DNA de H1975 como control wt. Además, en el ensayo se incluyeron otros controles internos positivos para las posiciones E545K, E542K y H1947R.

Las mutaciones detectadas por el ensayo de discriminación alélica se confirmaron por secuencia directa, utilizando el kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems),

siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el software Sequencing Analysis 5.3.

3.4.4.- Análisis de las mutaciones de *K-RAS*

Las mutaciones de los codones 12-13 de gen *K-RAS* fueron examinadas utilizando la técnica de HRM (Applied Biosystems).

La reacción de amplificación fue de 50 ciclos en un termociclador standard (30 seg a 94°C, 30 seg a 51°C y 1 minuto a 72°C). El proceso de disociación se realizó en una 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 10 seg a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 seg a 95°C (con una rampla de un 1%) y un ciclo final de 15 seg a 60°C.

La amplificación se realizó siguiendo las recomendaciones de la casa comercial: 20 µl de volumen final donde 10 µL son de Melt Doctor™ HRM Master Mix, y 1.2 µl de *primers* (stock 5uM). La secuencia de los *primers* utilizados se describe a continuación:

F: ACATGTTCTAATATAGTCACATTTTCA

R: GGCCTGCACCAGTAATATGCA

El DNA de la línea celular NCI-H23 fue utilizado como control mutado (G12C) y el DNA de la línea H1975 como control wt.

Las mutaciones detectadas por HRM se confirmaron por secuencia directa, utilizando el kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el software Sequencing Analysis 5.3.

3.3.5.- Análisis de las mutaciones de *BRAF*

Se hizo un *screening* de la mutación *hotspot* V600 del gen *BRAF* utilizando un ensayo de discriminación alélica mediante sondas TaqMan. Los *primers* y las sondas utilizadas para el mismo se describen a continuación:

F: CTACTGTTTTCTTTACTTACTACACCTCAGA
R: ATCCAGACAACTGTTCAAAGTATG
Sondas: **mut:** FAM TAGCTACAGAGAAATC MGB
wt: VIC CTAGCTACAGTCAAATC MGB

La amplificación se realizó en un volumen final de 12,5 µl, donde se incluyó 1µl de muestra, 6,25 µl de Taqman® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), 0,6 pmol de cada primer y 0,2 pmol de cada sonda.

Las muestras fueron amplificadas durante 50 ciclos, 15 segundos a 94°C y 1,5 minutos a 60°C, en una Applied Biosystems 7900HT Fast real-time cycler.

El DNA de la línea celular HT29 fue utilizado como control mutado (V600E) y el DNA de la línea H23 como control wt.

Las mutaciones detectadas por el ensayo de discriminación alélica se confirmaron por secuencia directa, utilizando el kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el software Sequencing Analysis 5.3.

3.3.6.- Análisis de las mutaciones de *TP53*

Para el análisis de las mutaciones del gen *TP53*, se utilizó la técnica de HRM, con la que se hizo un *screening* de los exons 5, 6, 7 y 8 del gen.

A partir de un 1-2 µl del extracto celular inactivado, se procedió a mezclarlo con 10 µl de Melt Doctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems), 0.3 µM de *primers* y, en el caso del exón 5b, 1 mM final de MgCl₂.

Los *primers* utilizados para el análisis de los exones 6 y 8 son los descritos en el artículo de Krypuy et al, (BCM Cancer, 2007). Para el análisis del exón 7 y 5 se utilizaron *primers* diseñados en el laboratorio de Pangaea Biotech, ya que los descritos por Krypuy et al. presentaban una baja calidad de amplificación en las secuencias derivadas del HRM. El listado de *primers* se recoge en la tabla 15.

DNAs procedentes de diversas líneas, y de las que se conoce el estatus de *TP53*, fueron utilizadas como controles positivos para cada uno de los exones. (Tabla 16).

Tabla 15.- Secuencia de los *primers* utilizados para cada exón

Exon	Forward	Reverse
5a	CACTTGTGCCCTGACTTTCA	AGCCATGGCACGGACGCG
5b	CTCCTGCCCCGGCACCCGC	CTAAGAGCAATCAGTGAGGAATCAGA
6	AGACGACAGGGCTGGTTGC	CAACCACCCTTAACCCCTCCT
7	CTGGGCCTGTGTTATCTCC	GGGTCAGAGGCAAGCAGA
8	GACCTGATTCCTTACTGCCTCTTG	AATCTGAGGCATAACTGCACCCTT

Se realizaron 50 ciclos de amplificación utilizando las siguientes condiciones; un ciclo a 95°C durante 15 minutos; 50 ciclos a 95°C durante 10 segundos; condiciones de annealing (Tabla 17) durante 5 a 20 segundos; y 72°C durante 20 segundos. El ciclo final de elongación fue a 72°C durante 7 minutos. Cuando no se observa amplificación por HRM, se repite el proceso en un termociclador convencional.

La disociación se realizó en un 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con un instrumento HRM-capable real-time PCR. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: 95°C durante 1 segundo, 72°C durante 90 segundos, y un HRM step rising de 72°C a 95°C subiendo 0.1°C por segundo.

Las curvas de disociación fueron analizadas usando el software Applied Biosystems HRM v2.0.

Tabla 16.- Líneas celulares utilizadas como controles internos de la técnica

Cell line	Genomic description ^a	Protein description ^a	exon
AU565	c.524G>A	p.R175H	5
NCI-H1781	c.469G>T	p.V157F	5
PC-3	c.414del1	p.K139fs*31	5
Calu-6	c.586C>T	p.R196X	6
BxPC-3	c.659A>G	p.Y220C	6
DLD-1	c.722C>T	p.S241F	7
PC-9	c.743G>A	p.R248Q	7
NCI-H23	c.738G>C	p.M246I	7
HT-29	c.818G>A	p.R273H	8
NCI-H1975	c.818G>A	p.R273H	8
H510	c.844C>G	p.R282G	8
SK-MES-1	c.892G>T	p.E298X	8
NCI-H460	wt	wt	
A549	wt	wt	

Los productos de HRM de las muestras mutadas y de las dudosas se secuenciaron para confirmar el resultado, utilizando el kit BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de secuenciación se analizaron en el ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el software Sequencing Analysis 5.3.

Tabla 17.- Condiciones de PCR

EXON	HRM		Standard PCR	
	Annealing time	Annealing temperature and cycles	Annealing time	Annealing temperature
5A	5 sec	65°-55° touchdown 1°C/cycle for 10 cycles	30 sec	55°
5B	5 sec	65°-60° touchdown 0.5°C/cycle for 10 cycles	30 sec	60°
6	5 sec	68°-58° touchdown 1°C/cycle for 10 cycles	30 sec	59°
7	5 sec	65°-60° touchdown 0.5°C/cycle for 10 cycles	30 sec	60°
8	20 sec	63.5°-58.5° touchdown 0.5°C/cycle for 10 cycles	30 sec	62°

3.3.7.- Análisis de las mutaciones de la *DDR2*

Para el análisis de las mutaciones descritas del gen *DDR2* se utilizó la técnica de Sanger Sequencing con la que se analizaron todas las posiciones en los exones 6, 9, 14, 15, 16 y 18.

Para la realización de las PCR se multiplexó la reacción, de forma que se generaron dos reacciones independientes. En la reacción M1, se incluyeron los oligos de los exones 9, 14, 15, 16 y en la reacción M2 se incluyeron los exones 6 y 18. En la tabla 18, están descritas las secuencias de los oligos y las posiciones de las mutaciones descritas en los diferentes exones.

A partir de la muestra obtenida mediante microdissección o macrodissección, se procedió a extraer el DNA. Para ello se sometieron a las células a un calentamiento y paralelamente a un tratamiento con EDTA y SDS (lisis celular). Posteriormente se realizó una extracción utilizando el método de fenol/cloroformo. El producto obtenido se resuspendió en buffer TE (Tris 10mM; EDTA 0.1mM ph 8.0) y se incubó durante 2- 3 horas a 37°C.

Entre 5-20 ng de DNA se utilizaron para la realización de la PCR, que como se ha comentado previamente, se realizó en dos mixes separadas. Con un volumen final de 25 µL, las concentraciones de los reactivos de la PCR fueron: 0,5U de Hot Start PCR Qiagen (IZASA, Barcelona, Spain), 2,5 µL de PCR buffer x10 que contiene una concentración de 1,5 mM MgCl₂, 250 µM de dNTPs, y 0,5 pmol de cada primer. La secuencia de amplificación, para las dos mixes, era de 95°C 5 minutos, seguido de 45 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 58°C y 30 segundos a 72°C, seguida de una elongación de 7 minutos a 72°C. Se procedió a la realización de un gel de agarosa al 2% y de aquellas muestras amplificadas se procedió a la realización de la purificación del producto de PCR mediante columnas (UltraClean PCR Clean Up Kit, MoBio Laboratories, Inc; Condalab, Barcelona).

Tabla 18.- Tabla descriptiva de las mutaciones del gen *DDR2*

EXON	SEQUENCE	SIZE AMPLICON	MUTATIONS		
6	F: 5' TACAGGGCAGCTGCTTGCT 3'	387	L63V	I129M	D125Y
	R: 5' CCTTCTTCTCCTAGCCTAAGTCAAAATATG 3'				
9	F: 5' CACGAATGTGTGGTAACTCAGATTT 3'	262	L239R	G253C	
	R: 5' CCCGACCCACTGACCTT 3'				
14	F: 5' GTCATGAAGCAGGTTAGGCTTTC 3'	231	G505S		
	R: 5' CCTCCTGTCACTCCTTGGAGG 3'				
15	F: 5' CAGGAAATGCCAGCAAGAG 3'	181	C508Y		
	R: 5' TCGGAGCATTTTCACAGCC 3'				
16	F: 5' TGATTCTGACTCTGGCAACTTCTG 3'	201	I638F		
	R: 5' GCGGGAAAGAACTGATTG 3'				
18	F: 5' TTCCTTGCCTGTGGTGGG 3'	215	T675P	S768R	G774E/V
	R: 5' CCTGTTTCATCTGACAGCTGGG 3'				

Con el producto purificado se procedió a la realización de la reacción de secuenciación. En este caso, se tuvo que realizar reacciones de PCR para cada uno de los exones descritos, con lo que a partir de M1 realizamos la secuenciación individual para exón 9, 14, 15 y 16, y lo mismo para M2. La reacción de secuenciación se realizó con el kit de BigDye Terminator v.3.1 de Applied Biosystems, siguiendo las instrucciones del kit.

Posteriormente, se procedió a la purificación del producto de PCR de secuenciación usando el kit BigDye Xterminator Purification Kit de Applied Biosystems, siguiendo las instrucciones facilitadas por el kit, y a continuación se pasó a realizar la electroforesis capilar en el secuenciador ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems para su separación. Los datos recogidos fueron evaluados con el Sequencing Analysis 5.2 Software (Applied Biosystems, Norwalk, CT).

3.4.- ANÁLISIS DE NÚMERO DE COPIAS DEL GEN MEDIANTE MLPA

Para el análisis de dosis génica de *FGFR1*, *SOX2*, *PIK3CA*, *PDGFR1a*, *KDR*, *AXL*, *EGFR* y *MET* se utilizó la técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).

A partir del tejido tumoral previamente micro o macrodisecado, se aisló el DNA. Para ello se incubó durante al menos 16 horas a 60°C en tampón TE (Tris clorhídrico 10mM, EDTA 0,1 mM pH 8.0) en presencia de proteinasa K. A continuación, se purificó el DNA mediante un método orgánico basado en fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguido de precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio 3M pH 4,6. Por último el DNA se resuspendió en tampón TE. La concentración y pureza del mismo se cuantificó espectrofotométricamente y se ajustó a una concentración final de 20 ng/μl.

En el análisis de cada muestra, se analizaron 50-100 ng de DNA en triplicados independientes.

Para asegurar una cuantificación fiable y robusta de la dosis génica se utilizaron un conjunto de sondas control comerciales (*SALSA MLPA P300 Human DNA reference-2 control fragments*; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) que permitió el control de la eficiencia de las reacciones de ligación y PCR.

Una vez obtenido el DNA, el procedimiento seguido es el descrito en las instrucciones (MRC-Holland). Brevemente, el DNA se desnaturalizó a 95°C y se incubó ON a 60°C con una mezcla de sondas control y sondas específicas para cada uno de los genes a estudiar. Los fragmentos ligados, fueron amplificados por PCR utilizando un juego de *primers* universales.

La PCR de los fragmentos de MLPA se diluyó en un factor 1:6 en tampón TE. Un μL de dicho producto se mezcló con 0,25 μL de marcador de peso molecular (GeneScan 500 LIZ size standard, Applied Biosystems) y desnaturalizado en 9 μL de formamida a 90°C durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla fue cargada en el secuenciador capilar (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) para la separación de fragmentos en

función de su peso molecular. Los datos recogidos fueron evaluados con el programa *GeneScan Analysis Software* (Applied Biosystems, Norwalk, CT).

Las sondas de MLPA fueron diseñadas utilizando la herramienta web MPAD (<http://bioinform.arcan.stonybrook.edu/mlpa2/cgi-bin/mlpa.cgi>), y sintetizadas como ultrámeros fosforilados en el extremo 5' (Integrated DNA Technologies, Coraville, IA, USA). Todas ellas cumplían los criterios específicos descritos por la casa comercial.

Para poder cuantificar la dosis génica en las muestras tumorales, en cada experimento de MLPA se usó como referencia el DNA extraído a partir de leucocitos procedentes de un donante. Como control positivo se utilizó DNA extraído a partir de la línea celular NCI-H1703 (presenta amplificación de *FGFR1*). Para emular las condiciones de las muestras procesadas rutinariamente en el departamento de Patología, tanto los leucocitos del donante sano como la línea celular amplificada para *FGFR1* fueron fijados con formol tamponado e incluidos en parafina.

El resultado final del análisis se obtuvo normalizando el coeficiente del gen obtenido en la muestra tumoral, respecto al obtenido en los leucocitos del donante sano. Para la valoración de los resultados se utilizó el siguiente criterio: para los genes diploides el coeficiente entre ambos valores debería ser 1. En el caso de observarse una delección heterocigota, el coeficiente esperado sería de 0,5. Si lo que se observa es una duplicación, el coeficiente entre ambos valores debería ser superior a 1,5. De 1,5 a 2,0 se considerará baja amplificación, por encima de 2 se considerará alto nivel de amplificación (más de 4 copias del gen por célula).

3.5.- ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIA DEL GEN MEDIANTE *FISH*

Esta prueba se realiza mediante Zytolight SPEC *FGFR1*/CEN 8 Sonda Dual Color (PL29) (ref. Z-2072-200) vendido por ZytoVision.

Las muestras fueron previamente tratadas por desparafinado y proteolisis, y desnaturalizadas a 73 °C, seguido de hibridación durante una noche a 37°C. Al día

siguiente se lavaron las muestras con el fin de eliminar las sondas no específicamente unidas. Finalmente fueron fijadas con una solución con DAPI.

El patólogo examinó las muestras para evaluar si existía amplificación FGFR (más de 2 señales verdes). La presencia de una señal naranja corresponde a la sonda de control y demuestra una hibridación correcta. Las células normales tienen 2 señales naranjas y 2 verdes.

Estrategia de evaluación:

(1) Evaluación de la calidad de hibridación: evaluar sólo muestras y las zonas con los núcleos bien definidos, sin signos de sobre-digestión, que no se superpongan, núcleos con señales verdes y naranjas/rojas brillantes y específicas en tejido de control interno y en el área del tumor.

(2) Escaneo del portaobjetos: búsqueda en toda la zona del tumor de focos con un aumento del número de copias de *FGFR1*.

(3) Lectura del portaobjetos: conteo de 20 núcleos de células tumorales en tres áreas, ya sea en tres focos o en tres áreas al azar en caso de ser homogénea la distribución de la señal. Se tienen que contar las células tumorales cohesivas, no se debe contar de forma selectiva las células tumorales amplificadas de forma aislada, de diferentes áreas. Evaluación de 60 núcleos tumorales.

(4) Contar sólo las señales que se distingan claramente como dos señales separadas. Se debe contar los dobletes o los triplete de la señal de *FGFR* como una señal. En los casos de la señales con clusteres se debe ofrecer una estimación por una agrupación de cinco señales, por ejemplo, 15, 20, o 25 señales de *FGFR1*. Contar micro-clusteres como cinco señales.

Los casos son considerados como FISH positivos de *FGFR1* ("amplificación") bajo una de las condiciones siguientes:

- (1) la relación *FGFR1*/CEN8 es ≥ 2.0 ;

- (2) el número medio de señales de *FGFR1* por núcleo tumoral es ≥ 6 ;
- (3) el porcentaje de células tumorales que contienen ≥ 15 *FGFR1* señales o grupos grandes es $\geq 10\%$;
- (4) el porcentaje de células tumorales que contiene ≥ 5 señales *FGFR1* es $\geq 50\%$

Con los criterios (1-3) representa un alto nivel de amplificación, mientras que la confirmación del criterio (4) representa una amplificación de bajo nivel.

3.6.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE mRNA

3.6.1.- Extracción del mRNA

El procedimiento para la determinación de los niveles de expresión de mRNA de nuestros genes de interés requirió de la obtención de RNA a partir de la muestra primaria. A partir de la muestra obtenida mediante microdissección o macrodissección, se extrajeron los ácidos nucleídos mediante una lisis celular con una solución de EDTA 0,1M, SDS 2%, TRIS 0,5M y proteinasa K (20mg/ml) (QIAGEN).

Para separar los ácidos nucleicos del resto de componentes celulares se empleó el método cloroformo-isoaminoalcohol:fenol pH=4,5-5,5(APPLICHEM) (dil 1:6). Con el fin de que dichos ácidos nucleicos precipitaran, se trató la fase acuosa con 2,5 μ L de glicógeno (20mg/ml) (ROCHE), 300 μ L de isopropanol (PANREAC) y 20 μ L de acetato sódico (APPLICHEM). La solución obtenida se incubó durante 30 minutos a $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Mediante una centrifugación de 12.600rpm \pm 200rpm durante 10 minutos se obtuvo un pellet que fue limpiado con etanol al 70%. El material obtenido se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 53 μ L de agua destilada estéril (BRAUN).

Para eliminar el DNA contaminante, se realizó un tratamiento con un kit (DNAasa/DNAasa buffer-10x Inactivation buffer) (AMBION). Consistió en someter los 53 μ L de muestra obtenida, con 1,5 μ L de enzima DNAasa y 6 μ L de tampón durante 30 min a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$. Para evitar enzima libre se inactivó con 6 μ L de 10x Inactivation buffer y se centrifugó a 1.000 rpm \pm 200 rpm.

3.6.2.-Retrotranscripción y Real-Time PCR

El cDNA fue sintetizado usando Kit basado en la enzima de retrotranscripción M-MLV (200u/ μ L) (INVITROGENE) / RNASE OUT (20u/ μ L) (INVITROGENE).

Se homogenizaron 10 μ L de muestra de RNA y controles con 2 μ L de MIX 1 (12,5 μ L Random Primer 250ng/ μ L (INVITROGENE), 150 μ L DNTP'S 10mM (PROMEGA) y 137,5 μ L de agua destilada estéril. Este proceso se realizó también para los controles de la técnica: controles de extracción, calibradores (una muestra de referencia que se usa como base para resultados comparativos) de RNA comercial Liver Total RNA Human Adult Liver (1 μ g/ μ L) (STRATAGENE), Lung MVP Total RNA Human Adult Lung (1 μ g/ μ L) (STRATAGENE) y agua destilada estéril.

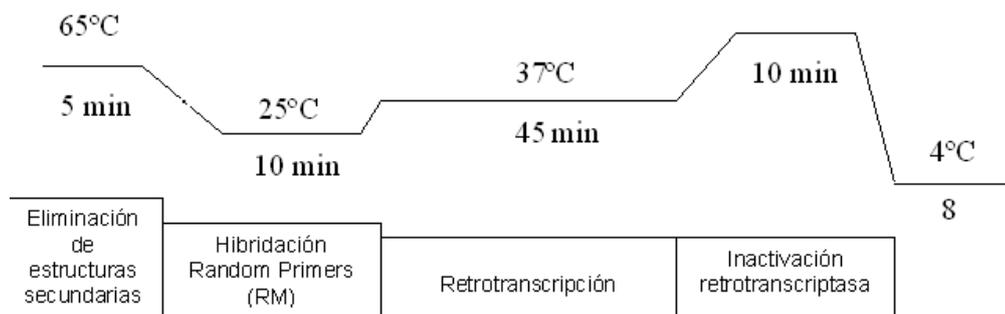


Diagrama ilustrativo del proceso de retrotranscripción en el termociclador

Se introdujeron todas estas muestras en el termociclador adicionando la MIX 2 (500 μ L DTT y 1000 μ L de solución tampón 5X) (INVITROGENE) en bajada de temperatura de 65°C a 25°C.

Una vez acabado, se diluyeron las muestras 1:5 con agua destilada estéril.

La cuantificación relativa mide el cambio relativo en los niveles de expresión de mRNA. Para usar el método de Ct comparativo, donde los niveles de expresión de genes se pueden calcular determinando la proporción entre el gen problema y un gen de referencia endógeno y a su vez esta proporción obtenida se compara entre distintas muestras (una de ellas es el calibrador), es imprescindible que la eficiencia de amplificación de los

primers y las sondas de TaqMan® que se usaron para los distintos genes y el gen endógeno sean comparables.

Tanto las sondas como los cebadores se diseñaron utilizando el programa *Primer Express 2.0 Software* ABI. Una vez diseñados se desarrollo un control de calidad *in silico* de los mismos y un estudio *in vitro* para reconocer posibles homologías con otras secuencias y establecer la especificidad, sensibilidad, especificidad y linealidad establecidos por ABI respecto al diseño.

Los cebadores y las sondas se validaron realizando banco de diluciones independientes con 12 puntos (dilución $\frac{1}{2}$) cada uno por triplicado, a partir de RNA extraído y retrotranscrito a cDNA con el método descrito anteriormente a partir de la muestra MVP Total RNA Human Adult Lung ya fuese extraída por el método cloroformo-isoaminoalcohol:fenol o bien empleando directamente la comercial. Paralelamente los cebadores también fueron validados por secuenciación del producto de amplificación, utilizándose RNA de muestras de referencia (Lung) se llevó a cabo una retrotranscripción tal y como se detalla anteriormente. Los cDNA obtenidos se testaron contra las parejas de cebadores para los genes de estudio. Los productos obtenidos se corrieron en un gel de agarosa y posteriormente se secuenciaron en doble hebra.

La amplificación mediante PCR a tiempo real se llevo a cabo introduciendo por triplicado 2,5 μ L del cDNA obtenido de muestras y controles con 10 μ L de MIX específica (en función del gen sometido a estudio), tanto para el gen problema (gen del que se desea estudiar su valor de expresión) como para el gen endógeno (gen específico caracterizado por ser de copia única y tener expresión constante en un porcentaje elevado de células del tejido a estudiar y poca variabilidad entre los individuos de la misma especie, que en este estudio fue la β -actina). La MIX consiste en 5000 μ L Taqman Universal Master Mix 2x (APPLIED BIOSYSTEMS), 2336 μ L agua destilada estéril, 600 μ L cebadores (ABI) específicos para cada gen y 150 μ L de sonda (ABI) específica para cada gen.

El cDNA obtenido se amplificó mediante PCR a tiempo real con un sistema de detección ABI7900HT, ABI (Applied Biosystems) utilizando sondas y cebadores específicos para cada uno de los genes a analizar (Tabla 19).

Cada sonda tiene en el extremo 5' un fluorocromo emisor y en el extremo 3' un fluorocromo receptor. Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda hidroliza por la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, comportando la separación de los fluorocromos emisores y receptores consecuentemente un aumento de la fluorescencia. Esta fluorescencia se cuantificó utilizando un software y se transformó en un valor numérico conocido como Ct (número de ciclos necesarios para que haya un aumento de fluorescencia significativo respecto a la señal de base, es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde).

También se añadió un control que contenía todos los reactivos a excepción de muestra de cDNA (NTC).

El resultado de ambos controles (NTC y agua destilada estéril de la retrotranscripción) no debe ser inferior a Ct 35, o bien, no debe corresponder a más de un 5% del valor del gen endógeno de la muestra con menor señal (Ct más alto) para el gen endógeno. Para calcular este porcentaje se utilizó la siguiente fórmula:

$$100/2^{(\text{valor Ct del gen endógeno c. ext.} - \text{valor Ct del gen endógeno de la muestra con Ct más alto})}$$

Cuando el resultado fue inferior a Ct 35 para el agua destilada estéril de retrotranscripción o el NTC se descartó el análisis ya que en ese caso la muestra presentaba contaminación de DNA.

Tabla 19.- Secuencia de los cebadores y sondas utilizados para el análisis de expresión por PCR cuantitativa. En el caso del gen *EZH2*, en lugar de diseñar cebadores y sondas, se utilizó un assays 20X comercial.

GENES	PRIMERS		SONDAS
<i>β-ACTIN</i>	F	5' TGAGCGCGGCTACAGCTT 3'	6FAM 5' ACCACCACGGCCGAGCGG 3' TAMRA
	R	5' TCCTTAATGTCACGCACGATTT 3'	
<i>BRCA1</i>	F	5'GGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTTA 3'	6FAM 5'CCACTCAGCAGAGGG 3' MGB
	R	5'GCTTTATCAGGTTATGTTGCATGGT 3'	
<i>RAP80</i>	F	5' ACATCAAGTCTTCAGAAACAGGAGC 3'	6FAM 5' TCAGGGTGCCTTCACCA 3' MGB
	R	5' TGCAGCCTGCCTCTTCCAT 3'	
<i>FGFR1</i>	F	5' CCACACTGCGCTGGTTGA 3'	6FAM 5' AACCTGACCACAGAATT ' MGB
	R	5' GGCATAACGGACCTTGTAGCC 3'	
<i>AEG1</i>	F	5' GGGGAAGGAGTTGGAGTGAC 3'	6FAM 5' AATATTTTCTGGCATTGGGTCTA 3' MGB
	R	5' GTAGACTGAGAACTGGCTCAGCAG 3'	
<i>SIAH2</i>	F	5' TCGGCAGTCCTGTTTCCC 3'	6FAM 5' TGTAAGTATGCCACCACGG 3' MGB
	R	TGGTTTCTCCGTATGGTGCA	
<i>NF1</i>	F	5' ATGGAGTTTGCTCTGTGAGC 3'	6FAM 5' TCAACAGGAAGAGCAGCA 3' MGB
	R	5' CAGTGCCATCACTCTTTTCTGAAG 3'	
<i>HES1</i>	F	5' GGACATTCTGAAAATGACAGTGAA 3'	6FAM 5' ATGACGGCTGCGCTGA 3' MGB
	R	5' CAGCACACTTGGGTCTGTGC 3'	
<i>EGFR</i>	F	5'GAGTCGGGCTCTGGAGGAA 3'	6FAM 5'GAAAGTTTGCCAAGGCA 3' MGB
	R	5' AACTGCGTGAGCTTGTACTCG 3'	
<i>SOX2</i>	F	5' CCGGGACATGATCAGCATG 3'	6 FAM 5' CGCCGAGGTGCCGG 3' MGB
	R	5' GGACATGTGAAGTCTGCTGGG 3'	

3.6.3.- Análisis de resultados de la PCR a tiempo real

El valor relativo de expresión se calculó utilizando en método de Ct comparativo usando β -actina como endógeno y RNA comercial como calibrador Liver y Lung.

Para ello, a partir de los valores numéricos obtenidos de la PCR a tiempo real se realizaron una serie de cálculos matemáticos:

- Promedio y desviación estándar (no superior 0.30) de las tres réplicas de cada uno de los genes, tanto endógeno como genes analizados.
- dCT (valor numérico obtenido al restar el valor de Ct del gen problema con el valor de Ct del gen endógeno) de cada una de las muestras para cada gen sometido a estudio.
- Promedio de los calibradores Liver/Lung.
- ddCT hace referencia al valor relativo de expresión de un gen para cada una de las muestras: $2^{-(dCt_{gen} - dCt_{del\ promedio\ liver-lung})}$

Se utilizó este calculo matemático ddCT para determinar el valor relativo de expresión génica de cada una de las muestras sometidas a análisis. Con este valor de expresión relativa se pudo realizar la estadística presentada en esta tesis.

3.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de los datos se ha realizado en la población total de estudio, y cuando los resultados lo han requerido se ha realizado un análisis de los diferentes subgrupos en función de las principales variables de estudio.

Para la descripción de las variables cuantitativas se empleó el formato convencional mediana, media +/- desviación estándar, máximos y mínimos. Y para la descripción de variables cualitativas se utilizaron las proporciones de población.

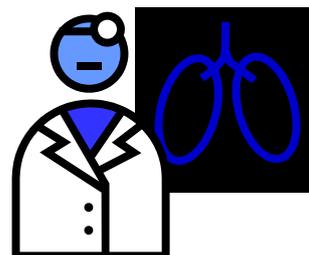
Para comparar las variables cuantitativas se utilizó la T-Student, o la prueba de Mann Whitney según las asunciones necesarias, para las variables categóricas la Ji-cuadrado de Pearson o el el test exacto de Fisher.

Las curvas de supervivencia se han estimado utilizando el modelo de Kaplan-Meier. Los diferentes grupos de interés han sido comparados entre ellos mediante el test Log-Rank.

Se ha definido supervivencia global como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el fallecimiento de los pacientes por cualquier causa. Para la supervivencia libre de enfermedad se ha definido como el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la progresión de la enfermedad o el fallecimiento del paciente. Los casos en que no han ocurrido los eventos se han censurado al último contacto con los pacientes.

Para analizar el impacto de la expresión de los genes sobre la supervivencia global o la supervivencia libre de enfermedad, la expresión de los genes se ha dividido en medianas y terciles.

Todas las comparaciones fueron bilaterales con un nivel de significación $\alpha < 0.05$. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics.20.0.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- MLPA

Los resultados obtenidos en el análisis de la amplificación de los genes *SOX2*, *FGFR1*, *PIK3CA*, *PDGFR1a*, *KDR*, *AXL*, *EGFR* y *MET* se presentan en la tabla 20 y en la figura 57. Como se puede observar, los genes más frecuentemente amplificados en la población estudiada de carcinoma escamoso son, por este orden, *SOX2*, *PIK3CA* y *FGFR1*. El resto de genes analizados solo se encuentran amplificados en un pequeño porcentaje de las muestras, inferior al 10%. Estos resultados son coincidentes con los previamente publicados en diversos trabajos sobre biología molecular del carcinoma escamoso (Okudela et al, 2007; Weiss et al, 2010; Wilbertz et al, 2011).

Tabla 20.- Resultados generales de MLPA

N: 47	<i>FGFR1</i> (%)	<i>SOX2</i> (%)	<i>PIK3CA</i> (%)	<i>PDGFR1a</i> (%)	<i>KDR</i> (%)	<i>AXL</i> (%)	<i>EGFR</i> (%)	<i>MET</i> (%)
AMPLIFICACIÓN	11 (23,4)	36 (76,6)	20 (42,5)	2 (4,2)	2 (4,2)	3 (6,3)	4 (8,5)	1 (2,1)
NO AMPLIFICACIÓN	35 (74,5)	11 (23,4)	27 (57,5)	45 (95,8)	44 (93,7)	44 (93,7)	43 (91,5)	46 (97,9)
DELECIÓN	1 (2,1)	0	0	0	1 (2,1)	0	0	0
NV	48	48	48	48	48	48	48	48

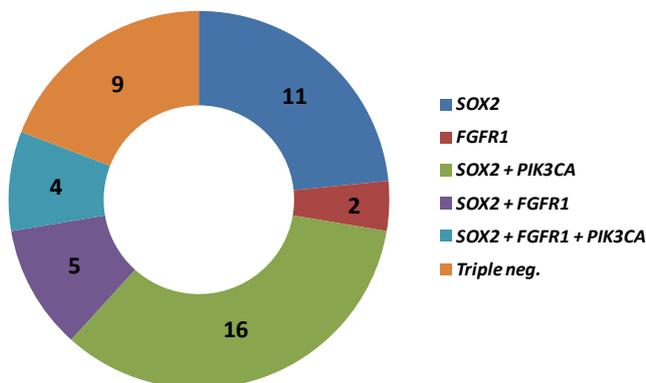


Figura 57.- Representación de los resultados obtenidos para la amplificación de los genes *SOX2*, *FGFR1* y *PIK3CA* (n=47)

Se encontró amplificación de *PIK3CA* en un 42,5% de los casos, un porcentaje similar al descrito en la bibliografía. Es de destacar que este gen se encuentra amplificado con mucho más frecuencia en carcinoma escamoso que en adenocarcinoma. Se ha descrito que en líneas celulares en cultivo y tumores de escamoso la ganancia de *PIK3CA* va ligada a un mayor índice proliferativo, lo que la hace candidata a diana antitumoral (Wang et al, 2012). En efecto, se ha demostrado que líneas celulares de carcinoma escamoso con amplificación de *PIK3CA* son muy sensibles al inhibidor GDC-0941 (Spoerke et al, 2012).

Nuestros resultados por MLPA corroboran que *FGFR1* está amplificado en un porcentaje elevado de carcinomas escamosos (Schildhaus et al, 2012), lo que resulta relevante clínicamente. Esta alteración genética es la primera específica de dicha neoplasia que permite aplicar terapias dirigidas en forma de inhibidores de *FGFR1*, que en la actualidad se están valorando en ensayos clínicos II/III. De acuerdo con nuestros resultados dichos inhibidores se podrían emplear hasta en un 23% de los pacientes con carcinoma escamoso. Sin embargo, en los ensayos clínicos en cáncer de pulmón, la técnica estándar para analizar la amplificación de *FGFR1* no es el MLPA sino el *FISH* (Pros et al, 2013). Por ello completamos el análisis utilizando esta técnica en los 42 pacientes donde quedaba material disponible. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 21. El porcentaje de casos amplificados por *FISH* (11,9%) era aproximadamente la mitad de los amplificados por MLPA. Todos los casos amplificados por *FISH* presentaban también ganancia de número de copias por MLPA. En cambio cuatro casos positivos por MLPA no lo eran por *FISH*, de los cuales dos correspondían a polisomías. Diversos motivos podrían explicar estas discrepancias. En primer lugar, dado que la muestra restante para el análisis de *FISH* era escasa, en muchos casos no se pudo examinar un número amplio de células tumorales. Además se ha demostrado que la amplificación de *FGFR1* es focal en algunos tumores y es posible que las zonas estudiadas por cada técnica hayan sido diferentes. En ensayos clínicos sería interesante analizar también la amplificación de *FGFR1* por MLPA a fin de determinar qué técnica correlaciona mejor con la respuesta a inhibidores.

Tabla 21.- Resultados de FISH de *FGFR1* comparados con MLPA (N= 42)

		FISH		
		AMPLIFICACIÓN (%)	POLISOMÍA (%)	NO AMPLIF. (%)
MLPA	AMPLIFICACIÓN (%)	5 (11,9)	2 (4,8)	2 (4,8)
	NO AMPLIFICACIÓN (%)	0	4 (9,5)	29 (69)

La amplificación de *PIK3CA* siempre se asocia a la de *SOX2* (Tabla 22). Los genes *SOX2* y *PIK3CA* están localizados de forma contigua en el cromosoma 3 (posiciones 3:181429714-181432221:1 y 3:178865902-178957881:1 respectivamente), lo que explica su frecuente co-amplificación. Por otro lado, *FGFR1* aparece amplificado con frecuencia junto a *SOX2* (Tabla 23), encontrándose además los tres genes amplificados de forma simultánea en un porcentaje significativo de las muestras Sin embargo, el gen *FGFR1* se localiza en un cromosoma diferente, el cromosoma 8 (8:38268656-38326352:-1). Este trabajo es el primero en el que se describe esta co-amplificación de los genes *SOX2* y *FGFR1* en un porcentaje significativo de carcinomas de escamosos, cercano al 20%. Diversos trabajos demuestran que la expresión de factores de transcripción de la familia *SOX* está regulada por factores de crecimiento de la familia *FGFR*, por lo que esta co-amplificación podría ser relevante para la biología y la patología del tumor.

Tabla 22- Correlación entre los resultados de MLPA de *SOX2* y *PIK3CA*

		SOX2	
		AMPLIFICACIÓN (%)	NO AMPLIF. (%)
PIK3CA	AMPLIFICACIÓN (%)	20 (42,5)	15 (32)
	NO AMPLIFICACIÓN (%)	0	13 (27,6)

Tabla 23.- Correlación entre los resultados de MLPA de *SOX2* y *FGFR1*

		<i>SOX2</i>	
		AMPLIFICACIÓN (%)	NO AMPLIF. (%)
<i>FGFR1</i>	AMPLIFICACIÓN (%)	9 (19,1)	2 (4,2)
	NO AMPLIFICACIÓN (%)	27 (57,4)	11 (23,4)

Un 8% de los carcinomas escamosos estudiados presentan amplificación de *MET* (2%) o *AXL* (6%). Existen diversos fármacos inhibidores de dichos receptores en diferentes fases de desarrollo clínico. Uno de los más conocidos es foretinib, un pan-inhibidor de receptores de la familia tirosina-quinasa, entre los que se incluyen *AXL* y *MET*. Nuestros resultados indican que la proporción de pacientes con amplificación de *MET* o *AXL* justifica un ensayo clínico de foretinib en pacientes diagnosticados con carcinoma escamoso. Para ello, sería interesante corroborar si la amplificación de *AXL* y *MET* en carcinomas escamosos se correlaciona con la sobreexpresión proteica, mediante análisis IHQ.

Respecto al gen *EGFR*, de gran relevancia clínica en la actualidad, un 8% de los tumores escamosos estudiados presentaban amplificación del mismo. En un trabajo reciente en población asiática, *EGFR* se encontraba amplificado por *FISH* en un 26,7% de los pacientes y dicha amplificación, junto con el rash cutáneo, se correlacionaba con mejor respuesta a ITQ (Lee et al, 2012). Por otro lado, en un ensayo clínico de cetuximab asociado a cisplatino-vinorelbina en cáncer de pulmón (estudio FLEX; Pirker et al, 2009) se objetivó que la adición de este fármaco mejoraba la supervivencia, por lo que se analizó posteriormente la expresión de *EGFR* como factor predictivo y se demostró que los pacientes con alta expresión de *EGFR* se beneficiaban de la adición de cetuximab a la quimioterapia (Pirker et al, 2012). Se ha observado además que, en el caso del carcinoma escamoso, la amplificación de *EGFR* se correlaciona con sobreexpresión del receptor por

IHQ (Dacic et al, 2006). Se puede hipotetizar que el subgrupo de carcinomas escamosos con buena respuesta al cetuximab podrían ser aquellos con amplificación de *EGFR*. Sería interesante comprobar dicha hipótesis de forma experimental pues proporcionaría un criterio para el uso de nuevos fármacos anti-*EGFR* en carcinoma escamoso.

En la tabla 24 se muestran los resultados de la amplificación de los genes clasificada en función del estadio de las muestras. Existen dos genes cuya frecuencia de amplificación parece diferir de forma significativa en estadios I-III A frente a IIIB-IV en carcinoma escamoso: *SOX2* y *EGFR*. En el caso de *SOX2*, un 84% de los casos de estadio I-III A presentan amplificación, un porcentaje que desciende al 64% en estadios avanzados. Respecto a *EGFR*, las cifras son del 3 y 21% respectivamente. Wilbert et al (2011), en un estudio por *FISH* en carcinoma escamoso, encontraron que la proporción de tumores con amplificación de *SOX2* disminuía en estadio IIIB-IV respecto a estadios I-III A, un resultado coincidente con el que aquí se presenta. En cuanto a la amplificación de *EGFR*, no existen datos en la literatura científica sobre su posible relación con la progresión tumoral en carcinoma escamoso.

Tabla 24.- Resultados de MLPA por estadio

N: 47	ESTADIO	<i>FGFR1</i> * (%)	<i>SOX2</i> (%)	<i>PIK3CA</i> (%)	<i>PDGFR1</i> a (%)	<i>KDR</i> * (%)	<i>AXL</i> (%)	<i>EGFR</i> (%)	<i>MET</i> (%)
I-III A	Amplificación	8 (25)	27 (82)	14 (42)	1 (3)	1 (3)	3 (9)	1 (3)	1 (3)
	No amplificación	24 (75)	6 (18)	19 (58)	32 (97)	31 (97)	30 (91)	32 (97)	32 (97)
IIIB-IV	Amplificación	3 (27)	9 (64)	6 (43)	1 (7)	1 (7)	0	3 (21)	0
	No amplificación	11 (73)	5 (36)	8 (57)	13 (93)	13 (93)	14 (100)	11 (79)	14 (100)
NV	---	48	48	48	48	48	48	48	48

* La n en varios genes no suma 47 porque hay una delección que no se ha incluido en la tabla

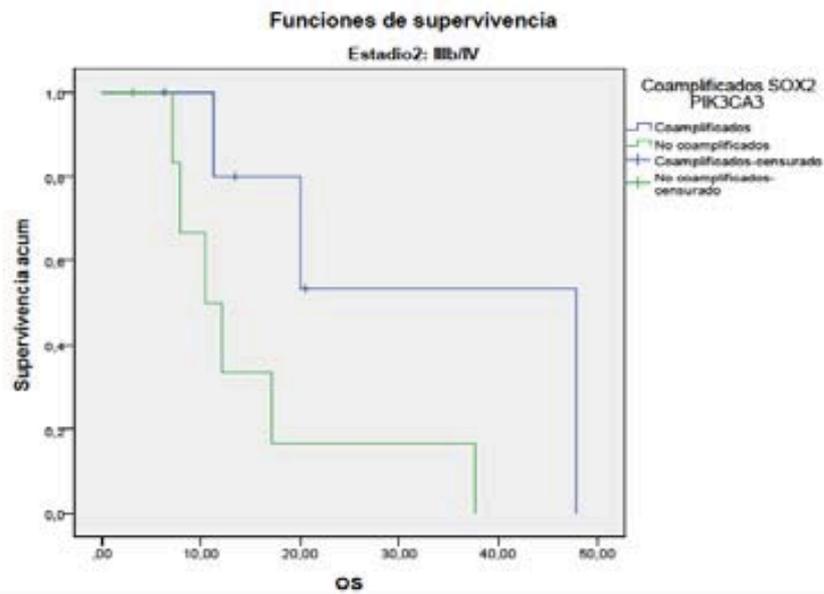


Figura 58.- Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en estadios IIIB-IV, en función de la co-amplificación de los genes *SOX2* y *PIK3CA* ($p=0,064$)

Respecto su posible valor como factor predictivo o pronóstico, el reducido número de pacientes en los cuales se pudo determinar la amplificación de los genes analizados impide extraer conclusiones estadísticamente significativas. Sin embargo, es interesante señalar que se observa una tendencia a una mejor supervivencia en los pacientes de estadios avanzados con co-amplificación de *SOX2* y *PIK3CA*. Dichos pacientes presentaron una OS mediana de 47,9 meses frente a 10,4 meses en aquellos donde no existía dicha co-amplificación ($p=0,064$) (Figura 58). Tal y como se ha comentado anteriormente, *SOX2* y *PIK3CA* se encuentran contiguos en 3q26. El hecho de que su co-amplificación parezca un mejor predictor de supervivencia que la de cualquiera de los dos por separado, indicaría que es la amplificación de toda la región cromosómica la que estaría asociada con un mejor pronóstico. Esta hipótesis se debería validar en una cohorte más amplia de pacientes. Se ha descrito en la bibliografía que la amplificación del gen *SOX2* se relaciona con mejor supervivencia en estadios quirúrgicos de carcinoma escamoso, siendo éste el primer estudio en estadios avanzados (Wilbertz et al, 2011; Brcic et al, 2012).

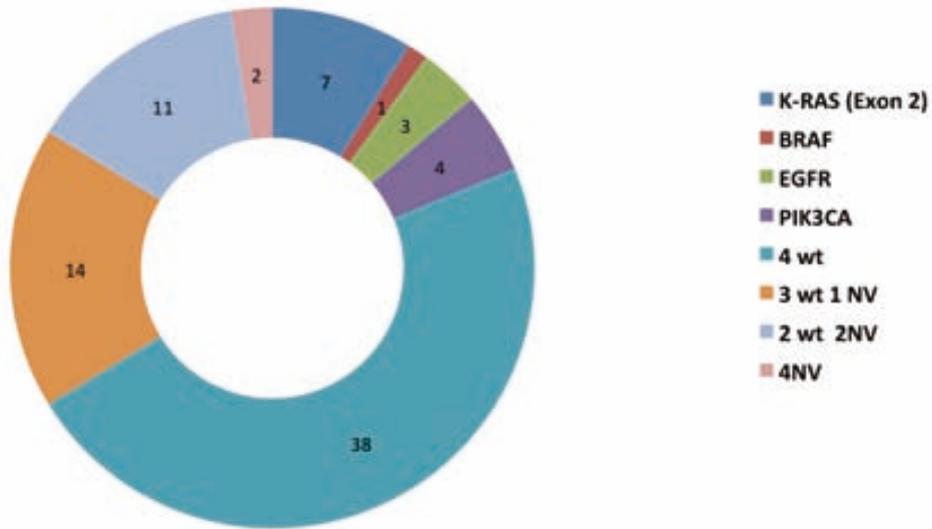
4.2- MUTACIONES

En este trabajo se ha caracterizado los tumores escamosos para las principales mutaciones oncológicas (*driver mutations*) con relevancia clínica en cáncer de pulmón. El objetivo general era determinar qué porcentaje de carcinomas escamosos presenta mutaciones que puedan ser susceptibles, en la actualidad o en un futuro próximo, de tratamiento con algún fármaco dirigido (Tabla 25).

Tabla 25.-Mutaciones genéticas con potencial relevancia clínica en la personalización del tratamiento del paciente oncológico

Gen	Tumor	Relevancia clínica	Referencias
PIK3CA	Pulmón	Sensibilidad a inhibidor de <i>PIK</i> /inhibidor dual <i>PIK-MEK</i>	<i>Zou et al 2012</i>
K-RAS	Colon	Resistencia a cetuximab, panitumumab (terapia anti- <i>EGFR</i>)	<i>Amado et al 2008; Karapetis et al 2008</i>
	Pulmón	Sensibilidad a selumetinib (inhibidor de <i>MEK</i>)	<i>Jänne et al 2013; Metro et al 2013</i>
EGFR	Pulmón	Sensibilidad a erlotinib, gefitinib (ITQ)	<i>Rosell et al 2009; Rosell et al 2009; Mok, et al 2009</i>
BRAF	Colon	Marcador de mal pronóstico en terapia anti- <i>EGFR</i> (cetuximab)	<i>Loupakis et al 2009</i>
	Melanoma, Colon, Pulmón	Sensibilidad a inhibidor de <i>BRAF</i> (vemurafenib, dabrafenib)	<i>Flaherty et al 2012; Gatschi et al 2012; Chapman et al 2011</i>
DDR2	Pulmón	Sensibilidad a dasatinib	<i>Hammerman et al 2011</i>
TP53	Pulmón	Sensibilidad a Prima1- <i>MET</i> en combinación con cisplatino	<i>Kobayashi et al 2013;Zandi et al 2011; Bykov et al 2005</i>
	Ovario		

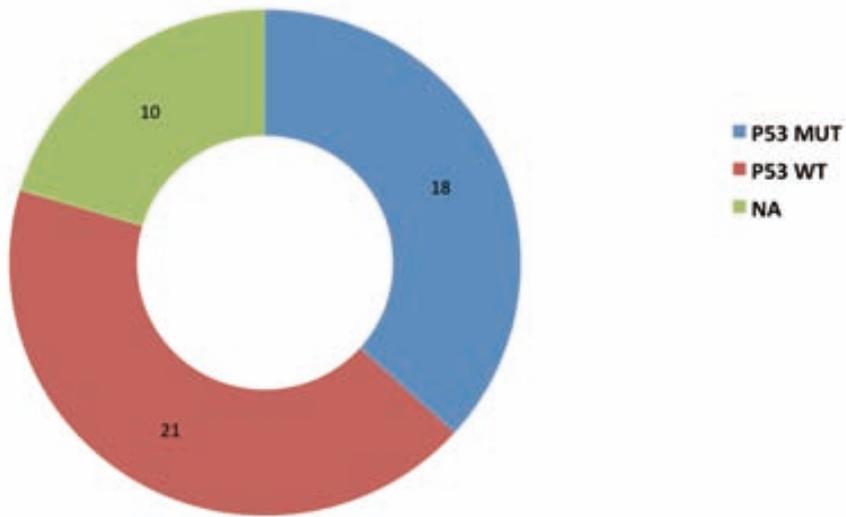
En la figura 59 se representa la distribución de mutaciones en los tumores estudiados, excluyendo las de *TP53* las cuales, por aparecer frecuentemente de forma concomitante con el resto, se recogen en la figura 60.



?

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

?



?

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

?

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00 2023.03.27.15.00.00

BRAF. Los tres pacientes mutados de *EGFR* presentaban deleciones en el exón 19 (dos de 15 y uno de 18 pares de bases). En cuanto a las mutaciones de *K-RAS*, su perfil resultaba diferente al observado en adenocarcinoma de fumadores, pues en sólo dos pacientes aparecía el reemplazamiento G12C, por cinco con otros tipos de cambio de aminoácidos (G12D, G12V y G12D). En cuanto a *PIK3CA*, las mutaciones presentes eran las “hotspot” E542K y E545K.

Tabla 26.- Resultados del análisis de mutaciones en las muestras reclutadas (n=80)

GEN	ND (1)	Muestras con resultado	Mutadas	%
<i>PIK3CA</i>	15	65	4	6,2
<i>K-RAS</i>	15	65	7	10,8
<i>EGFR</i>	16	64	3*	4,7
<i>BRAF</i>	8	72	1	1,4
<i>DDR2</i>	32	48	0	0,0
<i>TP53</i>	41	39	18	46,2

* Una de estas muestras tenía la T790M pretratamiento

(1) Muestras donde no se pudo determinar la mutación por falta de material o no amplificación

COSMIC es una base de datos, disponible gratuitamente online, que recoge mutaciones somáticas adquiridas que se encuentran en el cáncer. Los datos se obtienen de la literatura científica y grandes plataformas experimentales a partir del Proyecto Genoma del Cáncer del Instituto Sanger. Nuestros datos presentan un alto nivel de coincidencia con los recogidos en COSMIC, correspondientes a 1.169 casos de carcinoma escamoso de todo el mundo (Tabla 27). Las únicas discrepancias se observan en el caso de los genes *K-RAS* y *PIK3CA*, donde las frecuencias obtenidas en nuestro estudio superan a las descritas en COSMIC. Diversas razones pueden explicar esta discrepancia: el pequeño tamaño muestral, la diferente localización geográfica y el hecho de haber empleado metodologías (como la discriminación alélica para *PIK3CA*) más sensibles que las técnicas de secuenciación habitualmente utilizadas en muchos laboratorios. Con todo, es de destacar

que, en el caso de *K-RAS*, aunque la frecuencia global fuera discrepante, la diversidad de mutaciones sí se correspondía con la descrita en COSMIC, con menos de un tercio de G12C y una sobreabundancia de G12D y G12V. Respecto *PIK3CA*, aunque COSMIC sólo describe un 2,7%, trabajos recientes indican que la frecuencia de mutaciones en escamoso llegaría al 9% (Spoerke et al, 2012).

Tabla 27.- Comparación de los resultados del análisis de mutaciones en nuestra población con los recogidos en COSMIC para carcinoma escamoso de pulmón

GEN	Estudio	COSMIC DB
<i>PIK3CA</i>	6,2	2,7
<i>K-RAS</i>	10,8	5,2
<i>EGFR</i>	4,7	5,6
<i>BRAF</i>	1,4	1,0
<i>DDR2</i>	0,0	0,0
<i>TP53</i>	46,2	43,3

En la actualidad, muchos laboratorios de biología molecular analizan mutaciones de *EGFR*. En un esfuerzo por estandarizar dichos análisis, el Colegio de Patólogos Americano, la Sociedad Internacional para el Estudio de Cáncer de Pulmón y la Asociación de Patología Molecular han elaborado una Guía con recomendaciones para la selección de Pacientes de Cáncer de Pulmón para el tratamiento con inhibidores de *EGFR* y ALK (Lindeman et al, 2013). La guía recomienda que no se analicen aquellos tumores de pulmón sin ningún componente de adenocarcinoma, excepto cuando en muestras de pequeño tamaño, un componente de adenocarcinoma no se pueda excluir. A la luz de nuestros datos esta recomendación, en el caso del carcinoma escamoso, es como mínimo polémica. Tal y como se muestra en la tabla 27, alrededor de un 5% de los carcinomas escamosos presentan mutación de *EGFR* (un porcentaje que coincide con el recogido en COSMIC). De los tres carcinomas escamosos con mutación de *EGFR* analizados en la

presente tesis, dos respondieron al tratamiento con ITQ. Por otro lado, puede ser muy difícil para el patólogo descartar por completo la posibilidad de que exista un componente no escamoso. Especialmente, en muestras de pacientes en estadio IIIB-IV, donde la cantidad de tejido tumoral es a menudo muy escasa. Finalmente, la mayoría de métodos de detección de mutaciones de *EGFR* que se emplean actualmente son rápidos y de coste reducido. Por todo ello, en nuestro hospital hemos decidido no seguir las recomendaciones de la citada guía y testar todos los tumores escamosos para la posible presencia de mutaciones de *EGFR* (Molina-Vila et al, 2013).

Un razonamiento similar se puede aplicar a las mutaciones del gen *BRAF*. La frecuencia de las mismas en carcinoma escamoso no parece diferir de forma significativa de la que se encuentra en adenocarcinoma. Además, en nuestro laboratorio hemos puesto a punto una técnica sensible, rápida y barata, para la detección de las mismas. Por ello, se está valorando testar de forma rutinaria los carcinomas escamosos para *BRAF*. Teniendo en cuenta el gran beneficio clínico que pueden obtener los pacientes mutados para dicho gen del tratamiento específico con inhibidores de *BRAF* (Vemurafenib), creemos que este tipo de prueba se debe realizar en los todos los pacientes con CPCNP independientemente de su histología.

Respecto a *PIK3CA* se han detectado mutaciones en un 6,2% de las muestras. Es de destacar que en ninguna de las muestras amplificadas para *PIK3CA* (42,5% de los casos) se detectaba mutación de dicho gen. Ambos tipos de alteraciones estarían presentes en la mitad de los casos de carcinoma escamoso y como se ha citado anteriormente constituyen potenciales dianas antitumorales (Spoerke et al, 2012). En cambio en adenocarcinomas la frecuencia de mutaciones y amplificaciones de *PIK3CA* es aproximadamente del 6%. Por ello los inhibidores de *PIK3CA* actualmente en desarrollo podrían tener un potencial significativamente superior en el carcinoma escamoso frente al adenocarcinoma.

Hemos encontrado mutaciones de *K-RAS* en un 10,8% de los casos. La frecuencia descrita en COSMIC es de un 2,7% pero esta base de datos engloba también población

asiática. Dos estudios europeos describen una frecuencia de mutación del 7,4 y 8%, valores más cercanos a los obtenidos en nuestro trabajo (Vachtenheim et al, 1995; Fiala et al, 2013). Pese al reducido número de pacientes mutados de *K-RAS* incluidos en el presente estudio, dichas mutaciones se asociaban de forma significativa con una peor OS en estadios IIIB-IV (Figura 61). Este resultado se confirmó en una población más amplia de 124 pacientes de CPCNP en los cuales la OS mediana era de 7,6 meses para los mutados de *K-RAS* frente a 14,4 meses para los WT (Gascó et al, 2013 submitted). Aunque el valor pronóstico de las mutaciones de *K-RAS* en el CPCNP es controvertido (Karachaliou et al, 2013), un estudio reciente en 484 pacientes ha señalado que se asocian significativamente con una menor OS en estadios avanzados. La OS mediana era de 7,7 meses en los mutados de *K-RAS* frente a 15 meses en los WT (Sun et al, 2013).

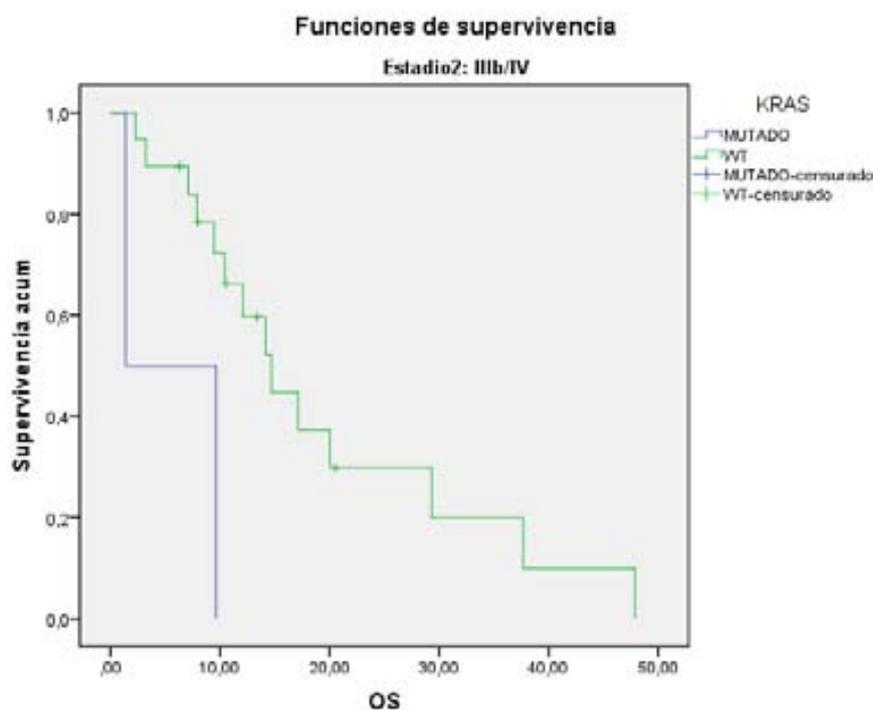


Figura 61.- Curvas Kaplan-Meier de supervivencia global en estadios IIIB-IV, de acuerdo con el estatus de *K-RAS* (wt frente a mutados). Las curvas difieren de forma significativa ($p=0,02$)

En la actualidad existen inhibidores de *MEK* en diversas fases de desarrollo con actividad frente a tumores mutados de *K-RAS*. El más avanzado es el selumetinib que en un ensayo clínico fase II en combinación con docetaxel tras progresión a primera línea de

quimioterapia, ha demostrado beneficio en OS y PFS en pacientes de CPCNP mutados de *K-RAS* (Jänne et al, 2013).

Las mutaciones oncogénicas más frecuentes en carcinoma escamoso de pulmón son las del gen *TP53* que, en nuestro estudio, se han hallado en el 46,2% de los casos. Dichas mutaciones no correlacionaban de forma significativa con OS ni con PFS. En la actualidad, las mutaciones de *TP53* son objeto de un renovado interés, debido al desarrollo de diversos fármacos que restauran la actividad de la proteína mutada y presentan actividad antitumoral en fase preclínica. Uno de ellos, el *PRIMA1-MET*, ha sido objeto de un ensayo en fase I en cáncer de próstata y enfermedades hematológicas (Lehmann et al., 2012). El fármaco era bien tolerado a dosis farmacológicas, mostró un perfil farmacocinético favorable e indujo efectos biológicos dependientes de p53 en las células tumorales *in vivo*. La elevada frecuencia de mutaciones del gen *TP53* hace al tumor escamoso de pulmón un buen candidato para la continuación de dichos ensayos clínicos.

Finalmente, en este trabajo no se han encontrado mutaciones en el gen *DDR2* en ninguno de los tumores ensayados. Un estudio reciente ha descrito dichas mutaciones en el 3,8% de los casos de carcinoma escamoso (Hammerman et al, 2011). Sin embargo, tal y como se observa en la tabla 27, en la base de datos COSMIC no aparece ninguna mutación de *DDR2* en los 248 casos de carcinoma escamoso que allí se recogen.

4.3- RNA

Para completar el estudio, se determinaron los niveles de expresión de genes seleccionados por técnicas de RT-PCR. Dicho análisis sólo se pudo realizar con menos del 50% de los casos (Tabla 28), el resto se perdió básicamente por dos motivos: falta de material tumoral en el bloque de parafina o mala calidad del mismo. Debemos recordar que gran parte de las muestras utilizadas en este estudio provenían de instituciones externas por lo que su calidad no era homogénea. Respecto a la falta de material tumoral, éste es uno de los principales problemas en la práctica clínica diaria, que dificultan la

caracterización molecular de los tumores. La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón se diagnostican mediante biopsia obtenida por fibrobroncoscopia o mediante punciones transtorácicas que sólo permiten determinar la histología del tumor y realizar un análisis mutacional sencillo. Sería recomendable que la comunidad médica tomase conciencia de la importancia de obtener, siempre que resulte posible, biopsias con la mayor cantidad de material tumoral posible.

Tabla 28.- Rangos de expresión de mRNA en la población estudiada

		Estadísticos									
		ddCt BRCA1	ddCt RAP80	ddCt AEG1	ddCt SIAH2	ddCt NF1	ddCt Hes- 1	ddCt EZH2	ddCt FGFR1	ddCt EGFR	ddCt SOX2
N	Válidos	44	46	52	48	47	35	31	36	40	48
	Perdidos	51	49	43	47	48	60	64	59	55	47
Media		20,5396	2,9893	1,3689	3,9334	4,8394	1,2691	7,0626	7,7021	3,9053	1107,115 4
Mediana		11,3050	2,1495	1,1151	2,4750	3,3600	,7500	4,3900	1,2400	2,8337	607,3094
Desv. típ.		26,05646	2,26160	,90115	3,78059	4,09242	1,31720	6,11370	16,58743	3,40895	1384,502 79
Mínimo		2,43	,48	,17	,51	,07	,04	1,00	,28	,15	,56
Máximo		134,60	10,26	4,10	19,08	17,24	5,40	26,85	85,98	17,32	6031,91
Percentiles	25	6,9275	1,5348	,6400	1,3650	2,2100	,4940	2,3014	,5275	1,6125	196,8500
	33	8,5328	1,6802	,8098	1,5487	2,6176	,5987	3,0580	,7347	2,1606	255,9665
	50	11,3050	2,1495	1,1151	2,4750	3,3600	,7500	4,3900	1,2400	2,8337	607,3094
	66	16,1955	2,9350	1,7358	4,7741	4,6532	1,0542	8,5415	3,2079	3,9348	1293,254 0
	75	24,9875	3,4729	1,9217	5,9825	5,7168	1,6400	9,1419	4,3625	5,1200	1613,375 0

En los estudios de expresión génica, los niveles de RNA mensajero determinados por RT-PCR cuantitativa se normalizan respecto a un gen de referencia, en nuestro caso β -actina, para luego clasificarlos en función de distintos percentiles que pueden ser los percentiles 50 (o medianas, que clasifican las muestras en dos grupos, M1 y M2) o los percentiles 33 y 66 (que clasifican las muestras en tres grupos, los terciles T1, T2 y T3). En la tabla 28 se reflejan los valores máximos y mínimos y los percentiles 50, 33 y 66 en

los análisis de expresión realizados. *SOX2*, *BRCA1*, *EZH2* y *FGFR1* son los genes con un rango de expresión más amplio.

En el apéndice se presentan los resultados de PFS y OS de todos los genes analizados. Se refleja la clasificación, en función del estadio, según medianas (M1 frente M2), terciles (T1, T2, T3), T1 frente a T2+T3 (33/66) y finalmente T3 frente a T1+T2 (66/33). De los diez genes estudiados, cuatro se correlacionaban de forma estadísticamente significativa con OS y/o PFS en la población estudiada: tres factores o reguladores de transcripción (*SIAH2*, *EZH2* y *SOX2*) y un gen de reparación de DNA(*BRCA1*). Estos cuatro genes son los que se discutirán a continuación. Debido al tamaño relativamente reducido de nuestra población, las correlaciones estadísticamente significativas se deben tomar con precaución y sería interesante confirmarlas en una muestra más amplia.

El gen *BRCA1* tiene un papel clave en la vía de reparación del DNA por recombinación homóloga (HHR) y ha sido objeto de diversos estudios como posible factor pronóstico y predictivo de respuesta a quimioterapia en cáncer de pulmón y otras neoplasias (Taron et al, Reguart et al, 2008; Wei et al. 2011; Font et al. 2010; Rosell et al. 2007). En la población estudiada, la sobreexpresión de *BRCA1* en estadios IIIB-IV se correlacionaba con una mejor PFS y OS de forma consistente, independientemente del tipo de categorización de los datos. Por ejemplo en la Figura 62 se presentan las curvas de supervivencia por medianas. La OS en los pacientes con baja expresión de *BRCA1* era de 7,10 meses comparado con 17,1 en aquellos con alta expresión ($p=0,003$) mientras que la PFS era de 2,3 frente a 11,50 meses respectivamente ($p=0,004$).

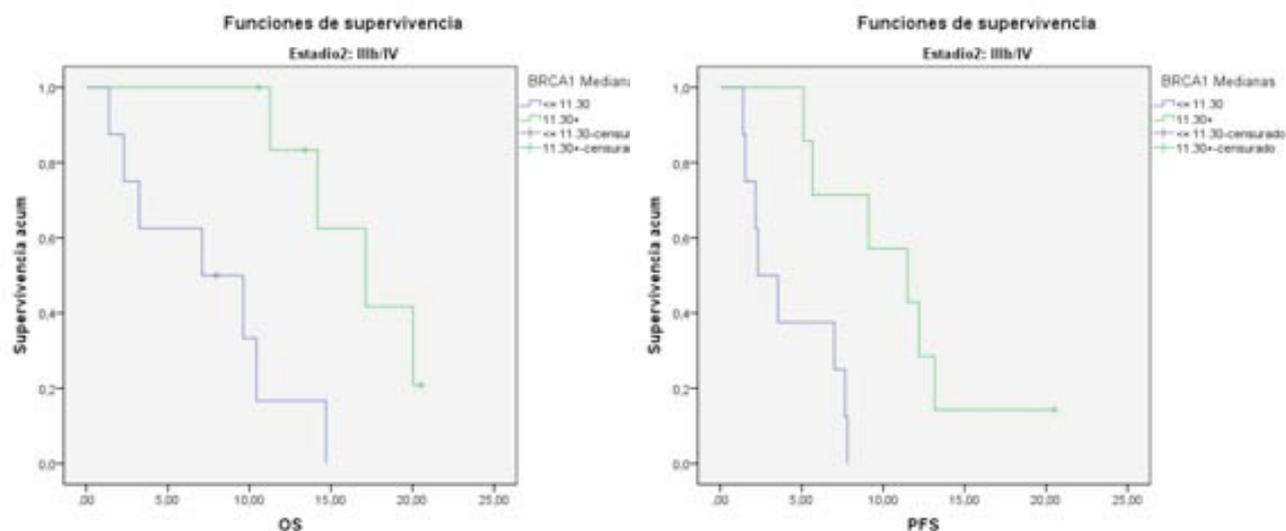


Figura 62.- Curvas Kaplan-Meier de OS y PFS en IIIB-IV, de acuerdo con la expresión de *BRCA1* (medianas). Las curvas difieren de forma significativa ($p=0,003$ y $p=0,004$ respectivamente)

Estos datos son consistentes con los publicados en otros estudios relativos a CPCNP avanzado. Tiseo et al (2013) en un estudio con 110 muestras de 433 pacientes reclutados en un ensayo clínico en el que se aleatorizaba a los pacientes a recibir regímenes de quimioterapia con y sin platinos, observaron que la expresión de *BRCA1* por IHQ mostraban una tendencia a mejor supervivencia independientemente del tratamiento. Otros dos artículos han señalado que la alta expresión de *BRCA1* correlaciona a mejor respuesta a taxanos en monoterapia o en combinación (Papadaki et al, 2011; Su et al, 2011). Es de señalar que el 40% de los pacientes en estadio avanzado incluidos en la figura 62, recibieron regímenes que contenían taxanos. A la vista de todos estos datos resultaría de considerable interés, llevar a cabo un estudio con un número más elevado de pacientes para determinar si la alta expresión de *BRCA1* en carcinoma escamoso se puede utilizar como marcador pronóstico y predictivo de buena respuesta a taxanos.

Asimismo, se evaluaron los niveles de expresión de mRNA del gen *SOX2* dada la alta amplificación por MLPA encontrada en nuestra población de carcinomas escamosos. En la Figura 63 se presentan las curvas de supervivencia de los pacientes en estadios I-IIIa agrupados por niveles bajos (T1) frente a intermedios-altos (T2+T3). De forma estadísticamente significativa, se observa peor OS y PFS en pacientes con expresión baja del gen (T1) frente a los del grupo intermedio-alto (T2+T3) (OS 35,5 vs 83,6 meses; $p=0,02$ y PFS 10,9 frente a 43,3 meses; $p<0,001$)(Figura 63). Este valor pronóstico de los niveles de expresión de *SOX2* desaparecía en estadios avanzados

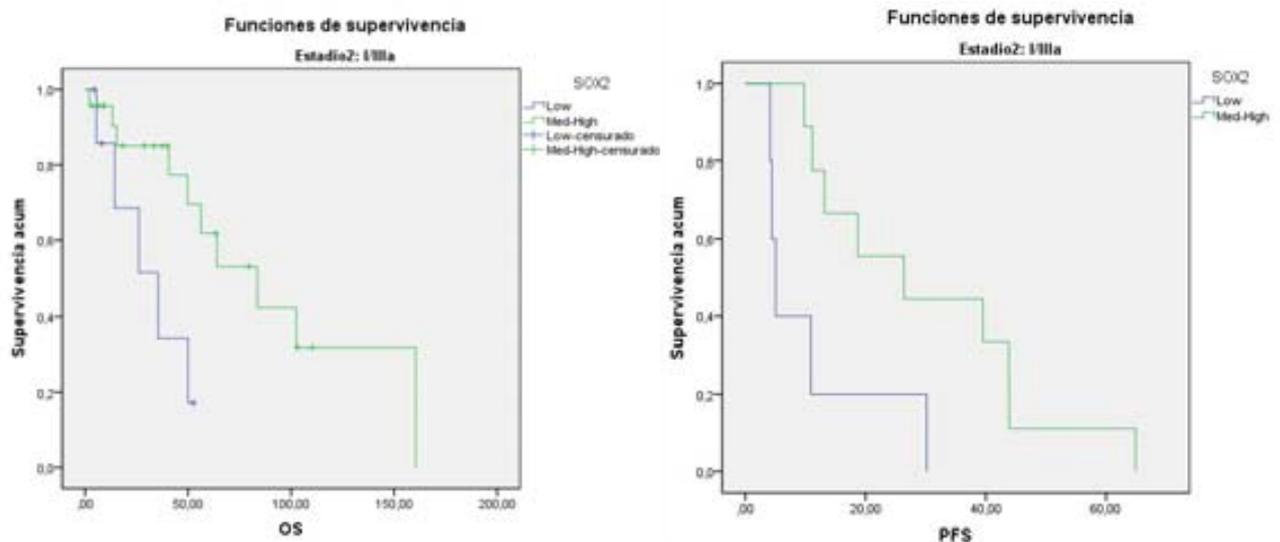


Figura 63.- Curvas Kaplan-Meier de OS y PFS en estadios I-IIIa, de acuerdo con la expresión de *SOX2* (T1 frente T2+T3). Las curvas difieren de forma significativa ($p=0,02$ y $p<0,001$ respectivamente)

Datos publicados recientemente han demostrado que altos niveles de expresión por IHQ y alta amplificación de *SOX2* correlacionan con mejor supervivencia en cáncer de pulmón (Velcheti et al, 2013; Wilbertz et al, 2011) y de ovario (Pham et al, 2013). En el presente estudio, hemos identificado como factor de buen pronóstico niveles elevados de mRNA para *SOX2* en estadios iniciales y co-amplificación de *PIK3CA+SOX2* en estadios avanzados (ver apartado 4.1), lo que confirma el interés de dicho gen como marcador en carcinomas escamosos. Además, a pesar de que *SOX2* se encuentra más amplificado y

sobreexpresado en dichos tumores que en adenocarcinomas, parece ser un factor pronóstico independiente, asociándose a supervivencias más largas en ambas histologías.

Asimismo, datos en la literatura señalan que existe correlación entre amplificación y niveles de expresión de *SOX2* (Wilbertz et al, 2011). Por ello, se compararon ambas técnicas (Tabla 29) observándose amplificación en todos los casos con niveles de expresión medio-altos (T2 + T3). En cambio, todos los casos no amplificados presentaban bajos niveles de expresión. Por tanto, en nuestra población de pacientes, la amplificación por MLPA y la alta expresión del gen *SOX2* parecen tener correlación.

Tabla 29.- Correlación de los resultados obtenidos por MLPA y mRNA expresión para *SOX2*

<i>SOX2</i>		MLPA		
		AMPLIFICADO	NO AMPLIFICADO	NV
mRNA	T2 + T3	21 (80,7%)	0	9
	T1	3 (11,5%)	3 (11,5%)	11
	NV	8	9	26

SIAH2 es una ubiquitina ligasa relacionada con apoptosis, ciclo celular, transducción de señal y supresión de tumores. Se observa que la expresión alta de *SIAH2* en los estadios avanzados presenta mejor PFS y OS de forma estadísticamente significativa. Los pacientes con expresión intermedia-alta (T2 + T3) tienen una PFS de 11,5m y una OS de 20 meses frente a 2,2 y 3,2 meses para los pacientes de baja expresión ($p < 0,001$ en ambos casos) (Figura 64).

La proteína *SIAH2* promueve la degradación de múltiples sustratos. Algunos de ellos son productos de proto-oncogenes, como la β -catenina, mientras otros tienen actividad supresora de tumores como Sprouty2, un inhibidor de *RAS* (Nakayama et al, 2009). Además, las condiciones de hipoxia-normoxia pueden alterar la selectividad de

SIAH2 por sus diferentes sustratos. Por estos motivos, los datos recogidos en estudios preclínicos sobre el papel de *SIAH2* en cáncer son dispares (Christian et al, 2011; Qi et al, 2010; Ahmed et al, 2008). En cambio, los dos únicos estudios realizados en pacientes para analizar el posible papel pronóstico de *SIAH2*, ambos en cáncer de mama quirúrgico, han demostrado una correlación entre niveles altos de *SIAH2* con mejor PFS (Confalonieri et al, 2009; Jansen et al, 2009). En uno de ellos, además, se demostró que en líneas celulares el silenciamiento de *SIAH2* induce resistencia a anti-estrógenos. Lamentablemente, no existen datos en la literatura acerca del papel pronóstico de *SIAH2* en cáncer de pulmón con lo que comparar nuestros resultados. Sin embargo, se ha descrito que baja expresión de CCNB1IP1, una ubiquitina ligasa relacionada con *SIAH2*, se correlaciona en pacientes quirúrgicos con peor supervivencia en carcinoma escamoso de pulmón pero no en adenocarcinoma (Confalonieri et al, 2009). Aunque en nuestro estudio se alcanza significación estadística sólo en estadios avanzados, se observa una tendencia a supervivencias más largas también en estadios I-IIIB (Ver apéndice).

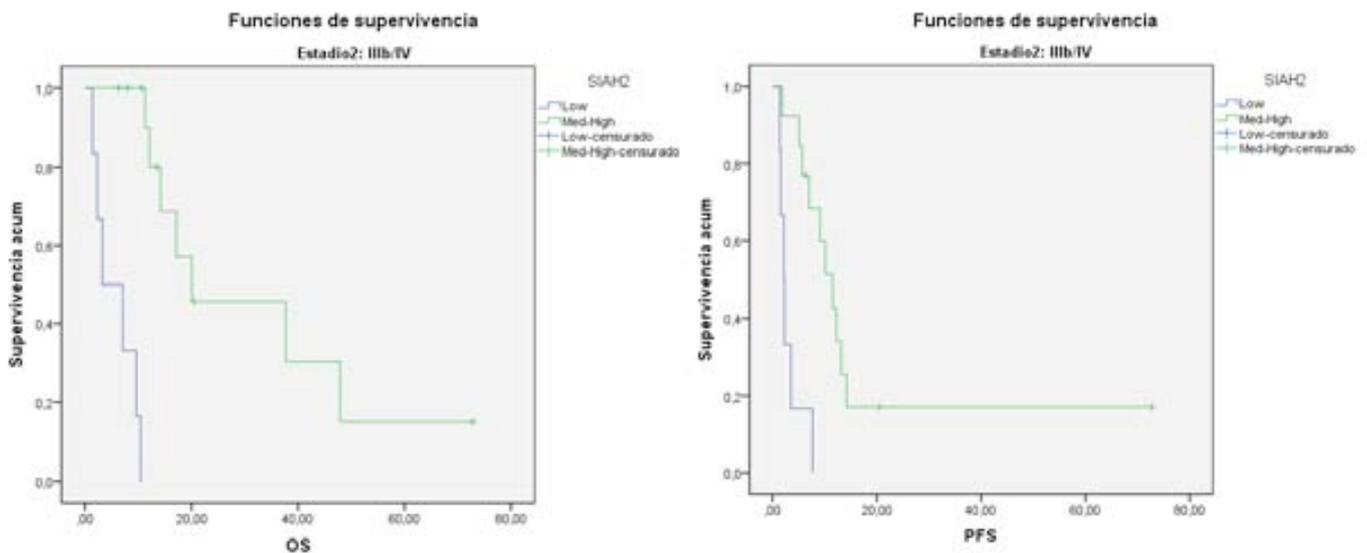


Figura 64.- Curvas Kaplan-Meier de OS y PFS en estadios IIIB-IV, de acuerdo con la expresión de *SIAH2* (bajo frente intermedio-alto). Las curvas difieren de forma significativa ($p < 0,001$ en ambos casos)

El gen *EZH2* es un represor transcripcional que juega un papel muy importante en la silenciación de diversos genes. Datos de la literatura han descrito que este gen está involucrado en el desarrollo y transformación maligna así como en la agresividad de algunos tipos de tumores, siendo ampliamente estudiado en el CPCNP (Cao et al, 2012; Kikuchi et al, 2012). En el presente estudio se ha encontrado que alta expresión de *EZH2* correlaciona de forma significativa con mejor PFS en todos los estadios y mejor OS en los estadios I-III A. Sin embargo debemos señalar que el número de pacientes analizados para este gen fue el menor de todo el estudio (n=31) y que algunos de los subgrupos contenían números muy bajos de pacientes. Por ello los resultados obtenidos se deben tomar con una precaución aún mayor. Este reducido número de pacientes podría explicar por qué nuestros datos son contradictorios con toda la bibliografía publicada en cáncer de pulmón. Así, en dos estudios realizados por RT-PCR, al igual que el nuestro, Takawa et al (2011) y Cao et al (2012) señalaron que la sobreexpresión de *EZH2* se correlacionaba con peor pronóstico en CPCNP. Otros dos trabajos en los que la proteína *EZH2* se determinó por IHQ, obtuvieron los mismos resultados (Kikuchi et al, 2010; Huqun et al, 2012). Debemos señalar que en todos ellos la población analizada comprendía tanto adenocarcinomas como carcinomas escamosos.

4.4.- DISCUSIÓN GENERAL

Dentro de los CPCNP, se ha concentrado una gran cantidad de esfuerzos en los adenocarcinomas, tanto en la práctica clínica diaria como en la investigación básica. Por ello, este tipo histológico es uno de los tumores mejor caracterizados desde el punto de vista molecular y se han desarrollado diversas terapias dirigidas contra alteraciones genéticas frecuentes en el mismo, terapias que han conseguido mejoras objetivas en supervivencia y calidad de vida en subgrupos seleccionados de pacientes. En comparación, el carcinoma escamoso ha recibido una atención relativa y no existen fármacos específicos

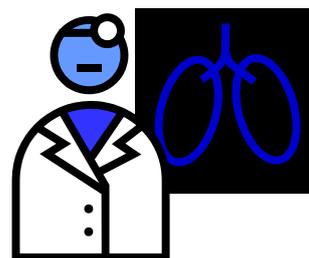
contra el mismo en uso clínico, ni se han identificado claros marcadores moleculares con valor predictivo o pronóstico.

Los resultados de la presente tesis apoyan la hipótesis que el carcinoma escamoso constituye una entidad diferenciada del adenocarcinoma desde el punto de vista molecular. Muchas alteraciones genéticas se hallan en porcentajes distintos en ambos tipos histológicos (como las mutaciones de *EGFR* o *PIK3CA*) y en algunos casos los subgrupos de alteraciones genéticas también difieren (como es el caso de las mutaciones de *K-RAS*, siendo la G12C mucho más frecuente en adenocarcinomas de fumadores). Finalmente, ciertas alteraciones parecen ser casi exclusivas del carcinoma escamoso (como la amplificación de *FGFR1*, *PIK3CA* o *SOX2*).

En este trabajo se han identificado diversos marcadores con posible valor pronóstico en carcinoma escamoso que sería interesante validar en una cohorte más amplia de pacientes lo que permitiría, además, correlacionarlos con distintos tratamientos. En estadios I-IIIa se ha correlacionado la alta expresión de los genes *SOX2* y *EZH2* con una mejor OS y PFS de forma estadísticamente significativa. Por otro lado, en estadios avanzados, no mutaciones de *K-RAS*, co-amplificación de *SOX2* + *PIK3CA* y elevada expresión de los genes *SIAH2*, *BRCA1* y *EZH2* correlacionaban, de forma estadísticamente significativa o *quasi*-significativa, con OS más larga. Estos tres últimos genes se asociaban también a mejor PFS. Todos estos marcadores se podrían integrar en firmas genéticas específicas con valor pronóstico para carcinoma escamoso.

Por lo general, se considera al carcinoma escamoso como un subtipo histológico sin marcadores predictivos definidos y con un arsenal de terapias dirigidas limitado en comparación con el adenocarcinoma. Esta tesis demuestra que esta visión no se corresponde con la realidad. En efecto, un porcentaje muy elevado de pacientes con esta patología presenta alteraciones moleculares susceptibles de tratamiento con fármacos dirigidos en uso clínico (como ITQ) o en fases avanzadas de ensayos clínicos, entre los que podemos citar amplificaciones de *FGFR1*, *AXL* y *MET* o las mutaciones de *PIK3CA*. Sería

interesante que se iniciaran más ensayos clínicos para determinar el beneficio terapéutico de tratamientos dirigidos e identificar biomarcadores de respuesta adicionales en carcinoma escamoso.



CONCLUSIONES

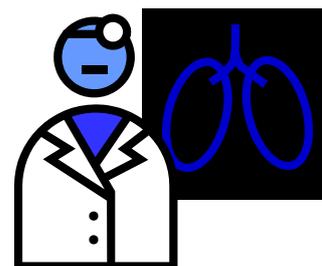
CONCLUSIÓN GENERAL:

“La distinta frecuencia de alteraciones genéticas en carcinoma escamoso y en adenocarcinoma indica que estos dos tipos histológicos de tumor son entidades diferenciadas, debiendo emplearse estrategias de búsqueda de biomarcadores específicas para cada uno”

CONCLUSIONES:

1. Se ha realizado la caracterización molecular de 95 carcinomas escamosos de pulmón analizando mutaciones, amplificaciones y niveles de expresión de genes clave.
2. En estadios I-III A de carcinoma escamoso, la sobreexpresión de *SOX2* y *EZH2* se correlacionan con mejor OS y PFS de forma estadísticamente significativa. En estadios avanzados, las no mutaciones de *K-RAS* y la alta expresión de *BRCA1*, *EZH2* y *SIAH2* se asocian de forma estadísticamente significativa con mayor OS y PFS.
3. Respecto a marcadores con potencial valor predictivo:
 - 3.1 Un porcentaje elevado (>60%) de los carcinomas escamosos presentan alteraciones genéticas susceptibles de tratamiento con diversos fármacos aprobados para uso clínico o en ensayos en fases I-III.
 - 3.2 En consecuencia sería recomendable testar todos los tumores escamosos para las siguientes alteraciones: mutaciones de *EGFR*, *BRAF*, *K-RAS*, *PIK3CA* y *TP53*, así como amplificación de *FGFR1*.
 - 3.3 La frecuencia conjunta de mutación y amplificación de *PIK3CA* en carcinoma escamoso es aproximadamente del 50%. Por ello los inhibidores de *PIK3CA* actualmente en desarrollo podrían tener un potencial significativamente superior en el carcinoma escamoso frente al adenocarcinoma.

4. No se ha podido definir una firma predictiva de respuesta por la imposibilidad de analizar marcadores genéticos en un porcentaje elevado de las muestras.
- 4.1 Sin embargo se propone la siguiente firma pronóstica para estadios IIIB-IV: niveles de expresión de *BRCA1*, *SIAH2* y *EZH2*, co-amplificación de *SOX2* + *PIK3CA* y mutaciones de *K-RAS*.
 - 4.2 Sería recomendable que la comunidad médica tomase conciencia de la importancia de obtener, siempre que resulte posible, biopsias con la mayor cantidad de material tumoral posible al objeto de realizar una caracterización molecular exhaustiva de los carcinomas escamosos.



BIBLIOGRAFÍA

A

- Aaltonen V, Boström PJ, Söderström KO, Hirvonen O, Tuukkanen J, Nurmi M et al. Urinary bladder transitional cell carcinogenesis is associated with down-regulation of *NF1* tumor suppressor gene in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 1999;154:755-65.
- Ahmed AU, Schmidt RL, Park CH, Reed NR, Hesse SE, Thomas CF et al. Effect of disrupting seven-in-absentia homolog 2 function on lung cancer cell growth. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1606-29.
- Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of Lung Cancer. *Chest* 2003;123:21S.
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ et al. Wild-type *K-RAS* is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1626-34.

B

- Bagri A, Kouros-Mehr H, Leong KG, et al: Use of anti-*VEGF* adjuvant therapy in cancer: Challenges and rationale. *Trends Mol Med* 2010;16:122-132.
- Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, et al. *SOX2* is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 2009;41:1238-42.
- Bell DW, Gore I, Okimoto RA, et al. Inherited susceptibility to lung cancer be associated with the T790M drug resistance mutation in *EGFR*. *Nat Genet* 2005; 37:1315.
- Bennet WP, Alavanja MC, Blomeke B, et al. Environmental tobacco smoke, genetic, susceptibility, and risk of lung cancer in never-smoking women. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:2009.
- Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001;81:999–1030.
- Bloomfield DJ. Should bisphosphonates be part of the standard therapy of patients with multiple myeloma or bone metastases from other cancers? An evidence-based review. *J Clin Oncol* 1998;16:1218.
- Brennan P, Hsu CC, Moullan N, et al. Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet* 2005;366:1558.
- Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, et al. Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the international lung cancer consortium. *Am J Epidemiol* 2012;176:573.
- Brcic L, Sherer CK, Shuai Y, Hornick JL, Chirieac LR, Dacic S. Morphologic and clinicopathologic features of lung squamous cell carcinomas expressing *SOX2*. *Am J Clin Pathol* 2012;138:712-8.
- Britt DE, Yang DF, Yang DQ, et al. Identification of a novel protein, LYRIC, localized to tight junctions of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res* 2004; 300:134-48.

- Brose MS, Volpe P, Feldman M, et al. *BRAF* and *RAS* mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002;62:6997-7000.
- Brugger W, Triller N, Blasinska-Morawiec M et al. Prospective molecular marker analyses of *EGFR* and *K-RAS* from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2011;29:4113-4120.
- Bykov VJ, Zache N, Stridh H, Westman J, Bergman J, Selivanova G et al. PRIMA-1(*MET*) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene* 2005;24:3484-91.

C

- Cao W, Ribeiro Rde O, Liu D, Saintigny P, Xia R, Xue Y et al. *EZH2* promotes malignant behaviors via cell cycle dysregulation and its mRNA level associates with prognosis of patient with non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2012;7:e52984.
- Capuzzo F, Hirsch FR, Rossi E et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643-655.
- Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2010;11:521-9.
- Carrillo F, Cueto A, Díaz JP, Martínez J, Padilla J, Sánchez J. Normativa terapéutica del carcinoma broncogénico. *SEPAR*. 38. 2005.
- Carrillo de Santa Pau E, Arias FC, Caso Pelaez E, Munoz Molina GM, Sanchez Hernandez I, Muguruza Trueba I, et al. Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2009;115:1701-12.
- Cataldo VD, Gibbons DL, Perez-Soler R, Quintas-Cardama A. Treatment of non-small-cell lung cancer with erlotinib or gefitinib. *N Engl J Med* 2011;364:947-55.
- Chang CJ and Hung MC. The role of *EZH2* in tumour progression. *Br J Cancer* 2011; 106:243-247.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with *BRAF* V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364: 2507-16.
- Chen HC, Jen YM, Wang CH, et al. Etiology of vocal cord paralysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2007; 69:167.
- Chen S, Xu Y, Chen Y, et al. *SOX2* gene regulates the transcriptional network of oncogenes and affects tumorigenesis of human lung cancer cells. *PLoS One* 2012;7:e36326.

- Cheran SK, Herndon JE 2nd, Patz EF Jr. Comparison of whole-body FDG-PET to bone scan for detection of bone metastases in patients with a new diagnosis of lung cancer. *Lung cancer* 2004; 44:317.
- Chernow B, Sahn SA. Carcinomatous involvement of the pleura: an analysis of 96 patients. *Am J Med* 1977;63:695.
- Christian PA, Fiandalo MV, Schwarze SR. Possible role of death receptor-mediated apoptosis by the E3 ubiquitin ligases *SIAH2* and POSH. *Mol Cancer* 2011;10:57.
- Chute CG, Greenberg ER, Barton J, et al. Presenting conditions of 1539 population-based lung cancer patients by cell type and stage in New Hampshire and Vermont. *Cancer* 1985;56:2107.
- Coggeshall J, Merrill W, Hande K, et al. Implications of hypercalcemia with respect to diagnosis and treatment of lung cancer. *Am J Med* 1986;80:325.
- Confalonieri S, Quarto M, Goisis G, Nuciforo P, Donzelli M, Jodice G et al. Alterations of ubiquitin ligases in human cancer and their association with the natural history of the tumor. *Oncogene* 2009;28:2959-68.
- Crino L, Capuzzo F, Zatloukal P et al. Gefitinib versus vinorelbine in chemotherapy-naïve elderly patients with advanced non-small-cell lung cancer (INVITE): a randomized, Phase II study. *J Clin Oncol* 2008;26:4253-4260.
- Cutler GJ, Nettleton JA, et al. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the low a Women's Health Study. *Int J Cancer* 2008;123:664.

D

- Dacic S, Flanagan M, Cieply K, Ramalingam S. Significance of *EGFR* Protein Expression and Gene Amplification in Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006;125:860-865.
- Dalakas MC. Polymyositis, dermatomyositis, and inclusion body myositis. In: Braunwald E, Fauci A, Kasper DL et al., eds. *Principles of Internal Medicine*. 15th ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001:2524-2529.
- Dalmau JO, Posner JB. Paraneoplastic syndromes affecting the nervous system. *Semin Oncol* 1997; 24:318-328.
- Day E, Waters B, Spiegel K, et al: Inhibition of collagen-induced discoidin domain receptor 1 and 2 activation by imatinib, nilotinib and dasatinib. *Eur J Pharmacol* 2008;599:44-53.
- Darby S, Whitley E, Silcocks P, et al. Risk of lung cancer associated with residential radon exposure in south-west England: a case-control study. *Br J Cancer* 1998;78:394.

- David M, Cross NC, Burgstaller S, Chase A, Curtis C, Dang R, Gardembas M et al. Durable responses to imatinib in patients with *PDGFRb* fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2007; 109: 61-64.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.
- De Luca A, Normanno N. Predictive biomarkers to tyrosine kinase inhibitors for the epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Curr Drug* 2010;11:851-864.
- Demoulin JB, Montano-Almendras C. Review article: Platelet-derived growth factors and their receptors in normal and malignant hematopoiesis. *Am J Blood Res* 2012;2:44-56.
- Do PM, Varanasi L, Fan S, et al: Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes* 2012; 26:830-845.
- Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Delghandi MP, Persson M, NilsenMN, et al. Inverse prognostic impact of angiogenic marker expression in tumor cells versus stromal cells in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:6649-57.
- Douillard JY, Shepherd FA, Hirsh V et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer: data from the randomized Phase III INTEREST trial. *J Clin Oncol* 2010;28:744-752.

E

- Ellison DH, Berl T. Clinical practice. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med* 2007;356:2064.
- Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, et al. Activation of the nuclear factor kappaB pathway by astrocyte elevated gene-1: implications for tumor progression and metastasis. *Cancer Res* 2006;66:1509-16.
- Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, et al. *MET* amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007;316:1039-1043.

F

- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81.
- Fiala O, Pesek M, Finek J, Benesova L et al. Gene mutations in squamous cell NSCLC: insignificance of *EGFR*, *K-RAS*, *PIK3CA* mutations in prediction of *EGFR*-TKI treatment efficacy. *Anticancer Res* 2013;33:1705-11.
- Fiona M, Colin J, Siemon M, Abraham J y Michael J. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *Journal of Cell Science* 2003;116:3037-3040.
- Flaherty KT, Infante JR, Daud A, et al. Combined *BRAF* and *MEK* inhibition in melanoma with *BRAF* V600 mutations. *N Engl J Med* 2012;367:1694-1703.

- Font A, Taron M, Gago JL, Costa C, Sánchez JJ, Carrato C et al. *BRCA1* mRNA expression and outcome to neoadjuvant Cisplatin-based chemotherapy in bladder cancer. *Annals of Oncology* 2010.
- Forbes, S. A. et al. (2010). COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer): a resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 38, D652-7.
- Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a Phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011;29:2866-2874.
- Funai K, Yokose T, Ishii G, et al. Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:978-84.

G

- Garassino MC, Marabese M, Rusconi P, et al. Different types of *K-RAS* mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2011;22:235-7.
- Garnett M, Marais R. Guilty as charged: *BRAF* is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004;6:313-19.
- Gascó A et al. Non-disruptive mutations of *p53* are associated with shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Enviado a J Clin Oncol*.
- Gautschi O, Pauli C, Strobel K, Hirschmann A, Printzen G, Aebi S, Diebold J. A patient with *BRAF* V600E lung adenocarcinoma responding to vemurafenib. *J Thorac Oncol.* 2012;7:e23-4.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP: The role of mutant *p53* in human cancer. *J Pathol* 2011;223:116-126.
- Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Effect of smoking reduction of lung cancer risk. *JAMA* 2005;294:1505.
- Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, et al. Prognostic significance of *K-RAS* codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:668-75.
- Grosche B, Kreuzer M, Kreisheimer M, et al. Lung cancer risk among German male uranium miners: a cohort study, 1946-1998. *Br J Cancer* 2006;95:1280.
- Gutmann DH, Giordano MJ, Mahadeo DK, Lau N, Silbergeld D, Guha A. Increased neurofibromatosis 1 gene expression in astrocytic tumors: positive regulation by p21-ras. *Oncogene* 1996;12:2121-7.

H

- Hall TC, ed. Paraneoplastic syndromes. *NY Acad Sci Ann* 1974;230:1.
- Hammerman PS, Sos ML, Ramos AH, et al: Mutations in the *DDR2* kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov* 2011;1:78-89.
- Hammond EC, Selikoff IJ, Seidman H. Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann NY Acad Sci* 1979;330:473.

- Hansen O, SØrebseb P, Hansen KH. The occurrence of hyponatremia in SCLC and the influence on prognosis: a retrospective study of 453 patients treated in a single institution in a 10-year period. *Lung Cancer* 2010;68:111.
- Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, et al. Dabrafenib in *BRAF*-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380:358-65.
- Heist RS, Mino-Kenudson M, Sequist LV, et al. *FGFR1* amplification in squamous cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol* 2012;7:1775-80.
- Henry DH, Costa L, Goldwasser F, Hirsh V, Hungria V, Prausova J et al. Randomized, double-blind study of denosumab versus zoledronic acid in the treatment of bone metastases in patients with advanced cancer (excluding breast and prostate cancer) or multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2011;29:1125-32.
- Hermonen J, Hirvonen O, Ylä-Outinen H, Lakkakorpi J, Björkstrand AS, Laurikainen L et al. Neurofibromin: expression by normal human keratinocytes in vivo and in vitro and in epidermal. *Lab Invest* 1995;73:221-8.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a Phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5034-5042.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Dziadziuszko R et al. Fluorescence in situ hybridization subgroup analysis of TRIBUTE, a Phase III trial of erlotinib plus carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6317-6323.
- Hollstein PE, Cichowski K. Identifying the ubiquitin ligase complex that regulates the NF1 tumor suppressor and Ras. *Cancer Discov* 2013. In press.
- Hu G, Wei Y, Kang Y. The multifaceted role of MTDH/AEG-1 in cancer progression. *Clin Cancer Res* 2009;15:5615-5620.
- Hughes JM, Weill H. Asbestos and man-made fibers. *Epidemiology of lung cancer*. New York: Marcel Dekker, Inc 1994:185.
- Huqun, Ishikawa R, Zhang J, Miyazawa H, Goto Y, Shimizu Y, Hagiwara K, Koyama N. Enhancer of zeste homolog 2 is a novel prognostic biomarker in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2012;118:1599-606.
- Hussenet T, Dali S, Exinger J, et al. *SOX2* is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS One* 2010;5:e8960.
- Hyde L, Hyde CI. Clinical Manifestations of lung cancer. *Chest* 1974;65:299-306.

I

- Inukai M, Toyooka S, Ito S, Asano H, Ichihara S, et al. Presence of epidermal growth factor receptor gene T790M mutation as a minor clone in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:7854-8.
- Ishizumi T, McWilliams A, MacAulay C, et al. Natural history of bronchial preinvasive lesions. *Cancer metastasis Rev* 2010;29:5-14.

J

- Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, et al. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N Engl J Med* 1990;323:632.
- Jänne PA, Shaw AT, Pereira JR, Jeannin G, Vansteenkiste J, Barrios C et al. Selumetinib plus docetaxel for *K-RAS*-mutant advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14:38-47.
- Jansen MP, Ruigrok-Ritstier K, Dorssers LC, van Staveren IL, Look MP, Meijer-van Gelder ME et al. Downregulation of *SIAH2*, an ubiquitin E3 ligase, is associated with resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2009;116:263-71.
- Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61:69.
- Johansson M, Relton C, Ueland PM, et al. Serum B vitamin levels and risk of lung cancer. *JAMA* 2010;303:2377.
- Johnson FM, Bekele BN, Feng L, et al: Phase II study of dasatinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:4609-4615.

K

- Kageyama R, Ohtsuka T, Kobayashi T. "The Hes gene family: Repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis". *Development* 2007;134:1243-1251.
- Kalikaki A, Koutsopoulos A, Hatzidaki D, et al. Clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer receiving front-line chemotherapy according to *EGFR* and *K-RAS* mutation status. *Lung Cancer* 2010;69:110-5.
- Karachaliou N, Mayo C, Costa C, Magrí I, Giménez Capitán A, Molina MA et al. *K-RAS* mutations in Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 2013;14:205-14.
- Karachaliou N, Rosell R. The role of *SOX2* in small cell lung cancer, lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Translational lung cancer research*, 2013.
- Karachaliou N, Costa C, Gimenez-Capitan A, Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Mayo C et al. Spanish Lung Cancer Group. *BRCA1*, *LMO4*, and *CtIP* mRNA expression in erlotinib-treated non-small-cell lung cancer patients with *EGFR* mutations. *J Thorac Oncol*. 2013;8:295-300.

- Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC et al. *K-RAS* mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1757-65.
- Kaufman EL, Jacobson JS, Hershman DL, et al. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:392.
- Ke ZF, Mao X, Zenq C, He S, Li S, Wang LT. *Med Oncol*. 2013;30:383.
- Kesari S, Batchelor TT. Leptomeningeal metastases. *Neurol Clin* 2003;21:25.
- Kiefer JC. Back to basics: SOX genes. *Dev Dyn* 2007;236:2356-66.
- Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, Kikuchi E, Konishi J, Oizumi S et al. Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. *Cancer* 2010;116:3015-24.
- Kikuchi J, Takashina T, Kinoshita I, Kikuchi E, Shimizu Y, Sakakibara-Konishi J et al. Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase *EZH2*, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer* 2012;78:138-43.
- Kim ES, Hirsh V, Mok T, et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet* 2008;372:1809-18.
- Kim ES, Herbst RS, Wistuba II, et al. The BATTLE trial: personalizing therapy for lung cancer. *Cancer Discov* 2011;1:44-53.
- Kobayashi N, Abedini M, Sakuragi N, Tsang BK. PRIMA-1 increases cisplatin sensitivity in chemoresistant ovarian cancer cells with p53 mutation: a requirement for Akt down-regulation. *J Ovarian Res* 2013 Jan 26;6:7.
- Krug LM, Pietanza MC, Kris MG, et al. Small cell and other neuroendocrine tumors of the lung. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. *DeVita, Hellman and Rosenberg's cancer, principles and practice of oncology*. 9th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.848-70.
- Kvale PA, Simoff M, Prakash UB. Palliative care. *Chest* 2003;123:284S.

L

- Landrigan PJ. Asbestos-still a carcinogen. *N Engl J Med* 1998;338:1618.
- Lantuejoul S, et al. Pulmonary preneoplasia-sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology* 2009;54:43-54.
- Larsen SS, Vilmann P et al. Endoscopic ultrasound guided biopsy versus mediastinoscopy for analysis of paratracheal and subcarinal lymph nodes in lung cancer staging. *Lung Cancer* 2005;48:85.

- Larrayoz M, Agorreta1 J, Pajares MJ, Montuenga LM, and Pio R. The role of *VEGFR2* in lung cancer differs between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma cell lines. AACR; Cancer Res 2011;71:Abstract nr 5143.
- Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. *TP53* and *K-RAS* mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. Cancer Res 2005;65:5076-83.
- Lee Y, Shim H, Park M, et al. High *EGFR* Gene Copy Number and Skin Rash as Predictive Markers for *EGFR* Tyrosine Kinase Inhibitors in Patients with Advanced Squamous Cell Lung Carcinoma. Clin Cancer Res 2012;18:1760-1768.
- Lehmann BD, Pietenpol JA. Targeting mutant p53 in human tumors. J Clin Oncol 2012;30:3648-50.
- Lehmann S, Bykov VJ, Ali D, Andrén O, Cherif H, Tidefelt U et al. Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. J Clin Oncol 2012;30:3633-9.
- Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. Nat Rev Immunol 2008;8:327-336.
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, et al. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. J Cell Sci 2000;113: 1661-1670.
- Li Y, Sheu CC, Ye Y et al. Genetic variants and risk of lung cancer in never smokers: a genome-wide association study. Lancet Oncol 2010;11:321.
- Linardou H DI, Kanaloupiti D, et al. Assessment of somatic K-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. Lancet Oncol 2008;9:962-72.
- Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine Kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. J. Thorac Oncol 2013;137:828-860.
- Liu L, Greger J, Shi H, et al. Novel mechanism of Lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. Cancer Res 2009;69:6871-8.
- Loupakis F, Pollina L, Stasi I, Ruzzo A, Scartozzi M, Santini D et al. PTEN expression and K-RAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2009;27:2622-9.
- Lutterbach B, Zeng Q, Davis LJ, et al: Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on MET for growth and survival. Cancer Res 2007;67:2081-2088.

M

- Ma PC, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, et al. Functional expression and mutations of *c-MET* and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2005;65:1479-1488.
- Mahabir S, Spitz MR, Barrera SL, et al. Dietary zinc, copper and selenium, and risk of lung cancer. *Int J Cancer* 2007;120:1108.
- Mahadevan D, Cooke L, Riley C, et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2007;26:3909-19.
- Maier S, Wilbertz T, Braun M, et al. *SOX2* amplification is a common event in squamous cell carcinomas of different organ sites. *Hum Pathol* 2011;42:1078-88.
- Matsubara D, Ishikawa S, Sachiko O, Aburatani H, Fukayama M, Niki T. Co-activation of epidermal growth factor receptor and *c-MET* defines a distinct subset of lung adenocarcinomas. *Am J Pathol* 2010;177:2191-204.
- Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina-Vila MA, Giménez-Capitán A, Costa C, Rosell R. Pharmacogenetics of *EGFR* in lung cancer: perspectives and clinical applications. *Pharmacogenomics* 2012;13:789-802.
- Marchetti A, Felicioni L, Malatesta S, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small cell lung cancer harboring *BRAF* mutations. *J Clin Oncol* 2011;29:3574-79.
- Martinez-Lavin M, Matucci-Cerinic M, Jajic J, et al. Hypertrophic osteoarthropathy: consensus on its definition, classification, assessment and diagnostic criteria. *J Rheumatol* 1993;20:1386.
- Mascaux C, Iannino N, Martin B, et al. The role of *RAS* oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2005;92:131-9.
- Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2005;93:825.
- Mao C, Qiu LX, Liao RY, et al. *K-RAS* mutations and resistance to *EGFR*-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer* 2010;69:272-8.
- Mentzer SJ, Swanson SJ, DeCamp MM, et al. Mediastinoscopy, thoracoscopy, and video-assisted thoracic surgery in the diagnosis and staging of lung cancer. *Chest* 1997;112:239S.
- Merchut MP. Brain metastases from undiagnosed systemic neoplasms. *Arch Intern Med* 1989;149:1076.
- Metro G, Chiari R, Baldi A, De Angelis V, Minotti V, Crinò L. Selumetinib: a promising pharmacologic approach for *K-RAS*-mutant advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncol* 2013;9:167-77.
- Miller AB, Altenburg HP, Bueno-de-Mesquita B, et al. Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2004;108:269.

- Miller V. A, POC, C. Soh, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIb trial (ATLAS) comparing bevacizumab (B) therapy with or without erlotinib (E) after completion of chemotherapy with B for first-line treatment of locally advanced, recurrent, or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:abstract LBA8002.
- Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larrañaga N, Capocaccia R & Martínez C for the CIBERESP Working Group. *Annals of Oncology* 21 (Supplement 3): iii30-iii36, 2010.
- Mok T, Wu YL, Zhang L. A small step towards personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Discov Med.* 2009;8:227-31.
- Molina-Vila MA, Teixidó C and Costa C: Impact of the new *EGF* receptor and *ALK* testing guideline on personalized lung cancer medicine. *Personalized Medicine* 2013;10:415-417.
- Moran T et al. Spanish Lung Cancer Group. Interim analysis of the Spanish Lung Cancer Group (SLCG) *BRCA1-RAP80* expression customization (BREC) randomized phase III trial of customized therapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p). Abstract LBA8002. ASCO 2013.
- Mossman BT. Carcinogenic potential of asbestos and nonasbestos fibers. *J Environ Sci Health* 1988;6:151.
- Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, et al. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology* 2007;242:882.
- Mundy GR. Hypercalcemic factors other than parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1989;18:795.
- Muñoz A. Cáncer. Genes y nuevas terapias. Editorial Hélice 1997.

N

- Nakayama K, et al. The ubiquitin ligase *SIAH2* and the hypoxia response. *Mol Cancer Res* 2009;7:443-451.
- Nathanson L, Puccio M. The cancer cachexia syndrome. *Semin Oncol* 1997;24:277.
- Newcomb PA, Carbone PP. The health consequences of smoking. *Cancer. Med Clin North Am* 1992;76:305.
- Normanno N, De Luca A, Bianco C et al. Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) signaling in cancer. *Gene* 2006;366:2-16.
- Nowak R. Cancer Prevention. Beta-carotene: helpful or harmful? *Science* 1994;264:500.

O

- Okudela K, Suzuki M, Kageyama S, et al. *PIK3CA* mutation and amplification in human lung cancer. *Pathol Int* 2007;57:664-71.

- Olson JE, Yang P, Schmitz K, et al. Differential association of body mass index and fat distribution with three major histologic types of lung cancer: evidence from a cohort of older women. *Am J Epidemiol* 2002;156:606.
- Olsson AC, Gustavsson P, Kromhout H, et al. Exposure to diesel motor exhaust and lung cancer risk in a pooled analyses from case-control studies in Europe and Canada. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:941.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, et al: *VEGF* receptor signalling in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:359-371.

P

- Paik P, Arcila ME, Fara M, et al. Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring *BRAF* mutations. *J Clin Oncol* 2011;29:2046-51.
- Pajares MJ, Agorreta J, Larrayoz M, Vesin A, Ezponda T, Zudaire I et al. Expression of Tumor-Derived Vascular Endothelial GrowthFactor and Its Receptors Is Associated With Outcome inEarly Squamous Cell Carcinoma of the Lung. *J Clin Oncol* 30:1129-1136.
- Pao W, Iafrate AJ, Su Z. Genetically informed lung cancer medicine. *J Pathol.* 2010.
- Paone G, Nicastrì E, Lucantoni G, et al. Endobronchial ultrasound-driven biopsy in the diagnosis of peripheral lung lesions. *Chest* 2005;128:3551.
- Papadaki C, Tsaroucha E, Kaklamanis L, Lagoudaki E, Trypaki M, Tryfonidis K et al. Correlation of BRCA1, TXR1 and TSP1 mRNA expression with treatment outcome to docetaxel-based first-line chemotherapy in patients with advanced/metastatic non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2011;104:316-23.
- Papin C, Denouel-Galy A, Laugier D, Calothy G, Eychène A. Modulation of kinase activity and oncogenic properties by alternative splicing reveals a novel regulatory mechanism for *BRAF*. *J Biol Chem* 1998;273:24939-47.
- Parsons A, Daley A, Begh R, Aveyard P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ* 2010;340:b5569.
- Patel AM, Peters SG. Clinical manifestations of lung cancer. *Mayo Clin Proc* 1993;68:273.
- Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, Von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R et al. FLEX Study Team. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet.* 2009;373:1525-31.

- Pirker R, Pereira JR, Von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K et al. *EGFR* expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*. 2012;13:33-42.
- Pham DL, Scheble V, Bareiss P, Fischer A, Beschorner C, Adam A et al. *SOX2* Expression and Prognostic Significance in Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 2013;32:358-67.
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA et al. *TP53* mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007;357:2552-61.
- Pope CA, III, Dockery DW, Schwartz J. Review of epidemiological evidence of health effects of particulate air pollution *Inhal Toxicol* 1995;7:1.
- Pretreatment evaluation of non-small-cell lung cancer. The American Thoracic Society and the European Respiratory Society. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:320.
- Pros E, Lantuejoul S, Sanchez-Verde L, Castillo SD, Bonastre E, Suarez-Gauthier A et al. Determining the profiles and parameters for gene amplification testing of growth factor receptors in lung cancer. *Int J Cancer* 2013;133:898-907.

Q

- Qi J, Nakayama K, Cardiff RD, Borowsky AD, Kaul K, Williams R et al. *Siah2*-dependent concerted activity of HIF and FoxA2 regulates formation of neuroendocrine phenotype and neuroendocrine prostate tumors. *Cancer Cell* 2010;18:23-38.

R

- Rapp E, Pater JL, Wilan A, et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer report of a Canadian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1988;6:633.
- Riely GJ, Marks J, Pao W. *K-RAS* mutations in non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 2009;6:201-5.
- Ríos M, Hernández M. Los genes supresores de tumores y el cáncer. *Rev Cubana Oncol* 2001;17:65-71.
- Rivera MP, Mehta AC, American College of Chest Physicians. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007;132:131.
- Roberts JR, Blum MG, Arildsen R, et al. Prospective comparison of radiologic, thoracoscopic and pathologic staging in patients with early non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1999; 68:1554.
- Roberts PJ, Stinchcombe TE, Der CJ, Socinski MA. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is *K-RAS* a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? *J Clin Oncol* 2010;28:4769-77.

- Rosell R et al; Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione italiana Oncologia Toracica. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced *EGFR* mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012;13:239-46.
- Rosell R, Viteri S, Molina MA, Benlloch S, Taron M. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as first-line treatment in advanced nonsmall-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol.* 2010;22:112-20.
- Rosell R, Vergnenegre A, et al. Biomarkers in lung oncology. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2010;23:508-514.
- Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C et al; Spanish Lung Cancer Group. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958-67.
- Rosell R, Perez-Roca L, Sanchez JJ, Cobo M, Moran T, Chaib I et al. Customized treatment in non-small-cell lung cancer based on *EGFR* mutations and *BRCA1* mRNA expression. *PLoS One* 2009;4:e5133.
- Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sánchez JJ et al. *BRCA1*: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PloS One* 2007;11:e1129.
- Reguart N, Cardona AF, Carrasco E, Gómez P, Taron M, Rosell R. *BRCA1*: a new genomic marker for non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer* 2008;9:331-339.

S

- Salsali M, Clifton EE. Superior vena caval obstruction in carcinoma of the lung. *N Y State J Med* 1969;69:2875.
- Samet JM. Health benefits of smoking cessation. *Clin Chest Med* 1991;12:669.
- Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S et al. High frequency of mutations of the *PIK3CA* gene in human cancers. *Science.* 2004;304:554.
- Sarkar D, Emdad L, Lee SG, Yoo BK, Su ZZ, Fisher PB. Astrocyte elevated gene-1: far more than just a gene regulated in astrocytes. *Cancer Res* 2009;69:8529-35.
- Sasaki H, Yokota K, Hikosaka Y, et al. Increased *SOX2* copy number in lung squamous cell carcinomas. *Exp Ther Med* 2012;3:44-48.
- Schildhaus HU, Heukamp LC, Merkelbach-Bruse S, et al. Definition of a fluorescence in-situ hybridization score identifies high- and low-level *FGFR1* amplification types in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 2012;25:1473-80.
- Seta KA, Spicer Z, Yuan Y, Lu G, Millhorn DE. Responding to hypoxia: lessons from a model cell line. *Sci STKE* 2002;2002:RE11.

- Shekelle RB, Tangney CC, Rossof AH, et al. Serum cholesterol, beta-carotene, and risk of lung cancer. *Epidemiology* 1992;3:282.
- Shepherd FA, Tsao MS. Unraveling the mystery of prognostic and predictive factors in epidermal growth factor receptor therapy. *J Clin Oncol* 2006;24:1219-20.
- Sholl LM, Barletta JA, Yeap BY, et al. *SOX2* protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010;34:1193-8.
- Scott WJ, Howington J, Feigenberg S, et al. Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II. ACCP Evidence- Based Clinical Practice Guidelines (2nd Edition). *Chest* 2007;132:234S-42S.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:339-46.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10.
- Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, et al. *K-RAS* oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990;323:561-5.
- Spoerke JM, O'Brien C, Huw L, Koeppen H, Fridlyand J, Brachmann RK et al. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res* 2012;18:6771-83.
- UyBico S, Wu C, Suh R, Le N, Brown K, Krishnam M et al. Lung cancer staging essentials: The new TNM Staging system and potential pitfalls. *Radiographics*, 2010.
- Su C, Zhou S, Zhang L, Ren S, Xu J, Zhang J et al. *ERCC1*, *RRM1* and *BRCA1* mRNA expression levels and clinical outcome of advanced non-small cell lung cancer. *Med Oncol* 2011;28:1411-7.
- Sun JM, Hwang DW, Ahn JS, Ahn MJ, Park K. Prognostic and Predictive Value of *K-RAS* Mutations in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2013;8:e64816.

T

- Taeko K, Ryoichiro K, et al. HES1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling. *Genes to cells* 2010;15:689-698.
- Takawa M, Masuda K, Kunizaki M, Daigo Y, Takagi K, Iwai Y et al. Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci* 2011;102:1298-305.
- Taron M, Rosell R, Felip E, Méndez P, Souglakos J, Sánchez Ronco M et al. *BRCA1* mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Human Molecular Genetics* 2004;13:2443-2449.

- Taron M, Ichinose Y, Rosell R, et al. Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2005;11:5878-85.
- Thomson SA, Fishbein L, Wallace MR. *NF1* mutations and molecular testing. *J Child Neurol* 2002;17:555-61.
- Tiseo M, Bordi P, Bortesi B, Boni L, Boni C, Baldini E et al. *ERCC1/BRCA1* expression and gene polymorphisms as prognostic and predictive factors in advanced NSCLC treated with or without cisplatin. *Br J Cancer* 2013;108:1695-703.
- Toschi L, Finocchiaro G, Teresa T. *SOX2* and *FGFR1* gene copy number in surgically resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 2012;30: abstr 7061.
- Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al, In collaboration with L.H. Sobin and pathologists from 14 countries. *Histological Typing of Lung and Pleural Tumors*. 3rd edition. Berlin: Springer;1999.
- Trahey M, McCormick F. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* 1987;238:542-5.
- Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC. *Pathology and Genetics. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon France: IARC Press;2004.
- Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2011;6:244.
- Travis WD. *Pathology of Lung Cancer*. *Clin Chest Med* 2011;32:669-692.
- Trbusek M, Smardova J, Malcikova J, Sebejova L, Dobes P, Svitakova M et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:2703-8.
- Tsao M. S. PH, A. Bourredjem, et al. LACE-bio pooled analysis of the prognostic and predictive value of *K-RAS* mutation in completely resected non-small cell lung cancer (NSCLC). *Annals of Oncology* 2010;21:abstract 4218.
- Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, et al. Preexistence and clonal selection of *MET* amplification in *EGFR* mutant NSCLC. *Cancer Cell* 2010;17:77-88.
- Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:116-29.

V

- Vansteenkiste JF, Stroobants SS. PET scan in lung cancer: current recommendations and innovations. *J Thorac Oncol* 2006; 1:71.

- Vachtenheim J, Horáková I, Novotná H, Opáalka P, Roubková H. Mutations of *K-RAS* oncogene and absence of H-ras mutations in squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res* 1995;1:359-65.
- Végran F, Rebutti M, Chevrier S, Cadouet M, Boidot R, Lizard-Nacol S. Only missense mutations affecting the DNA binding domain of p53 influence outcomes in patients with breast carcinoma. *PLoS One* 2013;8(1):e55103.
- Velcheti V, Schalper K, Yao X, Cheng H, Kocoglu M, Dhodapkar K et al. High *SOX2* levels predict better outcome in non-small cell lung carcinomas. *PLoS One* 2013;8:e61427.
- Vyacheslay A et al. *AXL*-dependent signaling: a clinical update. *Clin Sci* 2012;122:361-368.

W

- Wang H, Wu H, Cai K, Ju Q, Wang W. Phosphatidylinositol 3-kinase could be a promising target in lung cancer therapy. *J BUON* 2012;17:729-34.
- Weiss J, Sos ML, Seidel D, et al. Frequent and focal *FGFR1* amplification associates with therapeutically tractable *FGFR1* dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2010;2:62-93.
- Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, et al. *SOX2* gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 2011;24:944-53.
- Wei J, Costa C, Ding Y, Zou Z, Yu L, Sánchez JJ et al. mRNA expression of *BRCA1*, *PIAS1*, and *PIAS4* and survival after second-line Docetaxel in advanced gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:1552-1556.
- Wu Yl, Chu DT, Han B, Liu X, Zhang L, Zhou C et al. Phase III, randomized, open-label, first-line study in Asia of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer: evaluation of patients recruited from mainland China. *J Clin Oncol* 2012;8:232-43.

X

- Xu Y et al. Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* 2003;10:400-403.
- Xu J, Reumers J, Couceiro JR, et al: Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol* 2011;7:285-295.

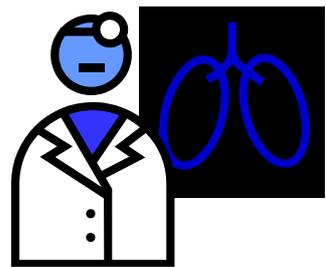
Y

- Chen YH, Hung MC, Li LY. Review article. *EZH2*: a pivotal regulator in controlling cell differentiation. *Am J Transl Res* 2012;4:364-375.
- Yatabe Y, Takahashi T, Mitsudomi T Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of *EGFR*-mutated lung cancer. *Cancer Res* 2008;68:2106-2111.

- Yi CA, Lee KS, Kim BT, et al. Tissue characterization of solitary pulmonary nodule: comparative study between helical dynamic CT and integrated PET/CT. *J Nucl Med* 2006;47:443.

Z

- Zandi R, Xu K, Poulsen HS, Roth JA, Ji L. The effect of adenovirus-mediated gene expression of FHIT in small cell lung cancer cells. *Cancer Invest* 2011;29:683-91.
- Zhou W, Ercan D, Chen L, Yun CH, Li D et al. Novel mutant-selective *EGFR* kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* 2009;462:1070-4.
- Zou ZQ, Zhang LN, Wang F, Bellenger J, Shen YZ, Zhang XH. The novel dual PI3K/mTOR inhibitor GDC-0941 synergizes with the MEK inhibitor U0126 in non-small cell lung cancer cells. *Mol Med Rep* 2012;5:503-8.



APÉNDICE

A1.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de BRCA1 (n= 44)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS				
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	p			
<i>BRCA1</i>	Medianas	I-III A	M1	30,17	0,98	56,27	0,64			
			M2	18,70		48,97				
		III B-IV	M1	2,30		0,004		7,10	0,003	
			M2	11,50				17,13		
		Terciles	I-III A	T1		43,83		0,54	63,93	0,025
				T2		14,33			31,50	
	T3			26,37	49,67					
	III B-IV		T1	3,53	0,005	7,10	0,021			
			T2	2,17		10,43				
			T3	11,50		17,13				
	33/66	I-III A	T1	43,83	0,80	63,93	0,14			
			T2 + T3	25,83		48,97				
		III B-IV	T1	3,53		0,019		7,10	0,007	
			T2 + T3	9,10				17,13		
	66/33	I-III A	T3	26,37	0,39	49,67	0,21			
			T1 + T2	25,83		48,97				
		III B-IV	T3	11,50		0,002		17,13	0,012	
			T1 + T2	3,53				9,63		

A2.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de RAP80 (n= 46)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	p	
RAP80	Medianas	I-III A	M1	30,17	0,94	49,97	0,56	
			M2	26,37		63,93		
		III B-IV	M1	7,00	0,21	11,27	0,34	
			M2	7,67		17,13		
		Terciles	I-III A	T1	30,17	0,70	49,93	0,98
				T2	25,83		48,97	
	T3			18,70	63,93			
	III B-IV		T1	7,00	0,09	14,17	0,19	
			T2	5,10		9,63		
			T3	13,17		17,13		
	33/66	I-III A	T1	30,17	0,48	49,93	0,94	
			T2 + T3	25,83		49,67		
		III B-IV	T1	7,00	0,61	14,17	0,99	
			T2 + T3	5,10		9,63		
	66/33	I-III A	T3	18,70	0,94	63,93	0,84	
			T1 + T2	26,37		49,67		
		III B-IV	T3	13,17	0,07	17,13	0,27	
			T1 + T2	7,00		11,27		

A3.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de AEG1 (n=52)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	P	TIEMPO (meses)	p	
<i>AEG1</i>	Medianas	I-III A	M1	28,90	0,36	49,93	0,96	
			M2	43,87		63,93		
		III B-IV	M1	7,00	0,80	10,43	0,88	
			M2	5,10		20,03		
		Terciles	I-III A	T1	28,90	0,45	49,93	0,56
				T2	47,33		102,50	
	T3			26,37	49,67			
	III B-IV		T1	7,00	0,98	9,63	0,97	
			T2	9,10		37,67		
			T3	5,10		20,03		
	33/66	I-III A	T1	28,90	0,36	49,93	0,78	
			T2 + T3	43,87		63,93		
		III B-IV	T1	7,00	0,94	9,63	0,83	
			T2 + T3	5,67		20,03		
		66/33	I-III A	T3	26,37	0,71	49,67	0,40
				T1 + T2	30,17		56,27	
	III B-IV		T3	5,10	0,82	20,03	0,99	
			T1 + T2	7,00		11,27		

A4.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de EZH2 (n=31)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	p	
<i>EZH2</i>	Medianas	I-III A	M1	25,83	0,035	49,93	0,12	
			M2	47,33		NR		
		III B-IV	M1	2,30	0,002	7,10	0,047	
			M2	9,10		14,17		
		Terciles	I-III A	T1	10,90	<0,001	17,37	0,016
				T2	30,50		56,27	
	T3			NR	NR			
	III B-IV		T1	2,30	0,015	10,43	0,23	
			T2	7,67		9,63		
			T3	9,10		14,17		
	33/66	I-III A	T1	10,90	0,001	17,37	0,007	
			T2 + T3	43,83		63,93		
		III B-IV	T1	2,30	0,006	10,43	0,18	
			T2 + T3	9,10		14,17		
	66/33	I-III A	T3	NR	0,003	NR	0,05	
			T1 + T2	14,33		49,93		
		III B-IV	T3	9,10	0,041	14,17	0,11	
			T1 + T2	3,53		9,63		

A5.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de SOX2 (n= 48)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	p	
SOX2	Medianas	I-III A	M1	14,33	0,14	40,63	0,15	
			M2	43,83		83,60		
		III B-IV	M1	7,00	0,59	29,43	0,67	
			M2	11,50		20,03		
		Terciles	I-III A	T1	10,90	0,001	35,50	0,043
				T2	64,93		83,60	
	T3			26,37	56,27			
	III B-IV		T1	7,00	0,48	29,43	0,89	
			T2	10,13		20,03		
			T3	12,20		17,13		
	33/66	I-III A	T1	10,90	<0,001	35,50	0,02	
			T2 + T3	43,83		83,60		
		III B-IV	T1	7,00	0,59	29,43	0,67	
			T2 + T3	11,50		20,03		
		66/33	I-III A	T3	26,37	0,75	56,27	0,81
				T1 + T2	30,17		63,93	
	III B-IV		T3	12,20	0,27	17,13	0,97	
			T1 + T2	7,67		29,43		

A6.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de NF1 (n= 47)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS	
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	p
NF1	Medianas	I-III A	M1	14,33	0,10	49,93	0,17
			M2	28,90		49,67	
		III B-IV	M1	3,53	0,42	7,10	0,19
			M2	9,10		14,17	
	Terciles	I-III A	T1	10,90	0,17	31,50	0,39
			T2	30,17		49,93	
			T3	28,90		49,67	
		III B-IV	T1	2,30	0,32	3,23	0,20
			T2	5,67		11,27	
			T3	10,13		17,13	
	33/66	I-III A	T1	10,90	0,07	31,50	0,18
			T2 + T3	28,90		49,93	
		III B-IV	T1	2,30	0,17	3,23	0,08
			T2 + T3	10,13		17,13	
	66/33	I-III A	T3	28,90	0,18	49,67	0,39
			T1 + T2	25,83		49,93	
III B-IV		T3	10,13	0,17	17,13	0,22	
		T1 + T2	5,10		11,27		

A7.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de *FGFR1* (n=36)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	p	
<i>FGFR1</i>	Medianas	I-III A	M1	13,13	0,48	49,93	0,70	
			M2	26,37		49,67		
		III B-IV	M1	7,00	0,54	37,67	0,85	
			M2	9,10		14,17		
		Terciles	I-III A	T1	13,13	0,88	NR	0,44
				T2	30,17		NR	
	T3			14,33	35,50			
	III B-IV		T1	7,00	0,64	37,67	0,76	
			T2	7,67		11,27		
			T3	9,10		14,17		
	33/66	I-III A	T1	13,13	0,68	NR	0,70	
			T2 + T3	26,37		49,67		
		III B-IV	T1	7,00	0,41	37,67	0,46	
			T2 + T3	9,10		11,27		
	66/33	I-III A	T3	14,33	0,66	35,50	0,20	
			T1 + T2	13,13		NR		
		III B-IV	T3	9,10	1,00	14,17	0,75	
			T1 + T2	7,00		20,03		

A8.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de EGFR (n=40)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	P	
EGFR	Medianas	I-III A	M1	18,70	0,39	49,93	0,14	
			M2	39,50		63,93		
		III B-IV	M1	2,17	0,19	3,23	0,12	
			M2	7,67		20,03		
		Terciles	I-III A	T1	14,33	0,18	56,27	0,27
				T2	30,17		63,93	
	T3			133,93	49,67			
	III B-IV		T1	2,17	0,72	10,43	0,62	
			T2	7,00		47,87		
			T3	5,67		14,17		
	33/66	I-III A	T1	14,33	0,15	56,27	0,11	
			T2 + T3	39,50		63,93		
		III B-IV	T1	2,17	0,45	10,43	0,41	
			T2 + T3	7,00		20,03		
	66/33	I-III A	T3	133,93	0,09	49,67	0,37	
			T1 + T2	18,70		56,27		
		III B-IV	T3	5,67	0,92	14,17	0,99	
			T1 + T2	7,00		37,67		

A9.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de HES1 (n= 35)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	P	TIEMPO (meses)	P	
<i>HES1</i>	Medianas	I-III A	M1	25,83	0,57	56,27	0,25	
			M2	43,87		48,97		
		III B-IV	M1	2,30	0,53	3,23	0,70	
			M2	7,00		11,27		
		Terciles	I-III A	T1	25,83	0,35	56,27	0,48
				T2	18,70		48,97	
	T3			43,87	63,93			
	III B-IV		T1	2,30	0,56	3,23	0,92	
			T2	5,10		NR		
			T3	7,00		11,27		
	33/66	I-III A	T1	25,83	0,16	56,27	0,44	
			T2 + T3	30,17		48,97		
		III B-IV	T1	2,30	0,85	3,23	0,79	
			T2 + T3	7,00		11,27		
	66/33	I-III A	T3	43,87	0,38	63,93	0,69	
			T1 + T2	25,83		49,93		
		III B-IV	T3	7,00	0,38	11,27	0,98	
			T1 + T2	2,30		3,23		

A10.- Análisis de OS y PFS en la población estudiada de acuerdo con los niveles de expresión de SIAH2 (n=48)

GEN	CLASIFIC.	ESTADIO	DIVISIÓN	PFS		OS		
				TIEMPO (meses)	p	TIEMPO (meses)	p	
<i>SIAH2</i>	Medianas	I-III A	M1	25,83	0,14	49,93	0,13	
			M2	43,87		63,93		
		III B-IV	M1	2,30	0,19	9,63	0,15	
			M2	11,50		20,03		
		Terciles	I-III A	T1	25,83	0,32	40,63	0,77
				T2	NR		NR	
	T3			39,50	63,93			
	III B-IV		T1	2,17	0,002	3,23	<0,001	
			T2	12,20		17,13		
			T3	10,13		47,87		
	33/66	I-III A	T1	25,83	0,22	40,63	0,47	
			T2 + T3	43,83		63,93		
		III B-IV	T1	2,17	<0,001	3,23	<0,001	
			T2 + T3	11,50		20,03		
		66/33	I-III A	T3	39,50	0,87	63,93	0,76
				T1 + T2	30,17		56,27	
	III B-IV		T3	10,13	0,28	47,87	0,16	
			T1 + T2	5,10		12,10		