

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



TESIS DOCTORAL

**Identificación mediante inmunohistoquímica de factores pronósticos
biomoleculares en el carcinoma broncogénico no microcítico en estadio precoz
resecado**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

José Ramón Jarabo Sarceda

Directores

Joaquín Calatayud Gastardi
Florentino Hernando Trancho
Ana María Gómez Martínez

Madrid, 2014



TESIS DOCTORAL

Identificación mediante inmunohistoquímica de factores pronósticos
biomoleculares en el carcinoma broncogénico no microcítico
en estadio precoz resecaado

José Ramón Jarabo Sarceda

Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
Abril, 2014



TESIS DOCTORAL

Identificación mediante inmunohistoquímica de factores pronósticos biomoleculares en el carcinoma broncogénico no microcítico en estadio precoz reseado

José Ramón Jarabo Sarceda

Directores:

Dr. Joaquín Calatayud Gastardi
Profesor Asociado UCM

Dr. Florentino Hernando Trancho
Profesor Asociado UCM

Dra. Ana María Gómez Martínez
Profesora Asociada UCM

Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

Abril, 2014

*Al motor de mi vida
y
a mis dos pequeños fogoneros...*

Informe de Director: Dra. Ana María Gómez Martínez

El objetivo del trabajo que da forma a esta tesis doctoral es identificar factores pronósticos biomoleculares en estadios precoces de carcinoma broncogénico no microcítico en pacientes que han sido sometidos a resección quirúrgica con intención curativa.

El objetivo es ambicioso. A raíz de una batería de proteínas seleccionada en función de una relación demostrada o sospechada con el desarrollo y evolución del carcinoma broncogénico no microcítico, y utilizando la metodología de microarrays e inmunohistoquímica, nos propusimos desarrollar un análisis univariante primero, para la totalidad de dichas proteínas, para después, desarrollar un análisis multivariante en el que pudiésemos valorar el papel pronóstico independiente (es decir, no sesgado por factores clínicos que pudieran ser fuente de confusión) de dichas proteínas.

La introducción que realiza el doctorando es exhaustiva, con un viaje por el estado del arte actual en cáncer de pulmón.

Plantea adecuadamente los objetivos (principal y secundarios) y plantea una metodología adecuada dentro de la complejidad que tiene en sí misma, sobre todo para su explicación por parte de un cirujano. Pero es evidente que el autor ha sido formado en la materia de la biología molecular y conoce las técnicas de investigación actuales para estudiar la expresión de genes y proteínas.

Los resultados están bien expresados y son interesantes. Tres de las 21 proteínas analizadas funcionaron como factores de mal pronóstico tanto en términos de supervivencia como de intervalo libre de enfermedad. Entre los factores clínicos queda expuesta la homogeneidad de la serie, que favorecería una eventual validación externa en pacientes procedentes de series quirúrgicas.

La discusión es completa. No divaga y se ciñe claramente a los objetivos y resultados del estudio.

Las conclusiones hacen buena referencia a los objetivos analizados en base a la hipótesis de trabajo planteada.

Por todo ello, creo que este trabajo que ahora ve la luz, y que ha precisado de un período relati-

vamente largo para poder ser desarrollado es merecedor de optar al grado de doctor por parte José Ramón Jarabo.

Dra. Ana María Gómez Martínez
Servicio de Cirugía Torácica
Hospital Clínico San Carlos de Madrid
Profesora Asociada de la Universidad Complutense de Madrid

Informe de Director: Dr. Florentino Hernando Trancho

He de decir que esperaba con gran ilusión que esta tesis doctoral viera la luz. Han sido unos años de trabajo, con avatares de una u otra índole, pero el resultado ha merecido la espera.

Y es un orgullo que entre mis primeros pasos como Jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Clínico San Carlos esté informando este trabajo, en tanto en cuanto tanto el proyecto, como su autor principal, quien con él aspira al título de Doctor, se han gestado en esta casa y llevan por tanto el sello inequívoco de este centro, tanto en su vertiente asistencial, como docente-universitaria.

La implicación del cirujano en la enfermedad en toda su extensión, es seña de identidad de la cirugía general y torácica del hospital. Desde siempre. La oncología torácica es la razón de ser de los cirujanos torácicos desde que, como bien resalta el doctorando en su revisión histórica de la especialidad, la tuberculosis pudo ser controlada con antimicrobianos y sus devastadores efectos sobre el tórax pasaron a un segundo plano al lado de la gran epidemia que la segunda mitad del siglo XX nos dejó: el cáncer de pulmón, inexorablemente vinculado al creciente consumo de tabaco.

Una gran mayoría de nuestros pacientes padecen un cáncer de pulmón. Y la cirugía trata de ofrecer, quizá con cierta vanidad, pero sustentada en la evidencia, las mayores opciones de curación. Sin embargo, éstas solo son posibles en los estadios más precoces, situaciones en que se puede hablar de “cirugía completa”. Aún así, un gran porcentaje de pacientes en estadios precoces que son intervenidos con una intención curativa, recaen a lo largo del tiempo. Según nuestra serie, casi un 50%, lo cual es un dato nada desdeñable, y que justifica de sobra el objetivo principal de esta tesis doctoral: identificar factores pronósticos que nos permitan predecir qué pacientes tienen más riesgo de recaer para plantear en ellos tratamientos complementarios a la resección quirúrgica.

Como se revisa de forma exhaustiva en la introducción, son muchos los factores que se han relacionado aisladamente con el pronóstico en pacientes operados. Sin embargo, muchos de ellos son difícilmente reproducibles, otros aparecen en series heterogéneas de pacientes, muchos de los cuales reciben

tratamientos adyuvantes, y a menudo los resultados son complicados de validar.

Las series quirúrgicas incluyen sesgos importantes, fundamentalmente relacionados con el propio acto quirúrgico. Por eso el esfuerzo que desde el primer momento del desarrollo de este trabajo hemos hecho por intentar homogeneizar, y que el doctorando ha hecho suyo hasta el punto de intentar descartar cualquier caso que no cumpliera estrictamente los criterios que se plateó para la inclusión de pacientes en el estudio, creo que ha dado sus frutos. Presentamos una serie de pacientes en estadios I y II, con resecciones completas, disección ganglionar mediastínica sistemática y seguidos por nosotros durante un período mediano de 58 meses, con muy escasas pérdidas a lo largo de esos primeros cinco años. Esto hace que los resultados sean representativos de una serie quirúrgica bien seleccionada.

Es cierto que la heterogeneidad en cáncer es la norma. Y que probablemente aún hoy, bien entrado ya el siglo XXI seguimos analizando y extrayendo conclusiones para diseñar estrategias terapéuticas entre nuestros pacientes de la punta de un iceberg profundo y de proporciones aún inimaginables. Pero poco a poco vamos viendo más luz en el camino, y sabemos que la biología molecular es la que define lo que ocurre con nuestros pacientes y con sus tumores. Por eso hay que avanzar en esa línea.

Tras una exhaustiva introducción que nos sitúa el panorama actual en investigación en el carcinoma broncogénico no microcítico de una forma integral (muchos pensarían que una introducción de estas características no puede haber sido redactada por un cirujano), plantea el doctorando la hipótesis de trabajo y los objetivos claros sobre lo que se intenta analizar.

Presenta después muy bien la serie que se propone diseñar, que ya en sí mismo veo como un objetivo, aunque no lo haya querido el autor principal incluirlo como tal. Pero es muy importante para un estudio de este tipo diseñar una serie homogénea de pacientes para evitar al máximo sesgos de selección y factores de confusión. Se nota también que es conocedor de la metodología de tissue-arrays, con la que llevamos trabajando desde el Servicio de Cirugía General 2 – Cirugía Torácica, desde casi los inicios de esta tecnología de análisis biomolecular, que llegó a España a principios de los años noventa, y a nuestro centro prácticamente desde el principio. Una metodología que hoy permite hacer estudios a gran escala,

con un alto número de muestras y de factores a analizar (sean proteínas, genes, etc.). Creo que la sección de material y métodos es bastante explícita.

La selección de proteínas a analizar podrá generar en el lector o el auditor de este trabajo las dudas sobre el porqué de estas y no otras. El abanico de posibles factores biomoleculares que sustentan el desarrollo oncogénico y su historia natural es tan amplio como el propio genoma. Más amplio, si tenemos en cuenta los mecanismos epigenéticos que hoy sabemos que también influyen no solo en el carcinoma broncogénico, sino en la gran mayoría de neoplasias que se investigan. Sin embargo, las vías oncogénicas más conocidas y analizadas fueron las que dieron lugar a la selección de proteínas para este estudio. Por supuesto, contamos para ello con el esfuerzo y asesoramiento de los patólogos de referencia en cáncer de pulmón del hospital. No buscamos descubrir novedades provenientes de la nada. Se eligieron proteínas de conocida vinculación con vías oncogénicas estudiadas en el momento del diseño del estudio, y que hoy siguen siendo objeto de análisis. alguna de ellas, como el receptor de membrana c-erb2/Her2, es hoy una diana terapéutica de máximo interés en adenocarcinoma de mama, con fármacos dirigidos que han demostrado bloquear al menos parcialmente su efecto de extensión neoplásica, y con un valor traslacional innegable. Nos resulta por ello realmente grato que la sobreexpresión de esta proteína resulte de valor pronóstico significativo en nuestro estudio. En sí misma da una valía importante a los resultados.

Resultados que presente el doctorando de forma clara, estructurada y en relación con los objetivos planteados, por lo que el lector puede él mismo extraer conclusiones, que se van mostrando de forma secuencial para al final resumir en una única tabla, que espero que en su defensa ante el tribunal, sea expuesta para una mejor comprensión de los hallazgos.

Como es de esperar, la mayoría de las proteínas analizadas (18 de 21) no resultan variables pronósticas en los estudios uni y multivariante, pero estos resultados no están exentos de valor y deben ser tenidos en cuenta para futuros estudios.

Lograr la homogeneidad de la serie en términos demográficos, quirúrgicos y patológicos es cru-

cial para poner en valor los resultados a nivel biomolecular, lo cual hace el doctorando en su discusión de forma clara.

No le falta honestidad, además, a la hora de reflexionar sobre las limitaciones del estudio, siendo muy prudente al interpretar los resultados, pues sabe bien que el estudio no controla algunos factores que pueden ser importantes. Por eso sus conclusiones son sensatas, y dejan, eso sí, la puerta abierta a seguir investigando por esta vía si tenemos alguna forma de intentar disminuir ese porcentaje de pacientes en estadios precoces que operamos y recidivan, o al menos, si hay manera de actuar sobre ellos para que aún en ese momento, su pronóstico no se vea bruscamente ensombrecido.

Es un placer dar visto bueno a esta tesis doctoral, como lo ha sido ser uno de los directores de la misma.

Dr. Florentino Hernando Trancho
Jefe de Servicio de Cirugía Torácica
Hospital Clínico San Carlos de Madrid
Profesor Asociado de la Universidad Complutense de Madrid

Informe de Director: Dr. Joaquín Calatayud Gastardi

El carcinoma broncogénico no microcítico continúa siendo un problema de salud a nivel mundial. Viene determinado por su elevada mortalidad, su diagnóstico tardío y su resistencia en general a los tratamientos sistémicos de radioterapia y quimioterapia.

Solo los pacientes que se operan y cuyos tumores se pueden resear completamente tienen altas probabilidades de permanecer libres de enfermedad a largo plazo. Y solo son reseables apenas una cuarta parte de estos pacientes cuando son diagnosticados. Y aún así, entre un 30 % y un 40 % de estos pacientes potencialmente “curados” con la cirugía fallecerán en los primeros cinco años debido a su enfermedad.

Los tratamientos complementarios a la cirugía han demostrado un ligero aumento en la supervivencia, que globalmente constituye un escaso 5%, según estudios de hace más de década y media. Sin embargo, la selección de pacientes, y la individualización de tratamientos ha mostrado resultados mucho más esperanzadores.

La identificación de vías moleculares susceptibles de ser tratadas con terapias ad hoc, ha llevado a la comunidad científica a profundizar en el análisis biomolecular de los tumores, tratando de tipificar al máximo sus peculiaridades ultraestructurales, para así por optimizar los tratamientos y mejorar el pronóstico. Esto que parecía restringido a estadios avanzados (realmente los fármacos más novedosos en este sentido siguen reduciendo su indicación a estas fases evolucionadas de la enfermedad), tiene valor también para estadios precoces. Se trata de pacientes que han sido intervenidos quirúrgicamente, de los que disponemos la pieza tumoral en su totalidad para analizar, y que en una alta proporción podrían beneficiarse de tratamientos adyuvantes.

Sin embargo, hasta el momento no conocemos qué factores nos permiten seleccionar a los pacientes que se podrían beneficiar de dichos tratamientos, y los efectos secundarios de los mismos no justifican emplearlos en todos los casos.

La identificación de factores pronósticos biomoleculares que permitan hacer esta selección positiva de pacientes a tratar de forma complementarias, es el objetivo principal de esta tesis doctoral. Este objetivo se ha repetido en los últimos años, no solo en el carcinoma broncogénico no microcítico. No podemos decir que el objetivo sea muy novedoso. Sin embargo, pese a los múltiples trabajos que persiguen este fin, en la actualidad no existen en las guías clínicas factores pronósticos, ya no solo biomoleculares, sino también clínicos, que, más allá de la clasificación TNM que cada vez se afina más, sean de aplicación de la clínica. Es por ello, que no por no novedoso, adolece este trabajo de falta de sentido. El proyecto es muy oportuno. Y más si tenemos en cuenta que en los últimos años comienza a dar sus frutos el análisis de vías oncogénicas cuyas alteraciones comenzamos a conocer e incluso a tratar.

Reconocido el tema, contenido y objetivos de esta tesis doctoral que he tenido el placer de dirigir junto con mis compañeros, la doctora Ana María Gómez y el doctor Florentino Hernando, considero que los aspectos formales del trabajo se han cuidado con esmero.

Tras los necesarios ajustes en la expresión e interpretación de algunos de los conceptos desarrollados en este trabajo, ha resultado un diseño y estructura atractivos y académicamente correctos.

Una introducción exhaustiva de un tema complejo y amplio, un planteamiento de hipótesis y objetivos no ambicioso, sino claro y concreto, un apartado de material y métodos detallado y creo que reproducible, una presentación de resultados clara, con algunos conceptos algo más difíciles, y con un análisis estadístico es ocasiones complejo, pero entiendo que correcto y necesario para una correcta validez interna de los mismos. Y finalmente una discusión donde el doctorando demuestra un amplio conocimiento de los aspectos biomoleculares del carcinoma broncogénico, con los que ha trabajado durante toda su formación, y que desde supera con creces los datos que maneja al respecto un cirujano torácico, hasta el punto de que no es sencilla su lectura para cirujanos no versados en la materia, si bien las explicaciones son claras.

Los tres directores de esta tesis doctoral, hemos trabajado ya desde nuestros proyectos de postgrado, con aspectos biomoleculares no solo del cáncer de pulmón, sino de otros aspectos de la especiali-

dad como el trasplante pulmonar.

Creo que mantener viva la llama de este aspecto básico de la ciencia de la cirugía en nuestros discípulos es una buena señal, ya que cierra el círculo del conocimiento médico. De lo básico a lo quirúrgico, pasando por lo clínico. La formación integral incluye los tres aspectos, y el postgrado del doctorando creemos que da muestra de esta formación.

Dr. Joaquín Calatayud Gastardi
Facultativo Especialista de Área de Cirugía Torácica
Hospital Clínico San Carlos de Madrid
Profesor Asociado de la Universidad Complutense de Madrid

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Mientras ultima el autor los retoques finales de maquetación, índice, abreviaturas y demás correcciones de estilo de esta su tesis doctoral, y acompañado por los casi tres centenares largos de folios que dan forma a uno de los primeros borradores impresos, piensa que es hora de alejarse por un momento de esa montaña de publicaciones científicas que, frías y distantes, se apilan sobre la mesa, la estantería... algunas de ellas incluso marginadas al parqué... Hora de alejarse y echar la vista atrás para dedicar unas líneas a quienes han hecho posible, con mayores o menores aportaciones, que este trabajo de investigación viera la luz.

Y se permite el autor escapar por un momento del lenguaje científico; técnico y especializado, pero también abigarrado y obtuso en ocasiones. Porque piensa que la palabra que agradece pasó por el corazón después de salir de la razón, y tiñó sus letras con el barniz del alma. Y así quiere que se posen en estas líneas. Porque acaso la semántica y la proteómica no sigan caminos tan distintos.

Y pretende ser breve en su discurso, mas conociéndose no promete nada. Ciertamente que es esta una tesis doctoral que deriva del trabajo de una serie de profesionales que cobran sentido en tanto su esfuerzo se fundamenta en la asistencia a una persona enferma. Y el resultado se basa en el desvelo de aquéllos y la confianza de ésta. Siendo pues todos ellos objeto de agradecimiento, habría cumplido el autor su misión de no dejar ningún esfuerzo en el tintero.

Y sin embargo siente que más allá de los resultados y conclusiones de su investigación, las personas que de una u otra manera han dejado su huella en todo el proceso de la misma, también lo han hecho en el desarrollo del autor como persona y como profesional, por lo que le surge la necesidad de llegar un poquito más allá.

Médico de vocación; cirujano de profesión y de oficio. No como meta alcanzada, sino como camino emprendido, pues en tanto haya un paciente que necesite tu mano tendida para continuar, el cirujano se sigue haciendo, se sigue formando. Quizá el que siente que *ya* es cirujano es que simplemente ha dejado de serlo.

Tuvo también la suerte de formarse en el arte de la medicina en la Universidad Complutense de Madrid, baluarte de ese espíritu universitario que parece que a todos se nos está resbalando un poco entre las manos en estos tiempos, y que desde aquí reivindica en su sentido más elemental: la formación universitaria como generación de cultura.

Y quiso el destino que recalara en el Hospital Clínico San Carlos, testimonio ancestral de esa cultura y ese espíritu quirúrgico de los que nunca podrá desprenderse aunque amenazas no falten. Pero es algo inherente a sus

pasillos y a sus gentes. Porque sus paredes han vivido ya demasiadas cosas como para ser permeables a lecciones de madurez mal entendidas. Serán también “los tiempos”.

Y en el epicentro de ese espíritu cultural y quirúrgico, el entonces Servicio de Cirugía General II y Cirugía Torácica mostraba en su *razón de ser* las señas de identidad que explican por qué un cirujano torácico rebusca en los entresijos del ciclo celular aquello que su bisturí no alcanza. La investigación básica como pilar fundamental de un servicio de cirugía y la implicación del cirujano en todos los aspectos de la enfermedad, de manera especial en el campo de la oncología, sin duda enriquecen el ejercicio de esta profesión. De formar parte de ese espíritu se siente orgulloso el autor, que agradece desde aquí la confianza que quienes abanderaron dicho servicio, el Profesor José Luis Balibrea primero y el Profesor Antonio José Torres después, mostraron en su persona.

De ese espíritu nace este proyecto, en el que se ve inmerso desde los primeros años de su residencia. Lo acompañan desde el principio los que en todo han sido sus maestros, compañeros y amigos, a la sazón directores, el Doctor Calatayud, la Doctora Gómez y el Doctor Hernando; Ana, Florentino y Joaquín. A ellos les debe lo que es en lo profesional, y en gran parte de lo personal. Y ellos dotan a esta tesis doctoral de su principal valor: la homogeneidad. Porque ellos han operado a todos los pacientes incluidos. Porque no podían ser otros los directores de este proyecto.

Para un médico la residencia es un período inolvidable. Y quienes hacen camino contigo se convierten en personas muy especiales. Fue el autor el segundo de tres. Aprendió a moverse por el mundo *residencial* con Olga Rodríguez, punto de partida de gran parte del trabajo hoy plasmado en esta tesis doctoral. Y aprendió a hacer las cosas un poco mejor con Elena Fernández, un apoyo profesional con el que sigue contando hoy en el día a día como cirujano. Inconcebible una Residencia sin ellas. Pero inconcebible también sin aquellos residentes de cirugía general con quienes compartió grandes momentos en su periodo de formación y que fueron dejando profunda impronta en su currículo personal y profesional. Tiempos de abundante mies, escasos obreros e indelebles recuerdos de compañerismo y amistad con Jose, Esteban, Sandra...

Ahora toca aprender enseñando, que decía Cicerón, y para ello, Lucía, Isabel y Carlos enriquecen con su esfuerzo a quienes han de ser sus maestros.

Gran parte de este proyecto de investigación se ha desarrollado en los laboratorios del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico. La implicación del Dr. López García-Asenjo, patólogo responsable de la patología torácica durante el tiempo de recogida de datos del estudio, así como del Dr. Sanz, responsable del bio-banco del centro, junto con la profesionalidad y experiencia en el campo de la biología molecular de Susana Hernández, confieren un rigor a la metodología y análisis inmunohistoquímico del que pocos equipos pueden presumir. Asimismo, el complejo tratamiento estadístico de los datos este tipo de investigaciones fue más llevadero gracias a la asesoría de la Dra. Cristina Fernández.

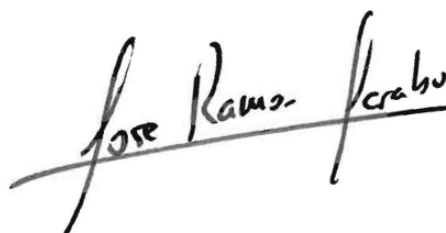
No se perdonaría el autor dejarse en el tintero a personas que han colaborado en que este trabajo viera la luz. Mas como no habría mala fe sino renca memoria no sería merecedor de gravosa punición.

No olvida, sin embargo, a quienes son los más importantes: los pacientes. Que desde lo profundo de su enfermedad ayudan sin saberlo a sus semejantes; paradigma de la condición humana. Sin ellos, cada palabra de este trabajo que el lector tiene en sus manos se diluiría al instante, convirtiéndose la ciencia en mísera oscuridad del papel en blanco.

* * *

Estas últimas líneas son para mi familia. Para mis padres, porque desde el principio pusieron los medios, la libertad y el cariño, que de ello nace la cultura del esfuerzo y la superación. Para Victoria, mi compañera de viaje, de espíritu quirúrgico y enorme corazón. Porque para comprender a un cirujano hay que serlo, y porque el tiempo dedicado a la redacción de cada palabra de esta tesis doctoral ha sido vilmente hurtado en casa. Y para esos dos pequeños fogoneros. Porque hace falta mucho fuelle para hacer camino, y porque toda la energía que se llevan cada día te la devuelven multiplicada en una sola mirada, en una sola sonrisa o en una sola respiración mientras duermen.

Al final, con la tesis en la mano, después de la inevitable sensación de libertad del deber cumplido, únicamente levanto la mirada y me pregunto en silencio si sirve para algo... No para mí, que ya lo ha hecho. Para que al menos un paciente un día pueda vivir un poco más, y un poco mejor... Para que pueda disfrutar de la boda de un hijo o del calor de un nieto... Porque si es así estos agradecimientos sin duda se escribirán con mayúscula. Porque si es así cada esfuerzo habrá merecido la pena. Porque si es así, entonces sí soy médico; entonces sí soy cirujano.

A handwritten signature in black ink that reads "Jose Ramos Perabo". The signature is written in a cursive style and is underlined with a single horizontal stroke.

Esta Tesis Doctoral ha podido ser realizada gracias a una Beca de Investigación concedida por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A BREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACCP: American College of Chest Physicians
ACOSOG: American College of Surgeons Oncology Group
ACR: American College of Radiology
AJCC: American Joint Committee on Cancer
ASCO: American Society of Medical Oncology
ATS: American Thoracic Society
BAC: bronchioloalveolar carcinoma
CALGB: Cancer and Leukemia Group B
CBM: Carcinoma broncogénico microcítico
CBNM: carcinoma broncogénico no microcítico
cc: centímetros cúbicos
CDK: quinasa dependiente de ciclina (acrónimo en inglés)
COX2: ciclooxigenasa 2
CVF: capacidad vital forzada
DGS: disección ganglionar sistemática
DLCO: difusión de monóxido de carbono
DNA: ácido desoxirribonucleico (abreviatura en inglés)
EBUS: ultrasonografía endobronquial (acrónimo en inglés)
EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (acrónimo en inglés)
EORTC: Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERCC2: excision repair cross-complementing group 2
ERS: European Respiratory Society
ESMO: European Society of Medical Oncology
ESTS: European Society of Thoracic Surgery
ETE: enfermedad tromboembólica venosa
EUELC: European Early Lung Cancer
EUS: ultrasonografía endoscópica (acrónimo en inglés)
FDA: Food and Drug Administration
FEV1: volumen espirado forzado en el primer segundo (acrónimo en inglés)
FGF: factor de crecimiento de los fibroblastos
FNA: aspiración con aguja fina (acrónimo en inglés)
GCCB-SEPAR: Grupo Cooperativo del Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
GECP: Grupo Español de Cáncer de Pulmón
GGO: ground glass opacity (opacidad en vidrio deslustrado)
GIST: tumores del estroma gastrointestinal (acrónimo en inglés)
HAA: hiperplasia adenomatosa atípica
HBP: hipertrofia benigna prostática
HR: Hazard Ratio (tasa de riesgo)
HTA: hipertensión arterial
IALT: International Adjuvance Lung Trial

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer
ICG: indiferenciado de células grandes
IFG: Factor de crecimiento insulínico (acrónimo en inglés)
IHQ: inmunohistoquímica
ILE: intervalo libre de enfermedad
LCSG: Lung Cancer Study Group
LR: libre de recidiva
MS: muestreo sistemático
NCCN: National Comprehensive Cancer Network
NCI: National Cancer Institute
NE: neuroendocrino
NICE: National Institute of Health and Clinical Excellence
NNK: nitrosamina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil) -1-1 butanona
ns: no significativo
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAAF: punción aspiración con aguja fina
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (abreviatura en inglés)
PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (acrónimo en inglés)
PET: tomografía por emisión de positrones
ppo-FEV1: valor predicho postoperatorio del volumen espirado forzado en el primer segundo
pRB: proteína del gen del retinoblastoma
RNA: ácido ribonucleico (abreviatura en inglés)
ROC: receiver operating characteristic
SCAT: spanish customized adjuvant trial
SG: supervivencia global
SIGN: Scottish Intercollegiate Guidelines Network
SLE: supervivencia libre de enfermedad
SUV: standard uptake value
SV: supervivencia
TBC: tuberculosis
TC: tomografía computarizada
TEMLA: linfadenectomía transesternal extendida (acrónimo en inglés)
TGF: factor de crecimiento transformante
TGF α : factor de crecimiento tisular alfa (abreviatura en inglés)
TKI: inhibidores de la tirosín quinasa (abreviatura en inglés)
UICC: Union Internationale Contre le Cancer
VAMLA: linfadenectomía mediastínica videoasistida
VEGF: Factor de crecimiento derivado del epitelio vascular (acrónimo en inglés)
VFGV: Factor de crecimiento derivado de los fibroblastos (abreviatura en inglés)
VO2: consumo de oxígeno
WHO: World Health Organization
XRCC1: x-ray cross-complementing group 1

RESUMEN



RESUMEN

Introducción

La elevada incidencia del carcinoma broncogénico no microcítico (CBNM) convierte a esta enfermedad en un problema de salud de alcance mundial. Dicha incidencia se encuentra tan solo por detrás del adenocarcinoma de próstata en los hombres, y del adenocarcinoma mama en las mujeres. A nivel internacional la mortalidad del CBNM constituye casi el 20 % de las muertes por cáncer.

Las tasas de supervivencia a cinco años en el paciente diagnosticado de CBNM alcanzan valores de entre un 5 % y un 16 %. En España la supervivencia a tres años fue del 13.8 % según datos publicados en 2008. Estas tasas apenas se han incrementado en las últimas dos décadas.

Afortunadamente hemos aprendido que el CBNM engloba en realidad a un conjunto de enfermedades con diferente historia natural y pronóstico variable. La clasificación histológica tradicional del CBNM en adenocarcinoma, carcinoma epidermoide y carcinoma indiferenciado de células grandes ha sido claramente superada durante los últimos cinco años. La última clasificación desarrollada por Travis y un importante grupo de trabajo internacional, globalmente aceptada por las sociedades internacionales más importantes en lo que respecta al estudio del cáncer de pulmón, considera en torno a quince subtipos de adenocarcinoma, basándose exclusivamente en patrones morfológicos, bien en pequeñas biopsias y citologías, o bien en piezas quirúrgicas.

El estadio precoz del CBNM, susceptible de ser tratado mediante la resección quirúrgica completa, presenta las mejores posibilidades de curación, incluso sin necesidad de administrar tratamientos adyuvantes.

Sin embargo, incluso dentro de este subgrupo de pacientes con un pronóstico supuestamente favora-

ble, hasta un 30 % ó 40 % de ellos recidivará a lo largo del seguimiento. ¿Cuáles son las características de sus tumores que les hace ser de alto riesgo de recidiva? ¿Es la actual clasificación basada en estadios definidos por los conocidos descriptores T, N y M suficiente para la elección del mejor tratamiento y un programa de seguimiento óptimo para los pacientes?

¿Podemos definir características destacables en el tumor que nos permitan establecer estrategias terapéuticas óptimas más allá de la clasificación actual basada en subtipos histológicos?

Médicos e investigadores del cáncer dedican importantes esfuerzos a identificar factores pronósticos que definan estrategias clínicas en pacientes con CBNM.

A pesar de la heterogeneidad a que hemos hecho referencia dentro del CBNM, los pacientes con tumores en estadios precoces constituyen un grupo relativamente uniforme, al menos en lo referente al tratamiento a seguir. Rara vez precisan adyuvancia a la cirugía y las técnicas quirúrgicas de resección se consideran suficientemente estandarizadas como para que (al menos en teoría) sean homogéneas entre equipos de todo el mundo. Así, representan una interesante diana para el análisis de potenciales factores pronósticos.

A pesar de que en pacientes con estadios precoces de CBNM reseado han demostrado influir variables clínicas y patológicas, hasta la fecha, en la práctica esos factores rara vez condicionan la toma de decisiones tras la intervención quirúrgica (si bien en la actualidad está claramente definido el papel de la adyuvancia en estadios II y el concepto de estadio precoz queda ya reducido al estadio I).

Bajo la premisa de que son las características biológicas de un tumor las que condicionan su comportamiento, se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de patrones de expresión biomolecular relacionados con un aumento en las tasas de recidivas y en la mortalidad. Sin embargo, hasta el momento, la clasificación del CBNM basada en el TNM no ha sido superada por ningún factor biomolecular a la hora de tomar decisiones clínicas.

A pesar de todo, la gran esperanza en la investigación en cáncer es el hallazgo de perfiles biomoleculares que permitan no solo la selección de pacientes con peor pronóstico, sino también el

desarrollo de terapias dirigidas contra proteínas o genes alterados, de modo que el arsenal terapéutico se focalice contra el mismo origen de la enfermedad.

Este objetivo comienza a cumplirse gracias a los recientes hallazgos de mutaciones en determinados genes, que se asocian a buenas respuestas a tratamientos dirigidos específicamente sobre los mismos, si bien su uso está hasta el momento restringido a estadios avanzados de la enfermedad. El papel de los factores biomoleculares pronósticos y predictivos de respuesta a tratamientos en pacientes en estadio precoz no está tan bien definido por cuanto son pacientes a priori curados con la resección quirúrgica.

En relación con estos hallazgos recientes, distintas vías oncogénicas han demostrado correlacionarse con el origen del cáncer. Así ocurre con el ciclo celular, los receptores de membrana y sus ligandos, vías de apoptosis, reparación de DNA, invasión y metástasis, angiogénesis, etc. Distintos elementos de estas vías (alteraciones genéticas, epigenéticas o de expresión proteica) se han relacionado con el pronóstico del CBNM en estudios de los últimos quince años. Sin embargo, los resultados no son suficientemente sólidos como para definir una aplicación traslacional de estos hallazgos.

A pesar de que los recientes avances logrados en los análisis de expresión génica parecen dejar de lado la determinación de expresión proteica por inmunohistoquímica, el hecho es que estas herramientas biomoleculares utilizadas para la determinación de perfiles génicos son caras y no siempre accesibles, sobre todo en su uso para estudios de un gran número de muestras en investigación básica.

La tecnología de tissue-arrays o matrices de tejido también proporciona un medio sencillo para el análisis de un gran número de proteínas en una importante colección de muestras tumorales procedentes de distintos pacientes. Esta herramienta nos permite el análisis de paneles de expresión proteica subsidiarias de una óptima validación posterior.

Así, no hay duda de que la inmunohistoquímica todavía constituye una buena herramienta para el estudio de cómo las proteínas se expresan en grupos de pacientes seleccionados con CBNM.

Se han descrito muchos factores biomoleculares pronósticos y predictivos en pacientes en estadios avanzados de CBNM. Sin embargo, el efecto de la quimioterapia y otros tratamientos sobre los patrones

de expresión génica no está todavía bien definido y es variable. Por ello, los estudios que analizan la expresión proteica en estos pacientes serían bastante susceptibles de presentar sesgos de confusión.

Nuestro grupo, a partir de pacientes sometidos a resección pulmonar por CBNM, ha venido trabajando durante los últimos 25 años en el estudio de marcadores séricos por una parte y tumorales propiamente dichos por otra, en un intento de definir subgrupos de pacientes con un riesgo aumentado de mortalidad y de recidivar tras una resección quirúrgica completa. En el presente estudio tratamos de diseñar una serie de pacientes con CBNM en estadios precoces bien seleccionada, sin ningún tipo de tratamiento adyuvante a lo largo de la historia natural de su enfermedad, al menos, mientras dicha enfermedad era considerada como tal estadio precoz.

Basamos nuestra investigación en la hipótesis de que la identificación de perfiles de expresión proteica asociados a un peor pronóstico entre estos pacientes (en términos de supervivencia global o libre de enfermedad) nos permitiría actuar sobre ellos (bien administrando un tratamiento adyuvante, o bien incluyéndolos en programas de seguimiento intensivo) para así disminuir las tasas de recurrencia o al menos detectar precozmente la misma para ofrecer a estos pacientes un tratamiento óptimo lo antes posible.

Los objetivos de nuestro proyecto fueron:

▪ **OBJETIVO PRINCIPAL:** Análisis inmunohistoquímico mediante tissue-array de la expresión de 21 marcadores moleculares relacionados con vías oncogénicas (proteínas ciclina A, cdk1, cdk-2, ciclina E, p16, p53, p27, pRb, mdm2, EGFR, ErB-2, c-kit, caspasa 3a, catepsina D, msh2, mlh1, e-cadherina, beta-catenina, c-myc, topoisomerasa II alfa y timidilato sintasa) en muestras tumorales de pacientes intervenidos por carcinoma broncogénico no microcítico en estadios I y II en relación al pronóstico y riesgo de recidiva.

▪ **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

1. Análisis de la expresión proteica en función del tipo histológico epidermoide o adenocarcinoma.

2. Análisis del papel pronóstico de parámetros clínico-patológicos: género, edad, tipo histológico, grado de diferenciación, estadio, clasificación TNM y tipo de resección.
3. Desarrollo de modelos pronósticos de supervivencia global y libre de enfermedad en función de las variables pronósticas clínico-patológicas y los perfiles de expresión proteica.

Material y métodos

Se incluyeron pacientes con CBNM en estadios I y II sometidos a resección quirúrgica completa con intención curativa entre 1997 y 2005. Se excluyeron los casos con historia de cualquier antecedente neoplásico y aquellos que recibieron tratamiento neoadyuvante o adyuvante. Se utilizó la clasificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC). En todos los casos se hizo disección ganglionar mediastínica sistemática. Se excluyó la mortalidad postoperatoria (30 días). Se analizaron variables demográficas, quirúrgicas y patológicas. Para el análisis semicuantitativo de la expresión de las proteínas descritas se diseñó un tissue-array con muestras en parafina de todos los pacientes de la serie. Se tomaron también muestras de control sin tumor.

Se analizó la supervivencia global y libre de enfermedad. También se investigaron los patrones de mortalidad y recidiva, individualizando las muertes por cáncer y las debidas a otra causa. Estos análisis de supervivencia se realizaron mediante curvas de Kaplan y Meier.

VARIABLES como la edad, el género, el tipo histológico, el grado de diferenciación, el estadio y el tipo de cirugía, fueron correlacionadas con la supervivencia para identificar entre ellas posibles factores pronósticos que restaran homogeneidad a la serie.

Se correlacionó a continuación la expresión de las distintas proteínas (determinada de forma semicuantitativa en base a criterios descritos en la literatura y con doble lectura por dos patólogos independientes) con el riesgo de mortalidad y de recidiva. Para el estudio estadístico se utilizó la versión 18.0 del programa SPSS (IBM Systems®). Para el análisis de variables cualitativas se utilizaron los test de Chi cuadrado de Pearson y el test exacto de Fisher. La comparación en estudio univariante de curvas de supervivencia se hizo con el test de Log-Rank y la posible relación entre factores pronósticos con el mo-

delo de riesgos proporcionales de Cox. Se incluyeron las variables género, edad, tipo histológico, grado de diferenciación, estadificación del tumor, clasificación TNM, tipo de resección y sobreexpresión de las proteínas en los valores que habían resultado factores pronósticos en el estudio univariante, es decir, positividad en la expresión de c-myc (> 20 % de las células), de c-erb2 (> 5 % de las células) y de ciclina-E (> 5 % de las células).

Para los modelos de regresión logística se determinó la Tasa de Riesgo para cada factor, con un intervalo de confianza del 95 %. Un valor de p por debajo de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Se analizaron de forma retrospectiva 160 pacientes prospectivamente incluidos en la base de datos del servicio, todos ellos sometidos a resección quirúrgica completa por CBNM en estadios I y II. Un total de 150 (93,7 %) fueron varones. La edad media fue de 65,8 años (rango 46-87 años). La mediana de edad fue 67 años. Un total de 27 pacientes (16,9 %) eran no fumadores, mientras que 95 (59,4 %) era fumadores activos y 36 (22,5 %) eran exfumadores (entendiendo como tales los que habían dejado de fumar antes de seis meses previos a la intervención). Noventa y nueve casos (61,9 %) fueron carcinomas epidermoides, 52 (32,6 %) adenocarcinomas y 9 (5,7 %) indiferenciados de células grandes.

Respecto al tratamiento quirúrgico, todos los tumores fueron completamente reseados conforme a los criterios de resección completa aceptados internacionalmente. Se realizaron 95 lobectomías, 31 resecciones segmentarias, 6 bilobectomías y 28 neumonectomías. En todos los pacientes se hizo disección ganglionar sistemática del mediastino (siendo este un criterio de inclusión como hemos dicho previamente). Un 18,1 % de los tumores fueron clasificados como estadio IA, 62,5 % estadio IB, 8,1 % estadio IIA y 11,3 % estadio IIB.

La supervivencia estimada a los cinco años fue del 54,4 % (mediana 73 meses). La supervivencia libre de enfermedad fue de 51,9 % (mediana 61 meses).

La incidencia de mortalidad fue mayor durante los primeros tres años de seguimiento (con pico de incidencia entre 12 y 36 meses). De hecho la mayoría de las recidivas tuvieron lugar en esos primeros tres años tras la resección.

No se encontraron diferencias significativas en términos de supervivencia en relación al género (que sí mostró una tendencia a un mejor pronóstico entre las mujeres), el tipo histológico, el estadio y el tipo de resección. Sin embargo, la edad por encima de 70 años y la pobre diferenciación tumoral mostraron una tendencia a una mayor mortalidad y a un aumento en la tasa de recidivas significativo. No hallamos diferencias al diferenciar por causa de muerte (relacionada con su tumor o bien otra causa).

En relación a la expresión de las proteínas mencionadas, encontramos que:

- Las proteínas ciclina A, msh2, mlh1, pRb, e-cadherina y EGFR se expresaron en mayor proporción en los carcinomas epidermoides que en los adenocarcinomas (con una diferencia estadísticamente significativa).

- Las proteínas timidilato sintasa, catepsina D y c-erb2 se expresaron de forma significativamente mayor en adenocarcinomas que en escamosos.

- La expresión de c-myc fue un factor pronóstico independiente para supervivencia global en nuestra serie (Tasa de Riesgo 1,8: $p=0,028$), ajustando por tipo histológico y grado de diferenciación. Además, mostró una tendencia a una mayor recidiva entre estos pacientes ($p=0,06$).

- La expresión de c-erb2 se asoció a una mayor mortalidad (Tasa de Riesgo 2,69) y riesgo de recidiva (Tasa de Riesgo 2,29) ($p<0,01$).

- La expresión de ciclina E fue un factor pronóstico independiente tanto de mortalidad (Tasa de Riesgo 2,22) como de riesgo de recidiva (Tasa de Riesgo 2,19).

- La expresión de las restantes proteínas analizadas (ciclina A, cdk1, cdk-2, p16, p53, p27, pRb, mdm2, EGFR, c-kit, caspasa 3a, catepsina D, msh2, mlh1, e-cadherina, beta-catenina, topoisomerasa II alfa y timidilato sintasa) no se relacionó con el pronóstico de los pacientes.

La siguiente tabla muestra de forma resumida los hallazgos en relación con el análisis univariante del valor pronóstico de los distintos perfiles de expresión proteica:

Proteína	Positivo (% células)	Tipo histológico	Diferenciación	SV	SLE	Ajuste por tipo histológico
ciclina A	> 5 %	+Escamoso	NS	NS	NS	NS
p53	> 25 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
cdk1	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
c-myc	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	Indiferenciado	p=0,02	p=0,05	Significativo
cdk2	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 0 %	NS	NS	NS	NS	--
caspasa 3a	> 25 %	NS	NS	NS	NS	--
p16	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
mdm2	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
Topoisom. II	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
msh-2	> 5 %	+Escamoso	NS	NS	NS	NS
mlh1	> 5 %	+Escamoso	NS	NS	NS	NS
TS	> 0 %	+Adenoca	NS	NS	NS	NS
pRb	> 10 %	+Escamoso	NS	NS	NS	NS
e-cadherina	> 75 %	+Escamoso	NS	NS	NS	NS
p27	> 0 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	NS	NS	NS	--
catepsina D	> 0 %	+Adenoca	NS	NS	NS	NS
	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	NS	NS	NS	--
c-kit	> 30 %	NS	NS	NS	NS	--
beta-catenina	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
c-erb2	> 5 %	+Adenoca	NS	p=0,001 HR 2,69	p<0,01 HR 2,29	Significativo
ciclina E	> 5 %	NS	NS	p<0,01 HR 2,22	p<0,01 HR 2,19	--
EGFR	> 1 %	+Escamoso	NS	NS	NS	NS

SV: Supervivencia global
 SLE: Supervivencia libre de enfermedad
 NS: No diferencias significativas
 Adenoca: Adenocarcinoma

Con estos datos desarrollamos un modelo pronóstico incluyendo las variables que actuaron las variables clínico-quirúrgico-patológicas analizadas, junto con las variables de expresión de proteínas que habían resultado ser factores pronósticos en el estudio univariante.

Encontramos que varones por debajo de 70 años, con un tumor pobremente diferenciado con sobreexpresión de c-myc, c-erb2 y ciclina E tenían un riesgo aumentado de mortalidad (supervivencia a 5 años de 39,2 %) con respecto a mujeres de menos de 70 años con un tumor moderadamente o bien diferenciado y sin expresión aumentada de dichas proteínas (supervivencia a 5 años de 83,1 %). Las respectivas tasas de riesgo (HR) para estas variables fueron: género (HR = 3,54; IC95%: 1,07 – 11,67), edad mayor de 70 años (HR = 1,60; IC95%: 1,02 – 2,51), pobre diferenciación (HR = 2,01; IC95%: 1,09 – 3,70), expresión de ciclina E > 5% (HR = 2,50; IC95%: 1,55 – 4,05), expresión de c-erb-2 > 5% (HR = 3,57; IC95%: 1,89 – 6,77) y expresión de c-myc > 20% (HR = 1,97; IC95%: 1,16 – 3,36).

Obtuvimos resultados similares a la hora de analizar supervivencia libre de recidiva, con los mismos factores implicados a excepción del género, que dejó de actuar como factor pronóstico independiente.

Conclusiones

▪ CONCLUSIONES AL OBJETIVO PRINCIPAL:

La sobreexpresión de las proteínas c-myc, c-erb2 y ciclina E en muestras tumorales de carcinoma broncogénico no microcítico completamente reseado en estadios I y II, se asoció de forma independiente y estadísticamente significativa a un peor pronóstico de los pacientes, en términos de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, mientras que la sobreexpresión de las proteínas ciclina A, cdk1, cdk-2, p16, p53, p27, pRb, mdm2, EGFR, c-kit, caspasa 3a, catepsina D, msh2, mlh1, e-cadherina, beta-catenina, topoisomerasa II alfa y timidilato sintasa no influyó en el pronóstico.

▪ CONCLUSIONES A LOS OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Las proteínas ciclina A, msh2, mlh1, pRb, e-cadherina y EGFR se sobreexpresaron en mayor medida en el carcinoma epidermoide. Las proteínas timidilato sintasa, catepsina D y c-erb2 lo hicieron en el adenocarcinoma. Las restantes proteínas (c-myc, cdk1, cdk-2, p16, p53, p27, mdm2, c-kit, caspasa 3a, beta-catenina y topoisomerasa II alfa) no presentaron diferencias en la expresión en función del tipo histológico.
2. La edad a partir de 70 años y el grado de diferenciación se comportaron como factores de mal pronóstico de supervivencia global y libre de enfermedad. El género, el tipo histológico, el estadio, la clasificación TNM y el tipo de resección no actuaron como factores pronósticos.
3. Las variables “*expresión de c-myc*”, “*expresión de c-erb-2*”, “*expresión de ciclina E*”, “*género*”, “*edad*” y “*grado de diferenciación*”, constituyeron un modelo pronóstico de supervivencia global.

Las variables “*expresión de c-myc*”, “*expresión de c-erb-2*”, “*expresión de ciclina E*”, “*edad*” y “*grado de diferenciación*”, constituyeron un modelo pronóstico de supervivencia libre de recidiva.

SUMMARY

Introduction

High incidence of non small cell lung cancer (NSCLC) makes it a main worldwide health problem. That incidence is only behind prostate adenocarcinoma in men and behind breast cancer in women. Deaths related to lung cancer accounts for nearly 20 % of cancer mortality, when talking about international data.

Five-year overall survival rates for a patient with diagnosis of NSCLC reach 5 % to 16 %. In Spain, a 3-year survival rate of 13.8 % was reported in 2008. Those rates have only slightly increased in the last two decades.

Fortunately we have learnt that NSCLC is actually a group of different diseases with different natural history and variable prognosis. Basic histological classification of NSCLC as adenocarcinoma, squamous cell carcinoma and undifferentiated carcinoma, has been clearly overcome during the last five years. Last classification developed by Travis and generally accepted by the most important international societies related to lung cancer, defines about 15 subtypes of adenocarcinoma, just based on morphologic pattern of both small biopsies or cytology and surgical samples.

Early stage NSCLC, amenable to be treated by complete surgical resection, has the highest options of cure, even without adjuvant treatments needed.

However, even among that subgroup of patients with supposed good prognosis, nearly 30 to 40 % of them will relapse during the follow-up. Which are the characteristics of their tumors that make them of

high risk for recurrences? Is that risk attached to the tumor, to the host, or to the treatment that the patient received? Is current classification using stages based on T, N and M descriptors enough for the design of the treatment and the follow-up of these patients? Can we define remarkable characteristics in the tumor that provide us therapeutic strategies beyond current classification based on histological subtype?

Physicians and cancer researchers devote huge efforts to identify prognosis factors to define their clinical strategies in patients with NSCLC.

Despite previously mentioned heterogeneity of lung cancer, patients with early staged NSCLC are quite a uniform group. They rarely receive adjuvant treatment, and surgical techniques of lung resection are supposed to be (theoretically) generally standardized among thoracic surgical teams all over the world. Thus, they represent an interesting target for the analysis of potential prognosis factors.

Different clinical and pathological characteristics have been involved in the prognosis of patients with completely resected early staged NSCLC. However, up to now those factors rarely determine postoperative strategies after the surgical procedure. We should not forget that adjuvant treatment is standardized for stage II, while early NSCLC concept is limited to stage I.

Under the premise that biological characteristics of a tumor define its behavior, great effort has been made looking for biomolecular profiling patterns related to an increase in rates of recurrences and mortality. However, up to now, pathological classification of lung cancer based on TNM descriptors has not been outperformed by molecular factors.

Nevertheless, the great hope in cancer research is the finding of biomolecular profiles allowing not only the selection of patients with worse prognosis, but also the development of targeted therapies against upset proteins or genes, thus focusing our therapeutic tools on the origin of the disease.

According to this, several biomolecular pathways have proven a correlation between their disorders and tumor genesis. Cell cycle, cell surface receptors and their ligands, apoptosis, DNA repair pathways, invasion and metastases, angiogenesis... And different elements from those pathways (genetic,

epigenetic or protein disorders) have been involved in NSCLC prognosis according to different studies. However, results are non consistent enough to define clinical translation from those findings.

Despite recent advances in gene expression analysis seem to overcome protein determination using immunohistochemistry, the fact is that biomolecular tools used for the study of genetic profiles are expensive and sometimes unapproachable, especially when used for basic research.

Tissue-arrays technology provides an easy-to-use way for the analysis of great number proteins determined in a large number of tumoral samples from different patients. This tool allows us the analysis of panels of protein expression amenable to be well validated.

Thus, we think that immunohistochemistry still represents a good tool for the study of the way proteins are expressed in a selected group of patients with NSCLC.

Many biomolecular predictive and prognosis factors have been defined among patients with advanced-staged NSCLC. However, the way that chemotherapy and other treatments impact genetic tumoral profiles remains unclear. Thus, studies analyzing protein expression in these advanced cases could be theoretically more exposed to confusion biases.

Our group, based on patients undergoing lung resection, has been working on serum markers and tumoral markers trying to define subgroups of patients with an increased risk of relapse after complete surgical resection. In the present study, we tried to define a well selected series of patients with early staged NSCLC completely resected and without any kind of adjuvant treatment.

We based our research on the hypothesis that the identification of protein expression profiles related to worse prognosis among these patients (in terms of overall survival or disease free survival) would allow us to act on them (adjuvant treatment, high intensity follow-up programs, etc.) in order to decrease the rates or recurrences or at least detecting them early enough to offer these patients optimal treatments.

The objectives of our project were:

- Main objective: Immunohistochemical analysis thorough tissue-arrays technology of 21 molecular markers related to oncogenic pathways (proteins ciclin A, cdk1, cdk2, ciclin E, p16, p53, p27, pRb,

mdm2, EGFR, Erb-2, c-kit, caspase 3a, catepsina D, msh2, mlh1, e-cadherina, beta-catenin, c-myc, topoisomerase II alpha and timidilato synthase) in tumoral samples operated on due to NSCLC in stages I and II, regarding prognosis and risk of relapse.

- Secondary objectives:

1. Analysis of protein expression regarding histological subtype (squamous versus adenocarcinoma).
2. Analysis the prognostic roles of clinico-pathological factors: gender, age, histological subtype, grade of differentiation, stage, TNM classification and type of resection.
3. Development of prognostic models for overall survival and disease free survival according to prognostic clinico-pathological variables and protein expression profiles.

Material and Methods

Patients with early NSCLC (stages I and II) undergoing complete surgical resection with curative purpose from 1997 to 2005 were included. Any of them had a history of other tumor previously diagnosed, and none of them received any kind of adjuvant treatment. American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification was used. Systematic mediastinal lymph node dissection was performed in all cases. Postoperative deaths were excluded (30 days). Demographic, surgical and tumoral variables were analyzed. For the analysis of immunohistochemical semiquantitative protein expression, a tissue-array with samples from all the patients was performed. Control samples without tumor were also obtained.

Overall and disease free survival was determined. Pattern of mortality and recurrences was also investigated, separately analyzing deaths related to cancer and those from a different origin. Kaplan Meier curves were design for this analysis.

Furthermore, clinical, pathological and surgical factors such as age, gender, histological subtype, stage and type of resection, and their influence in survival were analyzed.

Semicuantitative expression of previously mentioned proteins using immunohistochemistry assay was matched with survival and rates or recurrences.

For the statistical study, SPSS software (IBM Systems®) version 18.0 was used. Chi-square of Pearson and Exact Fisher tests were used for the analysis of qualitative variables. Univariate comparison of survival curves was made using the log-rank test and proportional hazard model (Cox). All factors working as prognosis variables in the univariate test ($p < 0.1$) were included in a multivariate test in order to try to define a prognostic model based on independent prognostic factors for overall and disease free survival. For the logistic regression model, Hazard Ratio was determined for every factor, with a confident interval of 95 %. A value of p under 0.05 was considered significant.

Results

A total of 160 patients, whose data had been prospectively included in the database of our department, were retrospectively included for the study. All of them had undergone complete surgical resection for NSCLC stages I and II. A total of 150 patients (93.7 %) were men. Medium age was 65.8 years (range from 46 to 87 years). Median age was 67 years. Twenty-seven patients (16.9 %) were non smokers, whilst 95 (59.4 %) were active smokers and 36 (22.5 %) had stopped smoking at least six months before surgery. Ninety-nine cases (61.9 %) were squamous cell carcinomas, 52 (32.6 %) were adenocarcinomas and 9 (5.7 %) were undifferentiated non small cell carcinomas.

When talking about surgical treatment, all patients were completely resected according to fully accepted criteria for complete surgical resection. A total of 95 lobectomies, 31 segmentary resections, 6 bilobectomies and 28 pneumonectomies were performed.

Mediastinal lymph node dissection was performed in all the patients (being this fact an inclusion criterion for the study, as we have underlined above), and 18.1 % of the tumors were finally classified as stage IA, 62.5 % stage IB, 8.1 % stage IIA and 11.3 % stage IIB.

Five-years overall estimated survival using the Kaplan and Meier method was 54.4 % (median 73

months). Five-year disease free survival was 51.9 % (median 61 months).

Incidence of mortality was higher during the first three years (peak incidence between 12 and 36 months). Furthermore, most of recurrences took place during the first three years of follow-up.

No differences with statistical significance were found when analyzing survival according to histological subtype, stage and type of resection. However, age over 70 years, male gender and poor differentiation showed a tender for higher mortality and a significant increase in probability of recurrences. We did not find differences when we specifically analyzed the reason of death.

According to the expression of above mentioned proteins, we found that:

- Ciclin A, msh2, mlh1, pRb, -cadherine and EGFR were expressed higher in squamous cell carcinomas.

- Thymidylate synthase, catepsineD D and c-erb2 expression was higher in adenocarcinomas.

- c-myc expression was an independent prognostic factor for overall survival in our series (Hazard Ratio 1.8; $p=0.028$), adjusted by histological subtype and grade of differentiation. Furthermore, c-myc expression showed a tender of higher risk of recurrence among our patients ($p=0.06$).

- c-erb2 expression was related to an increase in mortality (Hazard Ratio 2.69) and risk of recurrence (Hazard Ratio 2.29) ($p<0.01$).

- ciclin E expression was an independent prognostic factor of both mortality (Hazard Ratio 2.22) and risk of relapse (Hazard Ratio 2.19).

The following table shows a summary of the univariate analysis of prognostic value of the studied proteins:

Protein	Positive (% cells)	Histologic subtype	Differentiation	SV	DFS	Histologic subtype adjust
ciclin A	> 5 %	+ Squamous	NS	NS	NS	NS
p53	> 25 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
cdk1	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
c-myc	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	Low	p=0,02	p=0,05	Significant
cdk2	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 0 %	NS	NS	NS	NS	--
caspase 3a	> 25 %	NS	NS	NS	NS	--
p16	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
mdm2	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
Topoisom. II	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
msh-2	> 5 %	+ Squamous	NS	NS	NS	NS
mlh1	> 5 %	+ Squamous	NS	NS	NS	NS
TS	> 0 %	+ Adenoca	NS	NS	NS	NS
pRb	> 10 %	+ Squamous	NS	NS	NS	NS
e-cadherine	> 75 %	+ Squamous	NS	NS	NS	NS
p27	> 0 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	NS	NS	NS	--
cathepsinD	> 0 %	+Adenoca	NS	NS	NS	NS
	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	NS	NS	NS	--
c-kit	> 30 %	NS	NS	NS	NS	--
beta-catenin	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
c-erb2	> 5 %	+ Adenoca	NS	p=0,001 HR 2,69	p<0,01 HR 2,29	Significant
ciclin E	> 5 %	NS	NS	p<0,01 HR 2,22	p<0,01 HR 2,19	--
EGFR	> 1 %	+ Squamous	NS	NS	NS	NS

SV: Overall survival
 SLE: Disease free survival
 NS: No significant differences
 Adenoca: Adenocarcinoma

With these data we developed a prognostic model including clinical, surgical and pathological variables, besides variables denoting protein expression.

We found that men over 70 years, with a poorly differentiated carcinoma overexpressing c-myc, c-erb2 and ciclin E had an increased risk of mortality (5-years survival of 39.2 %) when comparing with women under 70 years, with well differentiated carcinoma and negative expression of those proteins (5-years survival of 83.1 %).

Respectively hazard ratios for variables were: gender (HR = 3,54; IC 95%: 1,07-11,67). age over 70 (HR = 1,60;IC95%: 1,02 – 2,51), poor differentiation (HR = 2,1;IC 95%; 1,09-3,70, ciclin E expression > 5 % (HR = 2,50;IC95%:1,55 – 4,05), c-erb2 expression > 5% (HR = 3,57;IC95%:1,89-6,77 and c-myc expression (HR = 1,97; IC 95%: 1,16-3,36).

We got similar findings when talking about disease free interval and the same prognostic variables (except gender).

Conclusions

- Conclusion to main objective:

The overexpression of c-myc, e-erb2 and ciclin E in tumoral samples of completely resected non small cell lung cancer in stages I and II, was related to a decrease in overall survival and disease free survival of patients. Overexpression of ciclin A, cdk1, cdk2, p16, p53, p27, pRb, mdm2, EGFR, c-kit, caspase 3a, catepsineD D, msh2, mlh1, e-cadherine, beta-catenin, topoisomerase II alpha and thymidylate synthase did not influenced prognosis.

- Conclusions to secondary objectives:

1. Ciclin A, msh2, mlh1, pRb, e-cadherine and EGFR overexpression was found in adenocarcinomas more frequently than in squamous carcinomas. Thymidylate synthase, catepsineD D and c-erb2 overexpression was higher among squamous carcinomas. The remaining proteins (c-myc, cdk1, cdk2,

p16, p53, p27, mdm2, c-kit, caspase 3a, beta-catenin and topoisomerase alpha) did not show differences in expression according to histological subtype.

2. Age over 70 years old and grade of differentiation were factors of worse prognosis in terms of overall survival and disease free survival. Gender, histological subtype, stage, TNM classification and type of resection did not work as prognostic factors.
3. The following variables defined a prognostic model of overall survival: c-myc expression, c-erb2 expression, ciclin E expression, gender, age and grade of differentiation.

The following variables defined a prognostic model of disease free survival: c-myc expression, c-erb2 expression, ciclin E expression, age and grade of differentiation.

ÍNDICE

Resumen	27
Summary	39
Introducción	51
Carcinoma broncogénico no microcítico.....	53
Factores pronósticos. Conceptos y aplicaciones en medicina	90
La información genética. Vías de desarrollo oncogénico y sus alteraciones como factores pronósticos en el carcinoma broncogénico no microcítico	95
Aspectos estadísticos. Análisis de la supervivencia en cáncer	105
Hipótesis y objetivos.....	109
Material y métodos	115
Diseño de la serie	117
Metodología de Matrices de Tejido	124
Valor de la expresión de las distintas proteínas analizadas	129
Análisis estadísticos	150
Resultados	153
Descripción de la serie.....	155
Análisis de supervivencia.....	163
Discusión	247
Introducción	249
Descripción de la serie.....	255
Supervivencia y factores pronósticos	259
Modelos pronósticos en carcinoma broncogénico no microcítico	298
Análisis crítico de la metodología utilizada en la realización de este proyecto	308
Aspectos destacables del estudio.....	311
Limitaciones del estudio.....	313
Conclusiones	317
Bibliografía	321
Anexos	343

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO MICROCÍTICO

1-1 EPIDEMIOLOGÍA

La frase con que comienza la gran mayoría de artículos relacionados con el cáncer de pulmón se repite desde hace décadas (1). Aquí no podemos hacerlo de otra manera: *el cáncer de pulmón continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer a nivel mundial* (2).

Los datos estadísticos más recientes, correspondientes a la *American Cancer Society*, establecen que el cáncer de pulmón supone el 14 % de los cánceres que se diagnostican en Estados Unidos. Es el segundo cáncer más frecuente en varones (tras el adenocarcinoma de próstata) y en mujeres (después del cáncer de mama). Se estima que a lo largo de 2013 se habrán diagnosticado en ese país 226.160 nuevos casos de cáncer de pulmón y se habrán producido 160.340 muertes derivadas de esa entidad, constituyendo el 28 % de las muertes por cáncer (3). A nivel internacional el porcentaje se estima en 12,9 %, suponiendo un 19,4 % de las muertes por cáncer, según los últimos datos publicados por Globocan y correspondientes al año 2012¹.

Un dato muy revelador de cómo los cambios sociales y en el estilo de vida redundan en los procesos neoplásicos es que de esos nuevos 226.160 casos de cáncer de pulmón esperados, 109.690, es decir, un 48,5 %, se habrán producido en mujeres. Del mismo modo, un 45,2 % de las muertes esperadas por cáncer de pulmón corresponderán al género femenino. La tendencia creciente en la incidencia del cáncer de pulmón en la mayoría de países occidentales ha sido mucho más acusada entre las mujeres, sin duda en relación a los cambios en el hábito tabáquico (4).

Con estos datos, la *American Cancer Society* llega a la conclusión de que en Estados Unidos uno de cada 13 varones y una de cada 16 mujeres (fumadores o no) desarrollarán un cáncer de pulmón a lo largo de su vida.

En España los datos son bastante similares. Sin embargo las diferencias entre géneros todavía permanecen

¹ http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

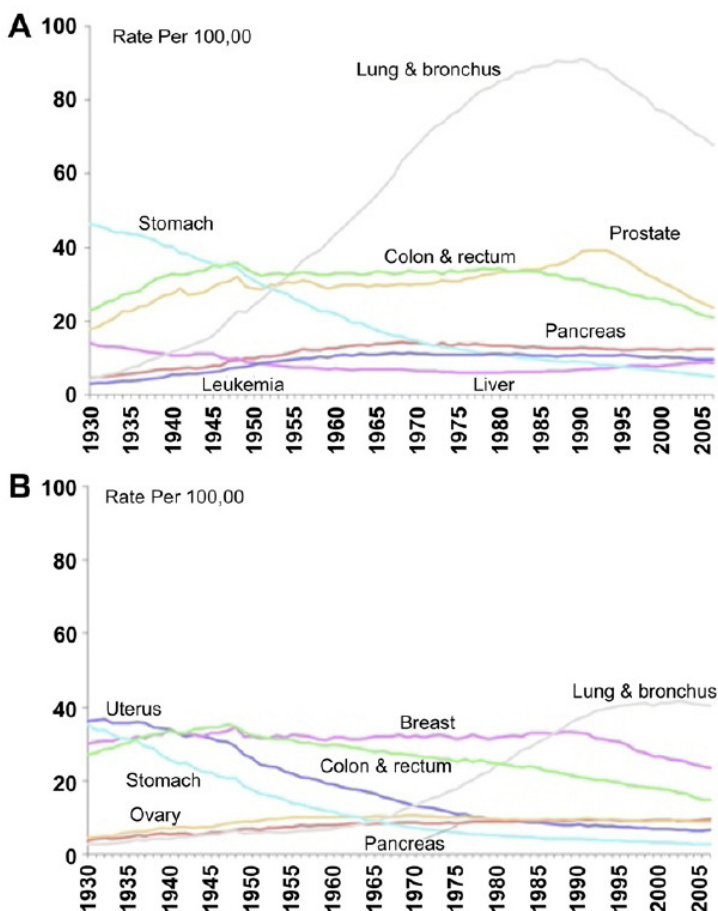
marcadas, con una relación hombre/mujer en muerte por cáncer de pulmón de 6,7 en el año 2005 (2). Sin embargo, como explica Sánchez de Cos, el incremento en la tasa de fallecimientos por cáncer de pulmón en mujeres entre 2000 y 2005 es de un 30,9 %, mientras que en varones se queda en un 7,5 %. Estos datos son representativos de la evolución epidemiológica del cáncer de pulmón en los países desarrollados a la que nos estamos refiriendo (figura 1).

Figura 1: Tasas de mortalidad por cáncer en Estados Unidos entre 1930 y 2006.

A) En hombres; B) En mujeres. Fuente: American Cancer Society.

Disponible en:

<http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures>



Como vemos en las gráficas, en Estados Unidos ha comenzado una estabilización de la incidencia de esta enfermedad. En España probablemente nos encontramos en el pico epidemiológico de mayor incidencia del cáncer de pulmón. Es de esperar un descenso lento pero progresivo en los próximos años (2).

Así pues, el cáncer de pulmón es hoy un problema de salud de primer nivel en los países desarrollados dada su elevada incidencia.

Un segundo aspecto importante al hablar del cáncer de pulmón es que más allá de su incidencia, presenta una alta mortalidad (3). La figura 2 compara la evolución de la tasa de supervivencia a 5 años de forma global para distintos procesos neoplásicos. El pronóstico del carcinoma broncogénico resulta a primera vista muy desalentador, tanto por su alta mortalidad como por la estabilidad de la misma a lo largo de medio siglo.

Figura 2: Evolución de la tasa de supervivencia a 5 años de distintos procesos neoplásicos en Estados Unidos (en %).

Fuente: American Cancer Society. En: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures>

Tumor primario	1975-1977	1984-1986	1999-2005
Todos	50	54	68
Mama	75	79	90
Colon	52	59	66
Leucemia	35	42	54
Pulmón	13	13	16
Melanoma	82	87	93
Linfoma no Hodgkin	48	53	69
Ovario	37	40	46
Páncreas	3	3	6
Próstata	69	76	100
Recto	49	57	69
Vejiga	74	78	82

La supervivencia global a los cinco años del diagnóstico del cáncer de pulmón varía entre el 5 % y el 16 % en función del país de origen de la serie que se analice. Probablemente la obtención de estos datos y el correspondiente cálculo de estas tasas no es homogéneo en toda la literatura (5, 6).

En España un estudio bastante representativo publicado en 2008 presenta una supervivencia a 3 años del 13,8 % (7). Sin embargo, estos datos son globales. Lo que sí hemos ido descubriendo, sobre todo en los últimos años, es que el cáncer de pulmón es una neoplasia muy heterogénea en todos los aspectos. Desde el punto de vista histológico queda lejos ya la clasificación tradicional que diferenciaba entre dos únicos grandes grupos, que son el carcinoma microcítico y el no microcítico (de comportamiento biológico y pronóstico muy distintos). Hoy sabemos que los subtipos histológicos (sobre todo dentro del no microcítico), son muchos y muy diferentes. Incluso factores como el género, tradicionalmente no vinculado al distinto comportamiento de este grupo de tumores, parece ahora constituir un factor que afecta no solo a las características del mismo, sino también a la diferente respuesta al tratamiento, que se ha demostrado mejor en mujeres (8, 9).

Dejaremos de lado el carcinoma broncogénico microcítico o de células pequeñas, que constituye entre un 15 % y un 20 % de los casos, y nos centraremos en el carcinoma broncogénico no microcítico (CBNM), cuyas características biológicas y de comportamiento son totalmente diferentes.

1-2. ASPECTOS ETIOPATOGÉNICOS

1-2.1. Tabaco

El 80 % de los casos de carcinoma broncogénico no microcítico (CBNM) está en relación con el tabaco (10). Se sabe que de las 300 sustancias químicas que aproximadamente incluye el tabaco en forma de cigarrillos, al menos 40 resultan carcinógenas. Sustancias como la *nitrosamina 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-1 butanona (NNK)*, y los hidrocarbonatos policíclicos aromáticos como el *benzopireno*, inducen carcinomas broncogénicos en roedores que presentan las mismas características histológicas y genético-moleculares que los que aparecen en adultos (11). La NNK produce mutaciones a nivel de k-ras, que se identifican hasta en el 40 % de los adenocarcinomas pulmonares humanos y se han correlacionado con la exposición al tabaco (12). El humo del tabaco se ha asociado a otras mutaciones, como en el gen p53 (50 % –70 % de los cánceres de pulmón), y en otros múltiples genes a nivel de distintas vías celulares o pathways implicadas en la oncogénesis, como son la regulación del ciclo celular, reparación del DNA, apoptosis celular, angiogénesis, y un largo etcétera que comentaremos más adelante.

El potencial oncogénico del tabaco está relacionado con la intensidad y duración del hábito tabáquico. Estos factores suelen medirse con el índice paquetes/año. A igualdad de dicho índice parece que la duración es un factor de riesgo más potente que la intensidad (13).

Asimismo, la nicotina y sus metabolitos han demostrado constituir *per se* agentes inductores del crecimiento y proliferación de un tumor, así como factores mediadores de resistencia a quimioterápicos (14).

El riesgo de desarrollar un carcinoma broncogénico disminuye progresivamente tras el cese del hábito tabáquico, si bien no llega a equipararse al riesgo de aquéllos que nunca han fumado (15). Este efecto proporciona años de vida ganados independientemente del momento de la vida en que se deje de fumar, incluso por encima de los 65 años (16).

Por últimos, aunque se trata de un tema controvertido y de bastante impacto social en los últimos meses, no hay datos que aclaren los potenciales riesgos de los cigarrillos electrónicos. Hasta el momento, las sociedades científicas solo han manifestado su cautela ante un tema que puede abrir una nueva línea de investigación desde el punto de vista epidemiológico.

1-2.2. Predisposición genética

Lo cierto es que menos del 20 % de fumadores desarrollan a lo largo de su vida un cáncer de pulmón. Se ha estudiado una posible agregación familiar y, si bien es cierto que algunos estudios parecen demostrar un riesgo aumentado entre pacientes con familiares de primer grado con cáncer de pulmón, sobre todo si se trata de procesos de aparición precoz y en varios miembros (17), las conclusiones son bastante vagas (18) y quedan claramente a la sombra del principal factor etiopatogénico identificado que es el tabaco.

Sabemos que diferentes carcinógenos del tabaco pueden producir mutaciones y que el riesgo de desarro-

llar cáncer de pulmón puede estar en relación con distintos polimorfismos de los genes responsables de las vías de reparación del DNA como el x-ray cross-complementing group 1 (XRCC1) o el excision repair cross-complementing group 2 (ERCC2) (19). También se ha relacionado la susceptibilidad con polimorfismos en genes implicados en procesos inflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX-2), o las interleukinas 6 y 8 (20).

En cualquier caso, hasta el momento actual no existen perfiles genéticos conocidos que aumenten la susceptibilidad oncogénica al tabaco y permitan actuar en consecuencia en estrategias de cribado con potencial aplicación en prevención primaria. La heterogeneidad a la que ya hemos aludido dentro del carcinoma broncogénico y específicamente dentro del CBNM, nos lleva a pensar que difícilmente encontraremos un único locus en un cromosoma donde radique la susceptibilidad o el daño inicial que conducen al desarrollo de un cáncer de pulmón (21).

1-2.3. Exposición a agentes exógenos

Aunque ninguno se acerca al potencial de riesgo del tabaco, varios agentes externos han demostrado correlacionarse con un aumento en el riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón. Quizá el más significativo es el asbesto, tan vinculado al desarrollo del mesotelioma pleural, pero con un efecto mayor si cabe como inductor de carcinoma broncogénico (22).

Productos como el cromo, el cobalto, el níquel, el cadmio, el uranio o el radón también se han asociado a un riesgo mayor (22), al igual que las radiaciones ionizantes.

Respecto a la contaminación ambiental, distintos estudios han evidenciado un incremento en el riesgo relativo de desarrollar cáncer de pulmón en zonas de alta polución, con tasas de riesgo de entre 1,2 y 1,7 (23, 24).

1-2.4. Otros factores

Patologías previas o coexistentes, como los procesos respiratorios crónicos, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el asma, la tuberculosis y sus secuelas, procesos inmunológicos, etc., también se han estudiado como posibles factores de riesgo (25).

Con todos estos datos se ha intentado incluso diseñar modelos de riesgo de desarrollar cáncer de pulmón con fines de aplicación en salud pública, aunque con resultados poco sólidos (26).

1-3. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CBNM

La clasificación histológica de los tumores epiteliales pulmonares vigente en la actualidad es la desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2004 (27), basada en la publicada en el año 1999 por Travis (tabla 1) (28).

El representante principal de todas esas estirpes histológicas de tumores pulmonares es, como hemos dicho,

el CBNM. Y dentro de él, el más frecuente es el adenocarcinoma.

En los últimos años, el análisis del comportamiento biológico de los CBNM ha llevado una modificación en la subclasificación de los adenocarcinomas de pulmón protagonizada por el propio Travis (29) y adoptada de forma general tanto por la Asociación Internacional para el estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) como por la Sociedad Europea de Cirugía Torácica (ESTS).

La motivación teórica que ha llevado a este reajuste es la necesidad de correlacionar de forma traslacional los datos histopatológicos del cáncer de pulmón con sus manifestaciones radiológicas y clínicas por una parte, y con sus implicaciones pronósticas y terapéuticas por otra. Así, el propio Travis define como objetivos de esta revisión:

- Definir una clasificación clínica, radiológica, molecular y patológica para tipificar al máximo cada adenocarcinoma
- Definir grupos pronósticos
- Definir potenciales terapias dirigidas.

Se trata de implicar al patólogo cada vez más en el abordaje multidisciplinar del carcinoma broncogénico, pues los avances en la tipificación biomolecular del cáncer de pulmón dan pie a que cada vez se le exija que obtenga más información de la pieza analizada. Para ello, Travis establece una clara distinción entre la clasificación histológica de pequeñas muestras obtenidas por biopsia no quirúrgica, y aquella para análisis de la pieza quirúrgica completamente reseada. La nueva clasificación del adenocarcinoma pulmonar se presenta en la tabla 2 para muestra citológica/pequeña biopsia, y tabla 3 para espécimen quirúrgico (30).

Sin duda esta exhaustiva clasificación supone un cambio radical en el concepto del cáncer de pulmón, que hasta hace no muchos años se dividía exclusivamente en no microcítico y microcítico, diferenciando entre los primeros el adenocarcinoma y el epidermoide.

La heterogeneidad en oncología, y de forma especialmente importante al hablar de carcinoma broncogénico, ha permitido investigar mecanismos oncogénicos y sus potenciales terapias dirigidas que constituyen hoy en día la gran esperanza en el tratamiento de esta enfermedad, sobre todo en estadios avanzados, ya que el papel de la resección quirúrgica completa en los estadios precoces con intención radical o curativa permanece fuera de toda duda.

Tabla 1. Clasificación de los tumores epiteliales del pulmón. Transcrito de Travis y col (28).

1. Carcinoma epidermoide
 - a. Papilar
 - b. Células claras
 - c. Células pequeñas
 - d. Basaloide
2. Carcinoma de células pequeñas
 - a. Carcinoma combinado microcítico y no microcítico (se considera variante del microcítico)
3. Adenocarcinoma
 - a. Acinar
 - b. Papilar
 - c. Bronquioloalveolar (BAC)
 - i. No mucinoso
 - ii. Mucinoso
 - iii. Mixto o indeterminado
 - d. Adenocarcinoma sólido con formación de mucina
 - i. Adenocarcinoma fetal bien diferenciado
 - ii. Adenocarcinoma mucinoso (coloide)
 - iii. Cistoadenocarcinoma mucinoso
 - iv. Adenocarcinoma en anillo de sello
 - v. Adenocarcinoma de células claras
4. Carcinoma de células grandes
 - a. Carcinoma neuroendocrino de células grandes
 - i. Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado
 - b. Carcinoma basaloide
 - c. Carcinoma linfopieloma-like
 - d. Carcinoma de células claras
 - e. Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide
5. Carcinoma adenoescamoso
6. Carcinoma sarcomatoide
 - a. Carcinoma pleomórfico
 - b. Carcinoma de células espinosas
 - c. Carcinoma de células gigantes
 - d. Carcinosarcoma
 - e. Blastoma pulmonar
7. Carcinoides
 - a. Carcinoide típico
 - b. Carcinoide atípico
8. Carcinoma de tipo glándula salivar
 - a. Carcinoma mucoepidermoide
 - b. Carcinoma adenoide quístico
 - c. Otros
9. No clasificados
10. Lesiones preinvasivas

Tabla 2. Nueva clasificación del carcinoma broncogénico no microcítico (sobre muestras citológicas o pequeño material obtenido en biopsia). Correlación con nomenclatura previa de la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de 2004. Tomado de Travis y col (30).

Clasificación de la WHO de 2004	Biopsia pequeña/citología: IASLC/ATS/ERS
Adenocarcinoma	El patrón morfológico de adenocarcinoma está presente claramente:
Subtipo mixto	Se debe describir el patrón de adenocarcinoma presente (incluido el micropapilar, no presente en la clasificación de 2004). Si el crecimiento es puramente lepidico, mencionar que no se puede descartar un componente invasivo.
Acinar	
Papilar	
Sólido	Si no está presente la morfología de adenocarcinoma: Carcinoma no de células pequeñas, más probablemente adenocarcinoma.
BAC (no mucinoso)	Adenocarcinoma con patrón lepidico (si es lepidico puro, hacer mención a que no puede descartarse un componente invasivo en muestra pequeña).
BAC (mucinoso)	Adenocarcinoma mucinoso (describir el patrón).
Fetal	Adenocarcinoma con patrón fetal
Mucinoso (coloide)	Adenocarcinoma con patrón coloide
Anillo de sello	Adenocarcinoma con patrón que sea y con rasgos de en anillo de sello.
Células claras	Adenocarcinoma con patrón que sea y con rasgos de células claras.
Carcinoma escamoso	El patrón morfológico de carcinoma escamoso está presente claramente.
Papilar	Si no está presente el patrón claro de carcinoma escamosos, denominarlo carcinoma no de células pequeñas, más probablemente escamoso.
Células claras	
Células pequeñas	
Basaloide	
Carcinoma de células pequeñas	Carcinoma de células pequeñas
Carcinoma de células grandes	Carcinoma no de células pequeñas sin otra especificación.
LCNEC	Carcinoma no de células pequeñas con morfología neuroendocrina. Si los marcadores de tumor neuroendocrino son negativos, mencionarlo.
Carcinoma adenoescamoso	Presentes datos morfológicos de adenocarcinoma y de carcinoma escamoso.
	No datos morfológicos de adenocarcinoma ni de carcinoma escamoso, pero inmunohistoquímica compatible con origen glandular. Mencionar que puede tratarse de un carcinoma adenoescamoso.
Carcinoma sarcomatoide	Carcinoma no de célula pequeña, poco diferenciado, con espinas o células gigantes. Mencionar si la parte de carcinoma presenta morfología predominante de adenocarcinoma o escamoso.

Tabla 3. Nueva clasificación de los adenocarcinomas pulmonares (sobre muestras procedentes de pieza quirúrgica reseca). Transcrito de Travis y col (30).

1. Lesiones preinvasivas
 - a. Hiperplasia adenomatosa atípica
 - b. Adenocarcinoma in situ
2. Adenocarcinoma mínimamente invasivo (≤ 3 cm, con componente lepidico y ≤ 5 mm de invasión)
 - a. No mucinoso
 - b. Mucinoso
 - c. Mixto
3. Adenocarcinoma invasivo
 - a. Predominantemente lepidico (previamente llamado patrón BAC no mucinoso), con > 5 mm de invasión
 - b. Predominantemente acinar
 - c. Predominantemente papilar
 - d. Predominantemente sólido con producción de mucina
4. Variantes de adenocarcinoma invasivo
 - a. Adenocarcinoma invasivo mucinoso (previamente BAC mucinoso)
 - b. Coloide
 - c. Fetal (bajo y alto grado)
5. Entérico

BAC: bronquioloalveolar

La incidencia de aparición de los dos grandes subtipos de CBNM tampoco es homogénea.

El adenocarcinoma se ha convertido ya en el tipo más frecuente, y es sin duda el mayoritario entre no fumadores (tabla 4). Aparece sobre todo en la vía aérea distal, es decir, son lesiones periféricas (31). Suelen estar bien circunscritas y si son subpleurales con frecuencia umbilican la pleura visceral, por el componente fibrótico que presentan en su interior. No suelen afectar a vías aéreas principales. Su patrón histológico es variable, estando constituido por acinos o túbulos, con o sin formación de mucina intraluminal. También pueden presentar estructuras papilares sin signos estructurales de diferenciación glandular. El patrón de crecimiento lepidico, anteriormente llamado bronquioloalveolar, se caracteriza por la propagación de las células tumorales a lo largo del estroma, sin destruir las estructuras alveolares pulmonares. El intersticio tampoco se ve alterado, salvo por cierto componente inflamatorio.

El carcinoma epidermoide o escamoso suele originarse en los bronquios lobares o segmentarios, apareciendo como una masa polipoidea o papilar en el interior de la luz bronquial visible endoscópicamente. Suele producir obstrucción de la vía aérea, dando lugar a fenómenos atelectásicos o de sobreinfección de las secreciones retenidas distalmente. Si las lesiones son grandes presentan necrosis central, a veces muy extensa y que deja amplias áreas

de muy difícil diagnóstico si no se dispone de la pieza entera. Las células presentan puentes intercelulares y/o queratinización.

Tabla 4. Frecuencia relativa de los carcinomas epiteliales pulmonares más frecuentes y sus diferencias entre fumadores y no fumadores. Adaptada de Bryant y Cerfolio (32).

Tipo histológico	No fumadores	Fumadores
Escamoso	33%	42%
Adenocarcinoma	45%	44%
Carcinoides	16%	7%
Otros	6%	8%

El carcinoma de células grandes es aquel tipo de tumor que no presentando características de carcinoma microcítico tampoco presenta una diferenciación definida hacia escamoso o adenocarcinoma. Suelen ser tumores voluminosos, con necrosis, aunque con escasa cavitación. Las células crecen formando láminas. Este tipo de tumores es por definición indiferenciado.

A su vez, los carcinomas epidermoides y adenocarcinomas pueden presentar mayor o menor **grado de diferenciación**, lo cual también se ha correlacionado con el comportamiento biológico del tumor en algunos casos (33).

1-4. PATRÓN DE EXTENSIÓN DEL CBNM

Tras un tiempo indeterminado de crecimiento en el interior del parénquima pulmonar (estructuras alveolares y/o paredes bronquiales), el tumor invade los elementos vasculares y linfáticos de la zona y comenzará su extensión regional y a distancia. En este proceso están implicados de forma significativa fenómenos de adhesión celular, tropismo vascular, angiogénesis, etcétera. Habitualmente la afectación tumoral de los ganglios linfáticos regionales precederá a la extensión a distancia, si bien esto no es siempre así. El sistema linfático pulmonar circula de forma paralela a las estructuras bronquiales. Las primeras estaciones ganglionares se encuentran en las bifurcaciones subsegmentarias y segmentarias de las vías aéreas. El sistema linfático de los lóbulos pulmonares inferiores drena hacia el mediastino posterior y los ganglios subcarinales (34). El lóbulo superior derecho drena

hacia el mediastino superior, mientras que el lóbulo superior izquierdo lo hace hacia los linfáticos de la región paraaórtica y cerca de la salida de la arteria subclavia izquierda, en el mediastino anterior. También se dirigen linfáticos de esta procedencia hacia el mediastino superior, siguiendo en paralelo al bronquio principal izquierdo.

La extensión regional de las células tumorales procedentes del pulmón habitualmente se hace de forma anterógrada y escalonada, pasando por las distintas regiones ganglionares ipsolaterales (N1) primero y centrales mediastínicas (N2) después, para en su caso cruzar al lado contralateral del mediastino (N3). Sin embargo, no es raro encontrarnos con *skip metastases*, concepto que hace referencia al fenómeno por el cual las células tumorales pueden asentar en ganglios de determinadas estaciones o regiones sin afectar a los situados previamente en su camino. Este comportamiento dentro de la historia natural de cada tumor, aunque impredecible, ofrece a menudo información pronóstica relevante de cara al manejo multidisciplinar de la enfermedad (35). Existe una explicación anatómica, parcial en cualquier caso por impredecible, por la cual sistemas de drenaje linfático de determinadas zonas del pulmón, abocan su flujo a grupos ganglionares mediastínicos N2 sin pasar por estaciones N1.

El propio tumor, por su extensión y crecimiento locales, puede invadir por contigüidad estructuras anatómicas vecinas en el tórax y en el cuello (pared torácica, diafragma, mediastino, grandes vasos, corazón, esófago, estructuras nerviosas, etc.).

La diseminación a distancia, generalmente hematogena, da lugar a implantes metastáticos en huesos, hígado, glándulas suprarrenales y cerebro, como órganos más frecuentemente afectados. Sin embargo, es muy importante no olvidar un lugar frecuente de metástasis como es el propio pulmón, bien por embolización endobronquial, bien por vía linfática o hematogena. La aparición de lesiones sincrónicas (y también metacrónicas en el caso de tumores tratados y potencialmente curados en el pasado) a nivel pulmonar sin relación directa de contigüidad con el tumor original abre la duda ante la posible naturaleza de la misma como metástasis o como un segundo tumor pulmonar primario sincrónico. La distinción a menudo no es fácil y condiciona la estrategia terapéutica a seguir ante esos pacientes.

1-5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El carcinoma broncogénico es en general un tumor silente. Sus manifestaciones clínicas dependerán de la extensión locorregional y las posibles manifestaciones a distancia.

Los síntomas que puede producir un carcinoma broncogénico en términos genéricos, los podemos clasificar en varios grupos:

- Respiratorios, producidos por el propio tumor mientras está confinado al parénquima pulmonar (atelectasias obstructivas, neumonías, hemoptisis, tos, disnea, derrame pleural, etc.).
- Por extensión local directa a estructuras adyacentes (dolor torácico, parálisis diafragmática, síndrome de vena cava superior, disfagia, disfonía, síndrome de Horner, pericarditis, etc.).
- Por diseminación a distancia (dolor osteoarticular, fracturas patológicas, fenómenos neurológicos centra-

les, disfunciones endocrinas, etc.).

- Secundarios a síndromes paraneoplásicos (endocrinos, hematológicos, neurológicos, etc.).
- Generales (astenia, anorexia, pérdida de peso).

1-6. ESTADIFICACIÓN DEL CBNM

1-6.1. Generalidades

El objetivo principal a la hora de afrontar un paciente con un CBNM es definir cuál es el mejor tratamiento para su enfermedad. En gran medida éste vendrá condicionado por lo avanzado que se encuentre el tumor. Por eso es fundamental estadificarlo desde el primer momento.

Los sistemas de estadificación se han basado tradicionalmente en criterios anatómicos. El sistema TNM fue propuesto por Pierre Denoix en 1946 (36). La primera recomendación en este sentido fue publicada en 1966 por la Union Internationale Contre le Cancer (UICC) en Ginebra (37). El sistema TNM (tumor, ganglios y metástasis a distancia) constituyó la base para el sistema de estadificación de la UICC y del American Joint Committee on Cancer (AJCC) (38), los cuales fueron paulatinamente reemplazados por el Nuevo Sistema Internacional de Estadificación en 1986, con sus actualizaciones posteriores, en 1997 (39) y 2007.

En 1996 Mountain y Dressler propusieron un conjunto de recomendaciones para clasificar los ganglios linfáticos del mediastino (39), que fueron adoptadas por la UICC y la AJCC. El diagrama y las definiciones surgidas de estas recomendaciones unificaron las pautas de clasificación de dichos ganglios desarrolladas inicialmente por Naruke (40). Según Bartolomé Vassallo, estadificar “*consiste en cuantificar la extensión anatómica de una determinada patología neoplásica en un paciente con el criterio de permitir un agrupamiento racional entre enfermos con similar patología, pero en diferentes estadios de extensión de la misma, y con el propósito de establecer en cada subpoblación analizada perspectivas pronósticas y tácticas terapéuticas [...]. Una estadificación exacta del cáncer es esencial para definir operabilidad, para seleccionar regímenes adecuados de tratamiento, para predecir supervivencia y para comunicar resultados finales comparables*” (41). La dificultad estriba en determinar de la forma más objetiva posible el grado de extensión de un tumor a nivel local (T), ganglionar (N) y a distancia (M). De hecho, la supuesta extensión de una neoplasia en función de los hallazgos radiológicos puede variar cuando el paciente se opera y se realiza un estudio macro y microscópico de la enfermedad. Es por ello que tradicionalmente se habla de dos tipos de estadificación:

- Clínica, en función de hallazgos obtenidos por cualquier procedimiento que excluya la cirugía, como son la historia clínica, el examen físico, los estudios radiológicos, endoscópicos, análisis de líquido pleural, incluyendo incluso la realización de biopsias quirúrgicas de estructuras potencialmente afectadas.

- Quirúrgico-patológica, que parte de la información obtenida en el momento del acto operatorio, y termina con el estudio anatomopatológico completo de la pieza reseca. Parece evidente pensar que el grado de extensión del tumor primario (T) será tanto más preciso cuanto más completa sea la resección o al menos con mayor detalle

pueda analizarse la afectación de estructuras a nivel local y regional por contigüidad. Asimismo, el grado de extensión ganglionar (N) será tanto más exacto cuanto más completa sea la linfadenectomía mediastínica que se realice en el acto quirúrgico. La afectación a distancia (M) desde el punto de vista quirúrgico-patológico no ha lugar fuera del contexto de una autopsia, que permita un análisis preciso de la totalidad de los órganos y tejidos del organismo.

La estadificación por estadios comenzó a aplicarse en 1973, con los propuestos por la AJCC (entonces todavía AJC). En 1978 este sistema fue reemplazado por el de la UICC (42). No entraremos a analizar con detalle estos sistemas de clasificación iniciales y nos centraremos en la modificación realizada por Mountain en 1986 (1), quien sentó las bases de la estadificación moderna del CBNM. Este “Nuevo Sistema de Estadificación Internacional del Cáncer Pulmonar” se basaba en su propia base de datos, con casi 4000 pacientes con cáncer de pulmón seguidos durante al menos dos años. Es el sistema aceptado a nivel internacional y que utilizamos para la realización de nuestra investigación. Este método de estadificación fue ampliamente aceptado por la AJCC, la UICC y los comités para el cáncer de Alemania y Japón, y se publicó en la clasificación del cáncer pulmonar de la cuarta edición del manual AJCC, en 1987 (43), así como en la tercera edición del manual americano de 1988 (44)

En 1996 se realizó la siguiente revisión, que llevó a algunas modificaciones, incluidas en la quinta edición de los manuales de la AJCC (45) y la UICC (46), publicados ambos en 1997. Esta clasificación será la utilizada en nuestro trabajo.

La tabla 5 desarrolla la clasificación TNM de la revisión de Mountain de 1996 publicada un año después. Las tablas 6 y 7 muestran la clasificación por estadios para la primera y segunda revisión de Mountain, en 1986 y 1997, respectivamente.

Momentos clave en el desarrollo de la estadificación del carcinoma broncogénico no microcítico (CBNM)	
1946	Creación del sistema TNM (Pierre Denoix)
1966	Aplicación del TNM al carcinoma broncogénico
1973	Adopción de los estadios de la AJCC
1978	Adopción de los estadios de la UICC
1986	Primera modificación de Mountain
1996	Segunda modificación de Mountain

Tabla 5. Sistema Internacional de Estadificación del CBNM (1997). Clasificación TNM. Modificada de Mountain, 1997 (47).

Tumor primario (T)	
Tx	Células malignas en secreciones bronco-pulmonares sin evidencia de tumor
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor de 3 cm o menos rodeado por pulmón o pleura visceral y sin evidencia de invasión proximal a un bronquio lobar en la broncoscopia.
T2	Tumor de más de 3 cm o tumor de cualquier tamaño que invade la pleura visceral o presenta atelectasia asociada a neumonitis obstructiva extendiéndose a la región hiliar. El tumor no está a menos de 2 cm de carina. La atelectasia no puede comprometer a todo el pulmón.
T3	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a pared torácica, diafragma o pleura mediastínica o pericárdica, sin compromiso de corazón, grandes vasos, tráquea, esófago o cuerpo vertebral, o bien tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de carina, pero sin comprometerla.
T4	Tumor de cualquier tamaño con invasión del mediastino o del corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral o carina, o bien presencia de derrame pleural maligno. O bien presencia de nódulo satélite en el mismo lóbulo.
Afectación ganglionar	
N0	Metástasis no demostrable en ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en ganglionar linfáticos peribronquiales o hiliares ipsolaterales o ambos, incluyendo extensión directa.
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsolaterales y subcarinales.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales y escalenos o supraclaviculares ipso o contralaterales.
Metástasis a distancia	
M0	Ausencia de metástasis
M1	Presencia de metástasis. O bien nódulos pulmonares en diferentes lóbulos.

Tabla 6. Sistema Internacional de Estadificación del CBNM (1986). Agrupamiento por estadios.
Modificada de Mountain, 1986 (1).

Carcinoma oculto TxN0M0	Células malignas en secreciones bronco-pulmonares sin evidencia de tumor
Estadio 0 TisN0M0	Carcinoma in situ
Estadio I T1N0M0 T2N0M0	Tumor en estadio precoz sin afectación ganglionar ni a distancia
Estadio II T1N1M0 T2N1M0	Tumor en estadio precoz, pero con extensión ganglionares peribronquial o hiliar ipsolateral
Estadio IIIA T3N0-1M0 T1-3N2M0	Tumor con extensión local T3, con o sin afectación ganglionar peribronquial, hiliar o mediastínica ipsolateral Afectación ganglionar mediastínica ipsolateral
Estadio IIIB Cualquier TN3M0 T4, cualquier N, M0	Extensión local a estructuras potencialmente irresecables Adenopatías mediastínicas o supraclaviculares contralaterales Derrame pleural maligno
Estadio IV M1	Diseminación metastásica a distancia

Tabla 7. Sistema Internacional de Estadificación del CBNM (1997). Agrupamiento por estadios.
Modificada de Mountain, 1997 (47)

Estadio 0	TisN0M0 (carcinoma in situ)
Estadio IA	T1N0M0
Estadio IB	T2N0M0
Estadio IIA	T1N1M0
Estadio IIB	T2N1M0 T3N0M0
Estadio IIIA	T3N1M0 T1N2M0 T2N2M0 T3N2M0
Estadio IIIB	Cualquier T4 Cualquier N3
Estadio IV	Cualquier M1

Dado que esta clasificación estaba basada en criterios principalmente radiológicos, quedaba supeditada a la evolución de las propias técnicas de imagen. Así, la evolución de la tomografía computarizada (TC) podía dar lugar a que muchos tumores aparecieran infra o sobreestadificados con este sistema. Además, la base de datos de Mountain era predominantemente quirúrgica. Es por ello que la clasificación no resolvía las dudas acerca de la correlación real entre la clasificación clínica (que frecuentemente definía el tipo de tratamiento a seguir) y la quirúrgico-patológica, que es la que define la estadificación real del tumor, pero que pasa, claro está, por una resección completa del mismo. Por ello, ya desde el mismo momento de la publicación de la quinta edición de la clasificación del CBNM, los expertos llamaron la atención acerca de estos aspectos. Advertencia que dio lugar al desarrollo de un proyecto de estadificación a gran escala, incluyendo más de 100.000 casos de todo el mundo, centralizado por la *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*. Este proyecto conllevó un sistema de validación muy complejo (48-50), así como un proceso de definición de grupos pronósticos muy preciso desde el punto de vista estadístico (51). El resultado es una clasificación que por primera vez se basa en datos globales de casos tratados por todas las modalidades de tratamiento y con un intenso proceso de validación interna y externa (52). De hecho este sistema integra ya actualmente los tumores neuroendocrinos pulmonares (53) y el mesotelioma maligno. Las tablas 8 y 9 muestran la clasificación vigente en la actualidad.

1-6.2. Papel de la linfadenectomía en la estadificación del carcinoma broncogénico

Ya hemos diferenciado previamente entre la estadificación clínica, basada en datos fundamentalmente radiológicos, y la estadificación quirúrgico-patológica, que exige disponer de la pieza completamente reseada.

La afectación ganglionar en el CBNM constituye uno de los factores pronósticos más importantes, como veremos más adelante, y define per se como hemos visto un cambio en el estadio de la enfermedad. Por tanto, la correcta estadificación pasa por una precisa evaluación de los territorios ganglionares, lo cual no es fácil, y casi siempre asocia un margen de incertidumbre que se intenta sea lo más estrecho posible.

En el anexo III podemos ver la representación gráfica de los diferentes territorios ganglionares pulmonares y mediastínicos.

El correcto y preciso uso de la terminología y la adecuada ubicación topográfica de las estaciones ganglionares que se biopsia parcial o totalmente durante un procedimiento quirúrgico es fundamental a la hora de establecer parámetros comparativos en términos de resección completa, resultados, pronóstico e incluso adecuación de tratamientos.

Es por ello que estas referencias anatómicas, a menudo susceptibles de ser manejadas con cierta imprecisión, sean perfectamente conocidas no solo por el cirujano torácico que realiza la resección, sino también, y de forma muy especial, por el personal de anatomía patológica que talla la pieza una vez reseada de cara a su estudio histológico. La colaboración entre el cirujano que reseca, el técnico que en momento dado puede ayudar al patológico a tallar y el propio patólogo que realiza el exhaustivo análisis, redundará en una mejor calidad del procedimiento quirúrgico.

Tabla 8. Sistema Internacional de Estadificación del CBNM (2009). Clasificación TNM.

Tumor primario (T)	
Tx	Células malignas en secreciones broncopulmonares sin evidencia de tumor
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor de 3 cm o menos rodeado por pulmón o pleura visceral y sin evidencia de invasión proximal a un bronquio lobar en la broncoscopia. T1a ≤ 2 cm; T1b > 2cm.
T2	Tumor de entre 3 y 7 cm o tumor con alguna de las siguientes características: - Invasión de bronquio principal a > 2 cm de carina - Invasión de pleura visceral - Atelectasia por neumonitis sin afectación de todo el pulmón. T2a: de 3 a 5 cm T2b: de 5 a 7 cm.
T3	Tumor de más de 7 cm y/o con extensión directa a pared torácica (incluye sulcus superior), diafragma o pleura mediastínica o pericárdica, sin compromiso de corazón, grandes vasos, tráquea, esófago o cuerpo vertebral. O bien tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de carina, pero sin comprometerla. O bien atelectasia de todo el pulmón o nódulo satélite en el mismo lóbulo.
T4	Tumor de cualquier tamaño con invasión del mediastino o del corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral o carina, o bien presencia de derrame pleural maligno. O bien presencia de nódulo satélite en distinto lóbulo pero mismo pulmón.
Afectación ganglionar	
N0	Metástasis no demostrable en ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en ganglionar linfáticos peribronquiales o hiliares ipsolaterales o ambos, incluyendo extensión directa.
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsolaterales y subcarinales.
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales y escalenos o supraclaviculares ipso o contralaterales.
Metástasis a distancia	
M0	Ausencia de metástasis
M1	Presencia de metástasis. M1a: Nódulo/s en pulmón contralateral o derrame pleural o pericardio neoplásicos. M1b: Metástasis a distancia

Tabla 9. Sistema Internacional de Estadificación del CBNM (2009). Agrupamiento por estadios.

Estadio 0	TisN0M0 (carcinoma in situ)
Estadio IA	T1a-bN0M0
Estadio IB	T2aN0M0
Estadio IIA	T1a-bN1M0
	T2aN1M0
	T2bN0M0
Estadio IIB	T2bN1M0
	T3N0M0
Estadio IIIA	T1-3N2M0
	T3N1M0
	T4N0-1M0
Estadio IIIB	T4N2M0
	Cualquier N3
Estadio IV	Cualquier M1a-b

Desde el punto de vista de la **estadificación clínica**, la afectación ganglionar se evalúa:

- a. Por técnicas no invasivas, fundamentalmente pruebas de imagen como la tomografía computarizada (TC) y la tomografía por emisión de positrones (PET). Asocian un importante porcentaje de falsos positivos y falsos negativos (54). Según la revisión realizada por Toloza, y cuyos resultados no han variado en los últimos años, la TC muestra en la evaluación de la afectación ganglionar mediastínica del CBNM una sensibilidad del 57 %, una especificidad del 82 %, un valor predictivo negativo del 83 % y un valor predictivo positivo del 56 %. Por su parte la revisión realizada por el American College of Chest Physicians (ACCP) para la elaboración de la segunda edición de su guía clínica basada en la evidencia (55) encontró para la PET una sensibilidad media entre los distintos estudios analizados del 74 % (rango del 29 % al 79 %) y una especificidad del 85 % (rango del 82 % al 88 %). El valor predictivo negativo alcanzó el 93 % y el valor predictivo positivo el 79 %. Estos valores mejoran ligeramente cuando hablamos de tumores en estadio inicial (T1 y T2), como comprueba Wang en un reciente metaanálisis con más de 1200 pacientes (56).
- b. Por técnicas invasivas no quirúrgicas, como son la punción con aguja fina por vía endoscópica bronquial (EBUS) o esofágica (EUS) (55, 57). Como toda técnica invasiva son operador-dependiente, por lo que los resultados son variables y los estudios heterogéneos. Un metaanálisis publicado en 2009 por Gómez y col, que incluía 12 estudios con un total de 1292 pacientes, mostró para el EBUS una sensibilidad del 93 %, una especificidad del 100 %, un 9 % de falsos negativos (rango 1-37 %) y ningún falso positivo. Todo ello para una prevalencia de positividad entre el 20 % y el 40 % (58). Otro metaanálisis analizando el rendimiento del EUS en estos pacientes encontró una sensibilidad del 83 % (59), que alcanza el 92 % en otros estudios, con una precisión diagnóstica entre el 83 y el 93 % (60). Los puntos clave en el momento actual

sobre este tipo de técnicas los resume Kuzdzal (61):

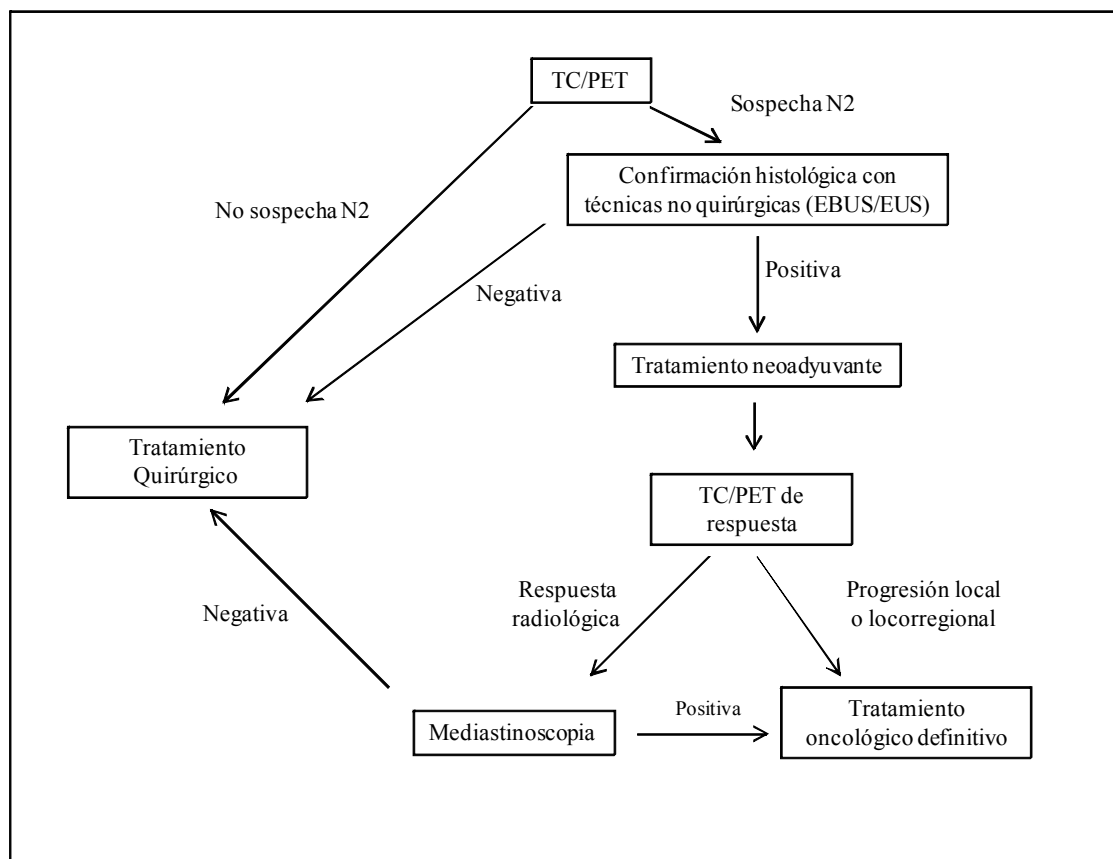
- i. Permiten la obtención de muestras citológicas e histológicas suficientes para un correcto diagnóstico y que incluso posibilitan la realización de estudios biomoleculares.
 - ii. Son seguras y más baratas que las técnicas de estadificación quirúrgica.
 - iii. Mejoran el rendimiento diagnóstico sobre otras pruebas mínimamente invasivas, y se convierten en la actualizad en las técnicas más precisas para la estadificación ganglionar del carcinoma broncogénico.
 - iv. Los cirujanos torácicos deben desempeñar un papel importante en la realización de estas técnicas.
 - v. Son técnicas en evolución, que mejorarán incluso su rendimiento en los próximos años.
- c. Por técnicas invasivas quirúrgicas. La mediastinoscopia ha sido y hasta cierto punto continúa siendo la técnica de elección para la estadificación ganglionar del CBNM. Decimos hasta cierto punto, porque en los últimos años, la evolución de las citadas técnicas invasivas no quirúrgicas está comenzando a desbancar a esta cirugía, de modo que, en centros hospitalarios que tratan de forma multidisciplinar el carcinoma broncogénico y cuentan con disponibilidad de dichas técnicas, el número de mediastinoscopias que se realiza es cada vez menor. Sin embargo, las guías clínicas actuales continúan refiriéndose a la mediastinoscopia como “estándar de oro” (62). De nuevo nos encontramos con una técnica operador-dependiente. Se considera que la mediastinoscopia de estadificación debe biopsiar al menos las regiones ganglionares 4R, 4L y 7 (ver nomenclatura en anexo III) para considerarla aceptable en la estadificación del CBNM. Es recomendable además incluir muestras de 2R y 2L (62, 63). Técnicas de linfadenectomía preoperatoria que alcanzan regiones ganglionares más distales, como son la Linfadenectomía Mediastínica Transcervical Extendida (TEMLA) y la Linfadenectomía Mediastínica Videoasistida (VAMLA) no son técnicas usadas de rutina en pacientes estándar, al menos en el momento actual. La sensibilidad de la mediastinoscopia para la estadificación ganglionar del CBNM oscila entre el 86 % y el 95 % en los estudios más recientes (63), con una precisión diagnóstica entre el 85 % y el 98 %. Un segundo concepto debe ser aquí tratado: el papel de la *remediastinoscopia*, es decir, la realización de una mediastinoscopia de reestadificación en pacientes en quienes una primera biopsia quirúrgica confirmó afectación tumoral N2, y el paciente ha recibido tratamiento neoadyuvante con intención de plantear una resección quirúrgica, previa confirmación de negativización de esas adenopatías mediastínicas. Aparte de las dificultades técnicas propias de toda reintervención, la sensibilidad cae hasta el 70 % (64), con valores predictivos negativos de entre el 52 % y el 85 % (63).

Teniendo en cuenta las herramientas de que se dispone para la estadificación del factor N en el CBNM, parece que la mejor combinación de ellas es la que indicamos en la figura 3, y que viene a resumir la recomendación de la Guía Clínica de Estadificación Preoperatoria del CBNM de la Sociedad Europea de Cirugía Torácica (ESTS).

Respecto a la **estadificación intraoperatoria**, también hay acuerdo en que debe ser lo más exhaustiva y precisa posible. Su objetivo es establecer un correcto pronóstico, definir la posible indicación de terapias adyuvantes

que lo mejore, y permitir una unidad de criterio entre los cirujanos a la hora de comparar pacientes (65).

Figura 3. Esquema de estadificación preoperatoria del CBNM. Adaptada de la Guía Clínica para la Estadificación Ganglionar Peroperatoria de la ESTS (62).



Sin embargo, en la práctica no hay homogeneidad en este sentido, pues incluso la terminología puede resultar poco clara. Un paciente con un estudio incompleto del mediastino tiene más posibilidades de ser un paciente incorrectamente estadificado, y por tanto introducir un sesgo de selección cuando se hacen estudios que suelen incluir un estadio determinado o que excluyen pacientes con o sin afectación ganglionar mediastínica. Por eso uno de los objetivos principales de la Sociedad Europea de Cirugía Torácica (ESTS) ha sido la de establecer definiciones precisas acerca de las distintas opciones de estudio intraoperatorio del mediastino en cirugía del CBNM. Así, en 2006 publicó su Guía Clínica para Estadificación Intraoperatoria del CBNM (66, 67), la cual fue asimilada por la IASLC. En ella, diferencia:

- a. Biopsia ganglionar selectiva, de una o más adenopatías de aspecto sospechoso, en uno o más territorios ganglionares. Solo está justificada cuando la lesión pulmonar se considera irreseca para confirmar que estamos antes un tumor con afectación N1 o N2.
- b. Muestreo ganglionar (o sampling). Supone la extirpación de uno o más ganglios sospechosos en base a pruebas preoperatorias. En el muestreo sistemático se biopsian ganglios de una serie de territorios previamente definidos por el cirujano, independientemente de si resultan sospechosos o no.

- c. Dissección ganglionar sistemática. Supone la resección de todo el tejido mediastínico que contiene ganglios, es decir, incluye todas las estaciones ganglionares mediastínicas además de hiliares e intrapulmonares. En el lado derecho exige en el mediastino superior la extirpación de todo el tejido linfático en un área limitada caudalmente por la raíz del lóbulo superior derecho, cranealmente por la arteria innominada, anteriormente por la vena cava superior y posteriormente por la tráquea. En el lado izquierdo, en el nivel superior del mediastino, la dissección ganglionar incluye todo el tejido en el área entre el nervio frénico por delante, el vago por detrás, el borde superior del cayado aórtico por arriba y el bronquio principal izquierdo por abajo. En cualquiera de los dos lados se debe extirpar todo el tejido subcarinal, periesofágico y del ligamento pulmonar inferior.
- d. Dissección ganglionar radical. Añade a la anterior, en el lado izquierdo, la sección del *ductus* entre el arco aórtico y la arteria pulmonar para acceder y resear el tejido linfático paratraqueal izquierdo alto y bajo (regiones 2L y 4L).
- e. Dissección ganglionar específica de lóbulo. Incluye el tejido ganglionar de una serie de estaciones definidas en función de la localización del tumor y los patrones de drenaje linfático del parénquima pulmonar. Se acepta en determinados pacientes como son aquellos con tumores epidermoides periféricos en estadio T1, pues la probabilidad de infraestadificarlos con este tipo de dissección es inferior al 5 %.

El Grupo Cooperativo del Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (GCCB-SEPAR) estableció una serie de recomendaciones en este sentido: si intraoperatoriamente se podía descartar la afectación N1 (con muestras intraoperatorias de adenopatías interlobares e hiliares), la linfadenectomía podía restringirse a las regiones definidas en función de la localización del tumor (68), de la siguiente manera:

- Lóbulos superior y medio derechos: regiones 2R, 4R y 7
- Lóbulo inferior derecho: regiones 4R, 7, 8 y 9
- Lóbulo superior izquierdo: regiones 5, 6 y 7
- Lóbulo inferior izquierdo: regiones 7,8 y 9.

Pese a los intentos por homogeneizar esta terminología, distintos equipos quirúrgicos hablan de linfadenectomía mediastínica sistemática o dissección ganglionar sistemática del mediastino refiriéndose indistintamente a la que aquí hemos definido como tal y al muestreo ganglionar sistemático. Existe el riesgo de que pacientes supuestamente estadificados con la misma técnica realmente no lo hayan sido y la comparación entre ambos en términos de supervivencia, tasas de recurrencia y resultados quirúrgicos esté sesgada.

Varios estudios han tratado de comparar la dissección ganglionar sistemática (DGS) y el muestreo sistemático (MS). Los metaanálisis de Manser (69) y Wright (70) publicados en 2005 y 2006 respectivamente, concluyen que la supervivencia y la tasa de recidiva son significativamente mayores en pacientes sometidos a DGS que en quienes se hizo una MS. En el ensayo clínico de Wu (71) aparecen diferencias en cualquier estadio, es decir, no solo en estadios precoces que supuestamente hubiesen sido infraestadificados. En otros estudios las diferencias difieren

entre estadios. El ensayo clínico randomizado publicado en 2011 llevado a cabo por el American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG) (72), analiza un total de 1111 pacientes en estadios precoces muy bien seleccionados. Durante la resección quirúrgica fueron randomizados a DGS o MS. No se encontraron diferencias en términos de supervivencia ni tasas de recidiva. Respecto a la precisión diagnóstica, no está claro que la DGS aumente la sensibilidad en la detección de enfermedad N2 con respecto al MS. Sin embargo, sí parece que establece mejor el número de estaciones ganglionares afectadas, es decir afina más en el tipo de enfermedad N2 que tiene el paciente, lo cual, en los últimos años ha demostrado ser importante de cara al pronóstico y el tratamiento multidisciplinar más adecuado (73). En otros estudios como el de Wu, sí hubo diferencias en la capacidad de detección del N2 intraoperatorio (71).

1-7. TRATAMIENTO DEL CBNM

1-7.1. Introducción

Como en la mayor parte de procesos oncológicos las armas terapéuticas de las que clásicamente se dispone para el tratamiento son la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. De ellas, la resección quirúrgica completa es la que ofrece más probabilidades de curación, quizá la única. En pacientes potencialmente resecables en que la cirugía no es posible por el alto riesgo quirúrgico, la radioterapia con intención radical en sus diferentes modalidades puede ser una alternativa terapéutica con unos resultados a veces equiparables.

La quimioterapia en monoterapia rara vez es curativa, aunque en los últimos años encontramos respuestas terapéuticas francamente prometedoras.

En muchos casos el tratamiento del CBNM pasa por la combinación de estas herramientas terapéuticas utilizadas en distinto orden en función del estadio, que es el principal factor determinante de la estrategia terapéutica a utilizar.

1-7.2. Cirugía del carcinoma broncogénico no microcítico

En Anexo I realizamos un pequeño recorrido por el origen y devenir de la cirugía del tórax como disciplina y bastante recientemente de la cirugía torácica como especialidad.

1-7.2.1. Consideraciones preoperatorias

Pese a la mejoría en los tratamientos no quirúrgicos, la resección completa continúa siendo la única opción potencialmente curativa en el cáncer de pulmón. Plantear cirugía a pacientes considerados de alto riesgo operatorio se convierte en algunos casos en un reto. La European Society of Thoracic Surgery (ESTS) y la European Respiratory Society (ERS) han publicado recientemente una guía clínica para la evaluación de la función cardiorrespiratoria previa a un tratamiento radical (quirúrgico o quimiorradioterápico) (74). Primero se llevaría a cabo una valoración cardiológica clínica básica, utilizando pruebas no invasivas si procede. Pacientes con bajo riesgo car-

diológico o convenientemente tratados pasan a la evaluación de la función pulmonar. En todos los casos debe realizarse una espirometría con estudio de difusión. El volumen espiratorio en el primer segundo (FEV1) y el cálculo del FEV1 predicho postoperatorio (ppo-FEV1) son los parámetros más utilizados. Independientemente de su resultado se debe realizar un test de difusión de monóxido de carbono (DLCO) en todos los pacientes. La predicción postoperatoria de los distintos parámetros se hace calculando el número de segmentos pulmonares que se van a resear. La realización de gammagrafía pulmonar cuantificada de ventilación y/o perfusión se reserva a casos límite o ante la previsión de realización de una neumonectomía. Los tests de esfuerzo están indicados en pacientes con FEV1 o DLCO por debajo del 80 % de los valores normales calculados por edad, peso y talla. El cálculo o estimación del consumo de oxígeno máximo (VO2 máximo) se ha relacionado con el riesgo quirúrgico (75). La prueba más básica sencilla y que ha superado en valor predictivo incluso al test de la marcha (distancia en metros o seis minutos de marcha) es la desaturación asociada a subir escaleras. Varios estudios llevados a cabo por Brunelli llegan a interesantes conclusiones en este sentido, hasta el punto de que la capacidad de subir escaleras en el preoperatorio condiciona de forma independiente el pronóstico en pacientes en estadio I (76-79). Se ha establecido una altura de 22 metros por debajo de la cual los riesgos de complicaciones postquirúrgicas son significativamente mayores.

Distintos estudios han demostrado que la *rehabilitación respiratoria* antes de la resección pulmonar y en el postoperatorio inmediato mejora los resultados quirúrgicos y disminuye los riesgos. Se desarrolla así un programa basado en ejercicios que permiten aprender técnicas de control de la ventilación, entrenar la musculatura respiratoria, proporcionar la máxima higiene posible al árbol bronquial, corregir las posturas antiálgicas y obtener un cierto grado de relajación. Todo ello posibilita una movilización precoz tras la cirugía y facilita los cambios posturales que debe adoptar el paciente durante el postoperatorio. Esto conlleva una disminución del dolor, así como una menor incidencia de atelectasias e infecciones respiratorias. Estos programas han demostrado mejorar el valor preoperatorio de consumo máximo de oxígeno y disminuir el riesgo de atelectasia postoperatoria, el decremento en los volúmenes pulmonares y la estancia hospitalaria (80-82). También se recomienda un programa de deshabituación tabáquica, porque parece que dejar de fumar al menos tres semanas antes de la cirugía disminuye el riesgo de complicaciones postoperatorias (82).

Los parámetros que hemos descrito no se correlacionan con los análisis de calidad de vida de los pacientes con cáncer de pulmón. Estos pacientes deberían recibir una evaluación preoperatoria de calidad de vida con tests que miden parámetros específicos y que deben ser realizados por profesionales en esta materia (83). Asimismo durante el postoperatorio inmediato y el seguimiento los parámetros relacionados con la calidad de vida están demostrando ser muy representativos de la situación no solo psíquica sino también respiratoria de los pacientes (84, 85).

1-7.2.2. Técnicas quirúrgicas.

¿Cuáles son los tipos de resección que se realizan en la actualidad en la cirugía del cáncer de pulmón? La técnica de elección clásica, como hemos visto, es la lobectomía por medio de una toracotomía que permita el acceso a la cavidad torácica a través del quinto espacio intercostal. La neumonectomía fue la técnica de elección hasta la década de 1950, si bien hoy se reserva para aquellos casos en los que una lobectomía o una resección en

manguito o “*sleeve*” no permiten una resección completa del tumor. La bilobectomía lógicamente solo puede ser derecha, e incluye la lobectomía del lóbulo medio junto con la lobectomía del lóbulo superior o inferior. La segmentectomía típica o anatómica consiste en la resección de uno o más segmentos pulmonares mediante disección y ligadura de sus estructuras broncovasculares específicas. La segmentectomía atípica consiste en la resección de una porción de parénquima pulmonar sin ligadura de sus ramas broncovasculares, y debería reservarse únicamente para aquellos casos de cáncer de pulmón con una función pulmonar tan comprometida que no permita la realización de una lobectomía o una segmentectomía anatómica. Más adelante se discutirá el papel de la segmentectomía típica en el tratamiento del cáncer de pulmón con respecto a la lobectomía. Las lobectomías en manguito o “*sleeve lobectomy*” constituyen una técnica más dificultosa puesto que implican la realización de una lobectomía y una anastomosis, ya sea vascular, bronquial o ambas, de forma que se preserve tejido pulmonar para evitar la realización de una neumonectomía. Por ejemplo, un tumor situado en un bronquio segmentario del lóbulo superior derecho y que protruye al bronquio principal derecho, podría beneficiarse de la realización de una lobectomía superior derecha con implante posterior del bronquio intermediario a la raíz del bronquio principal derecho, cerca de la carina. La cirugía del cáncer de pulmón ha de completarse, como hemos dicho previamente, con la realización de una linfadenectomía mediastínica que permita estadificar de la forma más correcta la enfermedad.

Como hemos dicho, en los últimos años se ha desarrollado una serie de procedimientos mínimamente invasivos para la realización de las distintas técnicas de resección pulmonar, como son la cirugía del cáncer de pulmón por toracoscopia y la cirugía robótica. La lobectomía por toracoscopia fue descrita por primera vez en 1991, y desde entonces, numerosos grupos desarrollan esta técnica para determinados casos de cáncer de pulmón. Una revisión sistemática llevada a cabo recientemente incluyendo 39 estudios concluye que la lobectomía toracoscópica se asoció a una menor estancia hospitalaria, menor tiempo de drenaje torácico e incluso mejores resultados en términos de supervivencia, si bien es cierto que hasta el momento de dicha publicación los casos en que se realizaba este abordaje estaban seleccionados en la mayoría de las series (86). En muchos centros comienza a convertirse en el *gold standard* de la cirugía oncológica pulmonar. Menos experiencia existe con la cirugía robótica en el cáncer de pulmón, aunque los estudios publicados hasta ahora hablan de una mejor visibilidad y precisión que con la toracoscopia clásica (87). Los estudios prospectivos actualmente en marcha permitirán comparar realmente el papel de estas vías de abordaje en los resultados de la cirugía de resección pulmonar.

Independientemente de la vía de abordaje, existe claro consenso en los criterios que debe cumplir una resección quirúrgica de un cáncer de pulmón para considerarse completa, es decir R0, definidos por Rami-Porta y colaboradores (88):

- a) Confirmación microscópica de márgenes libres de tumor
- b) Disección ganglionar sistemática del mediastino
- c) Ausencia de invasión extracapsular en las adenopatías infiltradas por tumor
- d) Confirmación de que la adenopatía reseada más distal no presenta afectación tumoral.

1-7.2.3. Tratamiento por estadios

El papel de la cirugía varía en función del estadio tumoral, por lo que haremos una breve aproximación a las

distintas posibilidades que suelen presentarse en la práctica clínica.

Partimos de la base de que todos los casos deben ser valorados por un equipo de cirujanos torácicos con experiencia en cirugía oncológica y que los casos en que la indicación es dudosa deben ser evaluados en comités de tumores que incluyan distintos especialistas implicados, de cara a plantear un tratamiento multidisciplinar si procede.

ESTADIO I

En muchas ocasiones se trata de pequeños nódulos encontrados de forma casual en el estudio de otra patología o hallados incidentalmente en estudios radiológicos rutinarios. En el caso de nódulos periféricos de pequeño tamaño, algunos autores han defendido una resección menor (segmentectomía típica o atípica) con la finalidad de preservar mayor cantidad de tejido pulmonar obteniendo la misma supervivencia a largo plazo (89, 90). Un estudio publicado por el Lung Cancer Study Group (LCSG) sugiere que existe hasta tres veces más riesgo de recidiva local en estos casos (91). El estudio que ofrece el mejor nivel de evidencia es el metaanálisis desarrollado en Japón por Nakamura y colaboradores, que incluye estudios con al menos dos años de seguimiento, con un total de casi tres mil pacientes (92), sin que apareciesen diferencias significativas en la supervivencia. Es por ello que puede recomendarse la resección sublobar en pacientes con tumores periféricos menores de 2 cm sin afectación ganglionar mediastínica (grado de recomendación 1B) (93). Con los datos de que disponemos en la actualidad podemos decir que la resección en cuña o segmentectomía atípica es aceptable en pacientes con nódulos periféricos menores de 2 cm (T1a) o con imagen en vidrio deslustrado o *ground glass opacity (GGO)*. Sin embargo, el grado de esta recomendación es bajo (2D) (94). La segmentectomía anatómica se acepta en pacientes con nódulos de 2-3 cm de diámetro (T1b) si los márgenes son superiores a 1 cm, o bien en pacientes con mala función pulmonar en estadio I. El antecedente de una lobectomía también parece razón suficiente para evitar una nueva lobectomía. De nuevo son recomendaciones de poco peso (grado de recomendación 2D) (94, 95).

En otras ocasiones se trata de nódulos pequeños más centrales, que normalmente requieren una lobectomía o incluso una neumonectomía para conseguir una resección completa. Es aquí donde encuentran su mayor sentido esas técnicas quirúrgicas descritas con el fin de evitar resecciones mayores no necesarias desde el punto de vista oncológico (sobre todo con el fin de evitar neumonectomías), como es la *sleeve lobectomy* (96). De los aspectos relacionados con la estadificación ganglionar mediastínica intraoperatoria ya hemos hablado previamente.

La supervivencia a cinco años del CBNM en estadio I tras la resección quirúrgica es elevada (entre un 55 % y un 85 % según distintas series publicadas). No suele ofrecerse tratamiento complementario a estos pacientes. Sin embargo, las últimas ediciones de la guía clínica de la *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* recomiendan el tratamiento quimioterápico adyuvante en pacientes con tumores reseados en estadio Ib con alguno de los siguientes factores de riesgo (97):

- Diámetro mayor de 4 cm
- Invasión vascular
- Márgenes de resección al límite
- Invasión de la pleura visceral

- Resección en cuña
- Tumores pobremente diferenciados
- Falta de correcta estadificación ganglionar mediastínica (Nx)

ESTADIO II

Los casos T1-2N1 suponen una minoría entre todos los pacientes con CBNM (5 – 10 %). La mayor parte de estos casos son subsidiarios de una resección quirúrgica tipo lobectomía, siendo especialmente importante establecer una correcta estadificación ganglionar. Además, diversos estudios han establecido que la supervivencia a 5 años de la cirugía en estos pacientes es peor cuanto mayor es el número de adenopatías afectadas (45 % en casos con una única adenopatía vs. 31 % en casos de múltiples adenopatías) (98). Las recurrencias en estos casos consisten en muchas ocasiones en una única metástasis a distancia. Sin embargo, el papel de la quimioterapia no está aún bien establecido. Algunos estudios hablan de una posible mejora en la supervivencia (de hasta el 5 %) tras un tratamiento neoadyuvante con quimioterapia seguido de cirugía (99-101).

Los casos T3N0 con invasión de la pared torácica pueden someterse a una resección quirúrgica con márgenes libres en la gran mayoría de las ocasiones, alcanzando una supervivencia a 5 años tras la cirugía de entre el 35 % y el 50 % según distintas series (102, 103). El factor pronóstico más importante en estos casos es la resección completa del tumor con bordes libres de enfermedad. En ocasiones son necesarias técnicas reconstructivas de la pared costal con injertos musculares o materiales protésicos, con mayor frecuencia en los defectos anteriores y laterales y en grandes defectos posteriores de la pared que provocan un hundimiento de la escápula (104). La radioterapia postoperatoria tiene aquí una de sus posibles indicaciones (105).

Los tumores del sulcus superior, según una reciente y renovada definición, son aquellos tumores que invaden la pleura parietal o la pared torácica a nivel de la segunda costilla o por encima de ella (106). Queda, por lo tanto, abandonada la definición del tumor del sulcus superior como aquel tumor que produce un Síndrome de Pancoast-Tobías, derivado de la invasión de las estructuras vasculares, nerviosas y musculares del *inlet* torácico. Debido a que hasta un 3 % - 5 % de estos tumores tienen histología de carcinoma de células pequeñas, es especialmente importante la confirmación histológica previa antes de plantear la modalidad terapéutica a seguir. Los mejores resultados se han obtenido con el tratamiento trimodal (107): quimio-radioterapia neoadyuvante seguida de tratamiento quirúrgico en los casos en que se puede conseguir una resección completa del tumor, lo que ocurre en aproximadamente un 75 % de todos los tumores del *inlet* torácico (107-109). Con esta estrategia terapéutica la supervivencia a 5 años alcanza hasta un 40 % – 53 % en los casos de resección completa con adenopatías negativas.

Los tumores T3N0 que están a menos de 2 cm de la carina sin invadirla pueden someterse en muchas ocasiones a una resección quirúrgica, con una supervivencia a 5 años del 35 %. Aunque en la mayoría de las ocasiones la técnica quirúrgica realizada es una neumonectomía, existen casos seleccionados en los que se puede realizar una *sleeve lobectomy*, con unos resultados de morbimortalidad similares a la neumonectomía, pero preservando mayor cantidad de tejido pulmonar (110), lo cual disminuye los riesgos a medio plazo.

ESTADIO IIIA

Constituido según la nueva clasificación TNM por los tumores T3N1M0, (poco frecuentes en la práctica y que se suelen manejar como los T3N0M0), los tumores con ganglios mediastínicos ipsolaterales positivos (T1-3N2M0), y los T4N0-1M0 (con características propias y que pertenecían en la clasificación previa al estadio IIIB).

Tumores T1-3N2M0

La supervivencia global de estos tumores es del 20 % – 30 %. Se han descrito factores que la pueden aumentar, como son la resección completa, la afectación de una única estación ganglionar (111), la afectación nodal sin invasión extracapsular o la afectación de regiones ganglionares mediastínicas inferiores, aunque ninguno de ellos ha mostrado evidencia suficiente como para establecer pautas protocolizadas de actuación. Algunos autores clasifican el N2 en varios subgrupos (112):

1. N0 clínico que resulta ser N2 postquirúrgico. Identificar estos casos es fundamental, por lo que se vuelve a hacer hincapié en la importancia de la disección ganglionar mediastínica sistemática.
2. Hallazgo de enfermedad N2 en el campo quirúrgico, que no contraindica seguir adelante con la resección si ésta es posible (113). Sin embargo se ha comprobado una disminución estadísticamente significativa de la supervivencia en este subgrupo de pacientes si la técnica quirúrgica es una neumonectomía (114).
3. N2 detectado preoperatoriamente en un tumor potencialmente reseccionable. No está indicada la cirugía en pacientes N2 clínicos. Sin embargo, la terapia neoadyuvante logra en un porcentaje de casos que varía dada la heterogeneidad de los pacientes N2, un “downstaging” o erradicación tumoral del mediastino que permite supervivencias prolongadas tras resección quirúrgica completa. En este grupo de pacientes es importante la estadificación mediastínica antes y después de la terapia de inducción (quimioterapia o quimiorradioterapia). Como ya hemos visto, y se está convirtiendo en la tendencia actual con las herramientas de estadificación de que disponemos, se recomienda utilizar técnicas invasivas no quirúrgicas (EUS – FNA o EBUS – FNA) en la estadificación inicial y reservar la mediastinoscopia para la reestadificación tras la neoadyuvancia. Una segunda mediastinoscopia, como ya hemos explicado, además de tener más riesgo quirúrgico, ofrece una menor sensibilidad en la detección de enfermedad mediastínica residual, aunque este aspecto todavía hoy continúa siendo objeto de debate, debido una vez más a la gran heterogeneidad en este grupo de pacientes (115-117). Una prueba más de esta heterogeneidad: Cerfolio y colaboradores han propuesto recientemente reseccionar tumores en casos N2 clínicos que tras la terapia de inducción siguen teniendo enfermedad mediastínica en aquellos casos en que las adenopatías han disminuido en tamaño o en valor del SUV (*standard uptake value*) en la PET un 70 % o más, el paciente es joven, con buen Performance Status, la afectación nunca fue multiestación y es posible una resección completa (R0) sin necesidad de neumonectomía (118). Desde el punto de vista de la intervención quirúrgica, la terapia de inducción aumenta la dificultad técnica de la resección, si bien este dato es difícilmente medible en términos objetivos. Las grandes revisiones hechas al respecto no encuentran un incremento significativo de morbilidad quirúrgica en pacientes que han recibido neoadyuvancia. Una excepción es la neumonectomía (sobre todo la derecha), técnica que sí se ha asociado a un aumento de la morbilidad

postoperatoria (incluyendo la tan temida fístula del muñón bronquial) tras quimioterapia con o sin radioterapia asociada (119-121).

4. El último grupo sería el N2 multiestación o el N2 bulky, en que la cirugía no está indicada.

Tumores T4N0-1M0

La inclusión de este grupo de tumores en el estadio IIIA en la nueva clasificación de la UICC viene dada por la diferencia clara en supervivencia y en abordaje entre los pacientes T4 y los N3. Además, como ya hemos visto, desaparece de la denominación T4 el segundo nódulo en el mismo lóbulo, que pasa a ser T3, y el derrame pleural maligno que pasa a ser M1a. Nos quedan dos subgrupos de T4, que pasamos a analizar:

Presencia de un segundo nódulo tumoral en otro lóbulo homolateral. Es un grupo difícil de analizar, porque hasta el momento, pese a las técnicas de caracterización biomolecular disponibles, a priori, siendo del mismo tipo histológico, no es posible saber si se trata del mismo tumor o de un segundo primario (122). Es más frecuente que el hallazgo sea quirúrgico, en pacientes en estadio clínico I ó II. Y de ser conocido previamente tampoco es habitual disponer de diagnóstico de malignidad de ambas lesiones, por lo que en general está indicada la resección quirúrgica.

Tumor que invade mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, carina, esófago, o cuerpo vertebral. También se trata de un grupo heterogéneo de tumores, condicionado sobre todo por la capacidad de reseca el tumor de forma completa, lo cual define a la postre el pronóstico de los pacientes. La cuestión es: ¿se puede definir preoperatoriamente la reseabilidad de un tumor sobre el que hay dudas acerca de si infiltra el miocardio, la aorta, un cuerpo vertebral, etc.? La respuesta es muy dependiente de la interpretación de las técnicas de imagen y por supuesto del cirujano. Es indudable la necesidad de individualizar cada caso en este grupo de pacientes. Cada uno de ellos supone un reto porque la resección completa puede ser la única opción potencialmente curativa. Es difícil equilibrar la balanza entre pacientes con tumores que podrían ser completamente reseables y se desestiman para cirugía y aquéllos sometidos a una toracotomía exploradora. Incluso Grunewald y Le Chevalier propusieron ya en 1997 una subclasificación de estos T4, diferenciando los potencialmente reseables en casos seleccionados (invasión de vena cava superior, aurícula izquierda, carina, tráquea y grandes vasos) de los irreseables (resto de cavidades cardíacas, esófago y vértebra) (123). El tratamiento neoadyuvante ha demostrado una reducción del tamaño tumoral en algunos casos, facilitando la resección. Sin embargo, estas resecciones ampliadas tras tratamiento de inducción parecen tener una mayor morbilidad quirúrgica, sobre todo en neumonectomías, que constituyen una proporción relativamente amplia de T4 por la localización central de estos tumores. Sin embargo hay pocos autores que analicen de forma autónoma los resultados de la neoadyuvancia de forma específica sobre pacientes T4N0-1. La mayoría se analizan en estudios que incluyen pacientes IIIA-N2, sustancialmente distintos (124, 125). En general se describen tasas de reseabilidad tras quimioterapia de 45 – 65 %, con supervivencias a 5 años de 40 % – 50 % en tumores completamente resecaos (significativamente superior respecto de pacientes no completamente resecaos).

Entre las resecciones pulmonares extendidas más frecuentes destacan:

Neumonectomías con resección de carina, que implican una anastomosis del árbol bronquial de alto riesgo de

dehiscencia. Las series más numerosas, que sumaban hasta 2008 un total de 874 casos describen una mortalidad operatoria media de $10,4 \pm 11,63\%$ (4% - 40%), y una tasa de supervivencia a 5 años del $25,6\% \pm 15,2\%$ (13% - 51%), si bien son series heterogéneas (126).

Resecciones de vena cava superior, que pueden ser parciales, si la infiltración no supera un 30% del vaso, o precisar una reconstrucción completa con prótesis con clampaje vascular proximal y distal al tumor. Las principales series describen una mortalidad quirúrgica de en torno a un 12% y una morbilidad del 30%, con supervivencias a 5 años de 21% - 24% (127, 128).

Resecciones de aurícula izquierda, aorta y arteria pulmonar principal. No hay datos firmes respecto a estos casos límite. Se describen generalmente como casos aislados, incluso con la utilización de circulación extracorpórea durante la resección, pero la alta morbimortalidad y la falta de evidencia acerca de la mejora en la supervivencia de estos pacientes respecto a otros tratamientos hacen muy difícil sentar la indicación quirúrgica en estos casos extremos, cuyo análisis desborda los objetivos de esta introducción.

ESTADIO IIIB

Según la nueva clasificación UICC7 incluye los tumores T4N2M0 y los N3. Aquí la cirugía no está indicada en general.

ESTADIO IV

Presencia de otro nódulo contralateral (M1a), derrame pleural o pericárdico maligno (M1a) o metástasis a distancia (M1b).

Nódulos contralaterales. Sea homo o contralateral, la presencia de un segundo nódulo sincrónico a un carcinoma broncogénico no microcítico es de difícil valoración. Es frecuente que en el caso de un nódulo contralateral, se proceda a la resección quirúrgica del tumor diagnosticado y seguimiento del otro nódulo. Si no hay afectación ganglionar mediastínica (más aún si el nódulo contralateral es único) la probabilidad de que se trate de un segundo tumor y no una metástasis, aumenta, por lo que está indicado el abordaje contralateral con fines diagnóstico-terapéuticos. En caso de afectación N2, la alta probabilidad de enfermedad M1 contraindicaría la resección del nódulo contralateral.

Derrame pleural o pericárdico malignos. Se considera enfermedad extendida y no está indicada la resección quirúrgica.

Metástasis a distancia. El papel de la cirugía queda limitado a situaciones en que se pueda resear potencialmente toda la enfermedad:

Metástasis cerebral: aunque no es frecuente, ante la existencia de una metástasis cerebral única sincrónica en el CBNM reseable sin afectación ganglionar mediastínica y sin extensión a otros niveles, puede estar indicada la resección quirúrgica del tumor primario y la cirugía o radioterapia estereotáctica de la lesión intracraneal.

Metástasis suprarrenal: En pacientes con una metástasis suprarrenal sincrónica reseable de un CBNM no N2 completamente reseado, se recomienda con buen nivel de evidencia científica la suprarrenalectomía (129). No hay evidencia de supervivencias prolongadas en intento de resección quirúrgica de carcinomas broncogénicos con enfermedad metastásica a otros niveles.

1-7.2.4. Cirugía de la recidiva del CBNM

La recidiva de un CBNM completamente reseado suele aparecer en los primeros dos años de seguimiento. Es más frecuente la recidiva a distancia (metástasis cerebrales, óseas, hepáticas o pulmonares) que la loco-regional. Es difícil distinguir entre la persistencia de enfermedad (infraestadificación en el momento de la resección del tumor primario), la recidiva de la enfermedad y la aparición de un segundo tumor. La aparición de una nueva lesión localizada y reseable en un paciente operable no contraindica una segunda intervención quirúrgica y un manejo igual que si se tratara de un segundo primario.

1-7.3. Quimioterapia adyuvante en el carcinoma broncogénico no microcítico

Incluso tras obtener una resección completa, la supervivencia a 5 años en el CBNM desde el momento de la cirugía es bastante desalentadora, y oscila entre el 67 % del estadio IA y el 23 % del estadio IIIA. La mayoría de las recidivas se producen a distancia, lo que sugiere la existencia de enfermedad micrometastásica no detectada en el momento del diagnóstico. Para su erradicación, desde los años 80 se ha estudiado el papel de la quimioterapia y la radioterapia preoperatoria (neoadyuvante) y postoperatoria (adyuvante), con el objetivo de disminuir la frecuencia de recidivas e incrementar con ello la supervivencia.

Hasta hace poco tiempo, el papel de la quimioterapia adyuvante en los estadios I-IIIa era incierto. Varios pequeños ensayos clínicos fallaron al intentar demostrar un beneficio significativo en supervivencia y los grandes ensayos clínicos llevaban a resultados a veces contradictorios. En el año 1995 se publicó el primer gran metaanálisis realizado a partir de datos individuales de pacientes incluidos en ensayos clínicos que comparaba cirugía sola con cirugía seguida de quimioterapia (*non-small cell lung cancer collaborative group*) (130). En él se sugería que la quimioterapia basada en cisplatino podía aportar un beneficio absoluto en supervivencia global de un 5 % a los 5 años. Sin embargo, la diferencia en supervivencia resultó no significativa. Por ello, durante la década siguiente se llevaron a cabo varios grandes ensayos clínicos aleatorizados con quimioterapia basada en regímenes con cisplatino que confirmaron esta hipótesis (97, 131, 132). Los ensayos IALT (101), JBR10 (133) y ANITA (134) muestran una reducción del riesgo de muerte a 5 años del 14 % al 31 % con la administración de 4 ciclos de quimioterapia adyuvante basada en cisplatino. Y los diferentes metaanálisis realizados parecen confirmar este beneficio. Sin embargo, el efecto del tratamiento sobre la supervivencia parece ser heterogéneo entre los diferentes estadios. En el estadio IA, la quimioterapia adyuvante no está recomendada. Existe poca información disponible debido a que estos pacientes fueron excluidos de la mayoría de los estudios. Y en el metaanálisis LACE (*Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation*) (135) los 37 pacientes incluidos con tumores en estadio IA mostraron tendencia a una peor supervivencia tras recibir quimioterapia frente a cirugía sola. Para los pacientes en estadio IB, la mayoría de estudios no ha encontrado un beneficio estadísticamente significativo. En un análisis exploratorio realizado por los investigadores del CALGB (*Cancer and Leukemia Group B*) se encontró un beneficio estadísticamente significativo entre los pacientes en estadio IB en el subgrupo de tumores de tamaño mayor o igual a cuatro centímetros (97). Ya hemos visto que en la última clasificación TNM el estadio IB está subdividido según el tamaño del tumor, por lo que el papel de la quimioterapia adyuvante podrá ser estudiado prospectivamente, como de hecho se

está haciendo en la actualidad, de acuerdo con esta nueva clasificación. En el metaanálisis LACE los 1371 pacientes con estadio IB muestran una reducción no significativa de la mortalidad de un 8 %. De momento estos resultados no permiten generalizar el uso de quimioterapia adyuvante en el estadio IB. Por el contrario, los datos disponibles respecto al uso de quimioterapia adyuvante en los estadios II y IIIA sí son concluyentes. Los ensayos IALT, JBR10 y ANITA demuestran un beneficio estadísticamente significativo en ambos estadios. El metaanálisis LACE mostró una reducción del riesgo de muerte del 17 % también para ambos estadios. Por tanto, tal y como reflejan las principales guías clínicas y consensos internacionales (136), se recomienda el uso de quimioterapia adyuvante basada en cisplatino para los pacientes con estadios II y IIIA.

El efecto que el perfil genético del tumor parece tener sobre el beneficio de los diferentes fármacos utilizados con fines adyuvantes, ha llevado al Grupo Español de Cáncer de Pulmón a desarrollar en estudio en fase III (SCAT) de quimioterapia adyuvante en casos de CBNM reseca con afectación ganglionar N1 y/o N2 que no habían recibido tratamiento previo a la cirugía (generalmente porque se desconocía tal afectación mediastínica). Estos pacientes se randomizan en dos ramas de tratamiento adyuvante, con diferentes fármacos en función de la expresión en la pieza reseca de los genes ERCC1 y BRCA1. En el momento actual ha terminado la fase de reclutamiento de pacientes y pronto se podrá disponer de resultados en términos de supervivencia global y libre de enfermedad.

1-7.4. Radioterapia adyuvante en el carcinoma broncogénico no microcítico

La radioterapia adyuvante no está indicada en estadios precoces completamente reseca. Incluso parece demostrar un efecto deletéreo (137). Esta conclusión, sin embargo, está basada en estudios antiguos, con métodos de radiación ya obsoletos, por lo que puede que la elevada toxicidad de la radioterapia de la época explique este efecto. En un análisis univariante para pacientes del ensayo ANITA (138) con afectación ganglionar positiva tras la resección quirúrgica, la radioterapia adyuvante mejoró las tasas de supervivencia tanto entre pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante como en los que no. Así, el papel actual de la radioterapia postoperatoria parece orientado a intentar actuar sobre el mediastino en pacientes reseca con afectación ganglionar N1 o N2, así como sobre áreas de resección incompleta microscópica o macroscópica en pacientes también reseca (afectación de pared torácica, fundamentalmente).

1-7.5. Neoadyuvancia en el carcinoma broncogénico no microcítico

Hace más de una década, varios pequeños ensayos aleatorizados mostraron un prometedor aumento de la supervivencia con el uso de quimioterapia preoperatoria frente a cirugía sola. Las ventajas teóricas atribuidas a este tratamiento, frente a la administración postoperatoria, son la posibilidad de obtener una regresión tumoral que facilite la resección quirúrgica, el tratamiento de forma precoz de las micrometástasis y la inhibición del potencial estímulo de crecimiento que las células tumorales encontrarían tras la liberación de factores de crecimiento durante la cirugía y la cicatrización de la herida. En consecuencia, durante la década de los 90 el diseño de varios gran-

des ensayos clínicos en CBNM se focalizó en el uso de la quimioterapia preoperatoria. Burdett en 2006 realizó un metaanálisis sobre los datos de siete ensayos en el que concluía que la quimioterapia preoperatoria proporcionaba una disminución del riesgo de muerte del 18 %, lo que suponía un beneficio absoluto en la supervivencia a 5 años de un 6 % (139). Sin embargo, la publicación en el año 2007 del gran ensayo clínico aleatorizado MRC-LU22 (99) con resultado negativo, junto con la consiguiente actualización del metaanálisis, con una nueva tasa de riesgo de 0,88 ($p=0,07$) no despeja las dudas existentes sobre la eficacia de esta estrategia terapéutica. En la actualidad la administración de quimioterapia de inducción se utiliza, como ya hemos mencionado en pacientes en estadio IIIA por N2, con el objetivo de negativizar el mediastino y valorar un rescate quirúrgico, así como en pacientes con gran masa o con algún tipo de afectación T4, con el fin de que la disminución del volumen tumoral permita resecciones quirúrgicas más económicas y con más posibilidad de ser completas sacrificando la menor cantidad posible de pulmón y tratando de evitar, ante todo, la realización de una neumonectomía. En estos casos de afectación T4 la radioterapia, generalmente combinada con quimioterapia, ha demostrado buenos resultados a la hora de favorecer la reseabilidad del tumor (140). Las dosis totales óptimas de radiación que ofrezcan un máximo beneficio sin suponer un incremento inaceptable del riesgo de complicaciones postoperatorias son ahora objeto de debate.

1-7.6. Nuevas estrategias en el tratamiento del CBNM. Dianas terapéuticas.

En los últimos años se ha producido un significativo avance en la interpretación de las alteraciones a nivel celular y molecular que ocurren en el proceso de formación, crecimiento y extensión del cáncer. Se han descrito diferentes vías celulares o *pathways* responsables de distintos fenómenos oncogénicos. La hipótesis general de trabajo en este sentido plantea que si somos capaces de interrumpir pasos críticos en ese proceso de generación del cáncer a nivel celular y biomolecular podremos influir sobre dicho crecimiento y extensión. Hablaremos más adelante de estos aspectos genéticos y epigenéticos dentro del cáncer de pulmón. Aquí solo mencionaremos fármacos que se han ido desarrollando en los últimos años y que han presentado prometedores resultados en distintas fases de su investigación básica y clínica (141-143).

Inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

La sobreexpresión de EGFR en CBNM oscila entre un 40 y un 80 %, y se ha asociado con un peor pronóstico y con fenómenos de quimio y radorresistencia. El bloqueo de esta ruta de señalización constituye una estrategia validada en modelos preclínicos y en la clínica (144). Por su parte, las mutaciones a nivel de los exones 19 y 21 que aparece en torno a un 15 % de los adenocarcinomas, se correlaciona con buenas respuestas a fármaco inhibidores de la tirosinquinasa de EGFR. Destacamos:

Anticuerpos monoclonales, como el cetuximab o el panitumab, entre otros que están en desarrollo.

Inhibidores de la tirosin quinasa de EGFR (TKI), como el gefitinib y el erlotinib.

Agentes antiangiogénicos.

La angiogénesis constituye el proceso por el cual se desarrollan nuevos vasos a partir de un lecho vascular preexistente. Se ha asociado a la proliferación y extensión del tumor (145-147). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de fibroblastos (VFGV) y las angiopoyetinas son reguladores positivos de la angiogénesis. La trombostatina, angiostatina, endostatina y tumstatina son reguladores negativos.

Anticuerpos monoclonales, como el bevacizumab, que bloquea la unión del VEGF a su receptor, se utilizan ya de forma habitual en la clínica (148).

Inhibidores de la tirosín quinasa del VEGFR, como el vandetanib, el sunitinib y el sofebanib, todavía con menos experiencia clínica.

Inhibidores del factor de crecimiento insulínico (IGF).

Anticuerpos monoclonales, como el figitunumab, u otras moléculas como las pirropodofilinas, bloquean esta ruta de carcinogénesis y son actualmente objeto de estudio.

Otros:

Inhibidores de las metaloproteasas de la matriz

Inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDKs)

Inhibidores de la farnesil transferasa

Inhibidores del proteosoma, como el vortezomib

Inhibidores de las histonas, como el vorinostat

Vemos pues cómo en gran medida los avances más recientes en el tratamiento del CBNM pasan por detectar alteraciones biomoleculares carcinogénicas susceptibles de ser interrumpidas, bloqueadas o incluso reparadas. Sin embargo muchas de estas alteraciones moleculares en algunos casos parecen actuar no solo como posibles dianas terapéuticas, sino también como marcadores de la evolución del paciente y su enfermedad oncológica. Muchas de estas alteraciones nos pueden servir como factores pronósticos en pacientes que han recibido un tratamiento determinado de su enfermedad, y pueden ayudarnos a decidir hasta qué punto les resultará beneficioso un complemento añadido a ese tratamiento estándar. Sobre este aspecto, que nos conduce ya de forma directa a los objetivos de este estudio, pasamos a tratar en las próximas páginas.

1-8. PRONÓSTICO Y PATRONES DE RECIDIVA EN EL CARCINOMA BRONCOGÉNICO RESECADO EN ESTADIOS PRECOCES. SEGUIMIENTO.

1-8.1. Recidiva del CBNM

En medicina uno de los aspectos más complejos y discutidos es cómo hacer el seguimiento del paciente con

cáncer. Los pacientes con CBNM sometidos a un tratamiento radical potencialmente curativo, fundamentalmente quirúrgico, tienen un riesgo de un 1 % - 2 % anual de presentar un segundo primario, y hasta un 15 % anual de sufrir una recidiva de su tumor, si bien la distribución de la aparición de las mismas no es homogénea a lo largo del seguimiento, como tendremos la ocasión de analizar.

El objetivo de los programas de seguimiento en oncología es triple: monitorizar el tratamiento y sus efectos, detectar precozmente las recidivas y poder actuar precozmente si vuelve a parecer la enfermedad. Cada vez más tumores cuentan con segundas, terceras, cuartas líneas de tratamiento. Sin embargo, no queda claro, al menos en el cáncer de pulmón, si la detección precoz de las recidivas y la subsecuente instauración de un nuevo tratamiento influye en la supervivencia de los pacientes. Y mucho menos claro si un seguimiento intensivo puede influir sobre la calidad de vida del paciente y su estado psicológico.

Tampoco está claro quién debe realizar ese seguimiento. ¿El cirujano? ¿El oncólogo? En muchos centros se realiza en atención primaria, incluso en la consulta de enfermería, cuando no por vía telefónica por parte del propio paciente.

Calman y colaboradores (149) realizan una profusa revisión sistemática accediendo a más de veinte mil artículos potencialmente relacionados con el seguimiento en el carcinoma broncogénico. Finalmente, el número de trabajos que realmente analiza el papel de los programas de seguimiento en los pacientes tratados por cáncer de pulmón queda reducido a nueve. Entre sí son relativamente homogéneos en cuanto a lo que analizan (influencia de programas intensivos de vigilancia en la supervivencia del paciente), pero muy heterogéneos en cuanto a la estructuración de dichos programas. El caso es que no hay evidencia de que el tipo y frecuencia del seguimiento influya en la supervivencia. El sentido común nos lleva a plantearnos que habrá pacientes con determinadas características que tengan un mayor riesgo de progresar y en quienes por tanto habrá que hacer un seguimiento más intensivo (150).

¿Recidiva o segundo primario?

En muchos casos no lo vamos a saber. Martini en 1975 ya decía que tras la resección de un CBNM, la aparición de una nueva lesión a nivel pulmonar había que entenderla como un segundo primario si el tipo histológico era diferente o si siendo igual, el intervalo libre de enfermedad era inferior a 2 años, el hallazgo era de carcinoma in situ, o aparecía en un lóbulo distinto siempre y cuando no hubiera afectación por tumor de vasos linfáticos comunes a ambas localizaciones. Afortunadamente hoy la tipificación biomolecular de un tumor nos permite discriminar con mayor precisión en muchos casos (y siempre y cuando dispongamos de estudio histológico de ambas lesiones). Sin embargo, el alto coste de estos estudios no siempre queda justificado por la relevancia clínica de dicha distinción.

1-8.2. Pronóstico y seguimiento CBNM

El análisis de la supervivencia en el CBNM está basado en la clasificación TNM. De hecho parte de ella. Para el desarrollo de la última edición (en 2009, como ya hemos dicho) se utilizaron los datos de supervivencia del registro de la IASLC. Aunque la clasificación de los pacientes de este estudio se hizo con la edición previa del TNM, incluimos aquí los datos de supervivencia de la última edición, que nos dan una información más actualiza-

da. Cabe reseñar que hace referencia a supervivencia tras resección quirúrgica completa R0 (tabla 10).

Tabla 10.
Supervivencia en CBNM completamente reseado.
Tomado de Rami-Porta et al. (151)

Estadio	Supervivencia global a 5 años
IA (T1aN0)	77%
IA (T1bN0)	71%
IB (T2aN0)	58%
IIA (T2bN0)	49%
IIB (T3N0)	35%
IIA-B (TxN1)	38%

Seguimiento y evidencia científica

Entre un 0,6 % y un 12 % de pacientes con CBNM en estadios precoces completamente reseado son operados por segunda vez por evolución de su enfermedad. No hay evidencia de que la intensidad del seguimiento (que conllevaría una detección más precoz) conduzca a un incremento en este porcentaje de pacientes que se tratan de nuevo con intención curativa. Llama la atención incluso que más del 60 % de los pacientes que recidivaron se detectaron por la clínica y no por la prueba de revisión que les correspondía por protocolo. A partir del primer año este hecho no supuso una variación en la supervivencia con respecto a los pacientes detectados en fase asintomática. Hay muy pocos estudios que analicen el coste de estos seguimientos, pero sus conclusiones nos llevan a temas mucho más complejos como es medir el coste que supone cada año de vida ganado gracias al seguimiento.

¿Con qué pruebas hacemos el seguimiento?

La mayoría de esquemas de seguimiento se basan en la visita médica, con su correspondiente anamnesis y exploración física, junto con una prueba de imagen, bien la radiografía de tórax o bien la TC torácica (100). Ésta ha demostrado un valor predictivo negativo de hasta el 99 %, incluso con bajas dosis de radiación. El PET, la broncoscopia, los análisis de sangre (incluyendo la determinación de marcadores tumorales), no se incluyen en ninguna recomendación al respecto.

Encontramos una gran heterogeneidad entre los protocolos de cada centro (152). Variabilidad que se confirma incluso cuando hacemos referencia a las recomendaciones de las distintas guías clínicas existentes, y que resumimos en la tabla 11.

En pacientes con CBNM completamente reseado en estadios precoces, se han investigado factores que podrían aumentar el riesgo de recidiva o de aparición de segundos primarios.

Tabla 11. Esquemas de seguimiento propuestos tras la resección quirúrgica completa del CBNM

Guidelines	Esquema propuesto	Otras recomendaciones
ACCP	Rx o TC cada 6 meses durante 2 años	- Dejar de fumar - Equipo multidisciplinar
NCCN	TC y exploración cada 4-6 meses durante 2 años	- Dejar de fumar
NICE/SIGN	Exploración y Rx de tórax cada 6 meses durante 2 años	- Dejar de fumar - Implicar A. Primario
ESMO	Exploración y TC cada 6 meses (2 años) y seguir anualmente	- Dejar de fumar
ASCO	Exploración cada 3 meses (2 años) y luego cada 6 meses (5 años) y seguir anualmente	
ACR	Exploración cada 2-4 meses, Rx cada 6 meses, y TC anual (seguir hasta 5 años)	

Rx: Radiografía simple de tórax, TC: Tomografía computarizada

ACCP: American Colleges of Chest Physicians, NCCN: National Comprehensive Cancer Network, NICE: National Institute of Health and Clinical Excellence, SIGN: Scottish Intercollegiate Guidelines Network, ESMO: European Society of Clinical Oncology, ASCO: American Society of Clinical Oncology, ACR: American College of Radiology.

¿Hacia un seguimiento individualizado?

En pacientes con CBNM completamente reseado en estadios precoces, se han investigado factores que podrían aumentar el riesgo de recidiva o de aparición de segundos tumores (153). Así:

1. Factores quirúrgicos: El tipo de resección (lobectomía, segmentaria, atípica), el estadio, la afectación ganglionar, el borde de resección, el tipo de linfadenectomía, etc.
2. Factores patológicos: La invasión linfovascular, el tipo histológico, el número de estaciones ganglionares afectadas.
3. Factores del paciente: La diabetes mellitus, el índice de masa corporal, el tabaco, etc.

Mollberg y Ferguson, en una interesante revisión (154), proponen adaptar el seguimiento a cada paciente, en función de dichos factores, pero instando a que cada centro, en función de sus resultados, investigue qué pacientes recidivan y en qué momento. Solo así se optimizará un plan de seguimiento. Además, parece razonable que aquel paciente que sabemos que no será candidato a un tratamiento agresivo con intención curativa independientemente de cuándo se le detecte una eventual recidiva o un segundo primario (por sus características funcionales o su comorbilidad), no sea sometido a un esquema intensivo de seguimiento, pues no va a influir en su supervivencia final.

Como vemos, los actuales protocolos de seguimiento se basan en opiniones o consensos con una falta absoluta

de evidencia científica. Ello se debe a la gran variabilidad de comportamiento que tienen los tumores entre sí, aun cuando compartan esos factores clínicos, quirúrgicos y patológicos citados.

El comportamiento tumoral depende de su biología y en la medida en que podamos identificar cuáles tienen un comportamiento más agresivo y más probabilidades de recidivar, podremos adecuar el seguimiento y actuar más precozmente si esa recidiva aparece. Por el contrario, en tumores de comportamiento más moderado, podremos espaciar las pruebas de imagen, con el consiguiente ahorro que puede suponer en términos no solo económicos, sino también sociales y psicológicos para el paciente.

De modo que **identificar factores que nos informen de los riesgos de recidiva de un paciente, especialmente si ha sido sometido a un tratamiento radical y está teóricamente libre de enfermedad, se convierte, por todo ello, en una valiosa herramienta, no solo de cara a planificar el seguimiento, sino a poder desarrollar estrategias complementarias que incidan sobre ese riesgo, tratando de minimizarlo.**

2. FACTORES PRONÓSTICOS.

CONCEPTOS Y APLICACIONES EN MEDICINA

Los pasos del acto médico, entendiendo como tal el proceso que transcurre desde el contacto con un paciente aquejado de unos síntomas o signos hasta el momento del desenlace (que podríamos clasificar en curación, cronicación o fallecimiento del paciente), podemos decir que son el diagnóstico, el tratamiento y el establecimiento de un pronóstico. De forma transversal no debemos olvidar la prevención como herramienta fundamental de salud. Todos ellos se encuentran relacionados entre sí y se condicionan los unos a los otros. El ser humano, por definición, desea pronosticar, es decir, intentar conocer lo que va a ocurrir antes de que esto suceda. El objetivo principal de este pronóstico es modular o modificar en lo posible los hechos para poder cambiarlo, adecuándolo a lo que más convenga en cada caso.

En medicina, conocer el pronóstico nos permite actuar de distinta manera para intentar hacerlo más favorable. Si no conocemos el pronóstico de una patología, será más difícil saber si está indicado un determinado tratamiento, que por definición conlleva unos riesgos intrínsecos.

Evidentemente, no podemos predecir el pronóstico individual de un paciente aquejado de una dolencia, por bien catalogada e identificada que la tengamos. Siempre existirá un nivel de incertidumbre en el que debemos movernos, y nuestro pronóstico vendrá expresado en términos de probabilidad de que algo acontezca o no.

El cáncer se está definiendo cada vez más como una enfermedad crónica; o al menos, parece que aspiramos a convertirla en eso. El manejo práctico de los pacientes con cáncer nos exige hacer predicciones y tomar decisiones sobre individuos (155) y el reto al hablar de pronóstico es el de correlacionar el paciente individual con la población global de pacientes con la misma enfermedad.

Para ello, el médico busca conocer los factores que definen la evolución de la enfermedad, o al menos, que definen grupos de pacientes con distintas probabilidades de evolucionar de una u otra manera.

Para considerar el manejo de un caso de cáncer individual, el primer paso es caracterizar al máximo el origen y tipo histológico del mismo. Hasta no hace mucho, éstos aspectos constituían las únicas señas de identidad del cáncer que determinaban su manejo terapéutico y definían el pronóstico del paciente. Afortunadamente, una de las vías de investigación más importantes en cáncer es la identificación de otros factores que modifican esta evolución: los factores pronósticos. Conocerlos nos permite actuar en consecuencia. En la atención al paciente, permitirá:

- seleccionar las pruebas diagnósticas de imagen apropiadas,
- establecer el plan de tratamiento adecuado
- predecir el resultado de cada tratamiento, sabiendo así si los beneficios justifican los riesgos inherentes a toda intervención.
- optimizar el plan de seguimiento y adecuarlo a la realidad de ese pronóstico
- informar al paciente de aquello que esperamos que ocurra, lo cual redundará en un mejor ajuste de la in-

formación que en cada momento el paciente nos demande acerca de su enfermedad.

Pero no solo son importantes los factores pronósticos en el acto médico individual de cada paciente. A nivel general nos van a permitir mejorar los procesos de investigación, implementando la eficacia en el diseño de estudios y análisis de los datos, perfeccionando la fiabilidad de la predicción, identificando subgrupos homogéneos hacia quiénes dirigir o no una terapia experimental, etc.

2-1. CLASIFICACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS

Los puntos de partida a la hora de clasificar el cáncer están bien definidos. La Clasificación de Tumores de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la base de la clasificación histológica del cáncer. Por su parte, la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y el Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC), cuya evolución histórica ya hemos comentado previamente, a través de la clasificación TNM que frecuentemente se va actualizando, definen la estadificación de cada tumor, lo cual supone hoy por hoy el principal factor pronóstico de los procesos neoplásicos.

Pero hay otros factores que funcionan como pronósticos en muchos casos, y que clásicamente se han subdividido en (156):

- Factores relacionados con el tumor
- Factores relacionados con el paciente
- Factores relacionados con el ambiente, contexto o entorno en que encontramos al paciente.

2-1.1. Factores relacionados con el tumor

Incluyen aquellos directamente relacionados con la presencia del tumor o su efecto sobre el huésped, y más comúnmente comprenden aquellos que reflejan la patología del tumor, la extensión anatómica de la enfermedad o la biología tumoral.

Como hemos dicho, la reciente revolución en la medicina molecular ha retado a la clasificación actual (basada en la histología) y ha llevado a una nueva definición de muchos cánceres de acuerdo con las características moleculares y genéticas de los mismos. Se están llegando ya incluso a definir los tratamientos más adecuados en función de algunas de esas variaciones moleculares, como son las mutaciones en el EGFR o la traslocación ALK en el caso del CBNM.

La extensión de la enfermedad ya no solo viene definida por la clasificación TNM. Encontramos, por ejemplo, que hay varios pronósticos en la enfermedad N2 del CBNM (en función del número de estaciones ganglionares mediastínicas afectadas o el momento en que identificamos ese N2, por ejemplo).

Asimismo, los patrones de invasión linfática o vascular van un paso más allá del simple subtipo histológico del tumor a la hora de intentar predecir su evolución. Igualmente, distintos factores pronósticos que funcionan como manifestación indirecta de la masa tumoral, pueden desempeñar un papel en el pronóstico, además de en el seguimiento. Los receptores hormonales, los marcadores bioquímicos, la expresión de los factores relacionados con la proliferación, y de manera reciente, las características biomoleculares del tumor e incluso las alteraciones a

nivel epigenético, han demostrado afectar a los resultados de una variedad de cánceres, entre los cuales se encuentra el carcinoma broncogénico. La tabla 12 muestra un ejemplo de todos estos factores que influyen ya hoy en la práctica clínica de la oncología.

2-1.2. Factores relacionados con el paciente

Son factores presentes en el organismo que no están relacionados directamente con la malignidad, pero que tienen el potencial de impactar significativamente en el resultado a través de su interferencia con el comportamiento del tumor o su efecto sobre el tratamiento. Las propias características demográficas del paciente, como la edad, el género, la raza, la comorbilidad, los antecedentes oncológicos personales o familiares, sus hábitos tóxicos como el consumo de alcohol o de tabaco, etc., han demostrado un papel en el desarrollo y evolución de distintos tipos de cánceres (157, 158).

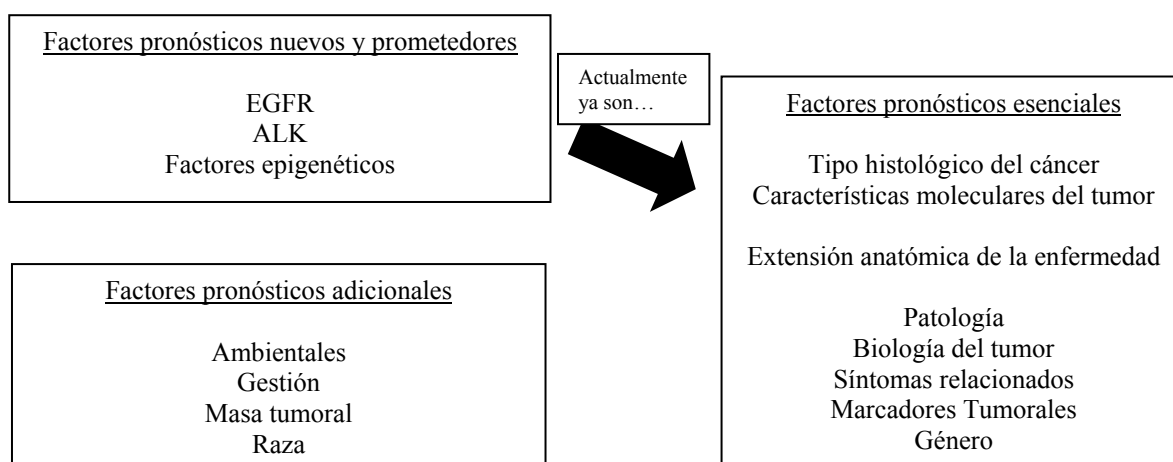
2-1.3. Factores relacionados con el ambiente

Eso que ahora se ha venido a llamar el ambioma, por homofonía con el término genoma, viene definido por el conjunto de factores externos que operan sobre el paciente y que podrían ser específicos tanto de un paciente individual como, más frecuentemente, de grupos de pacientes residentes en la misma área geográfica o expuestos a los mismos carcinógenos (159). Pero más allá de esa exposición a determinados agentes externos potencialmente oncogénicos, como el asbesto, las nitrosaminas, o todos esos que ya comentamos al hablar de la epidemiología del cáncer de pulmón, también se considera ambioma la accesibilidad al sistema sanitario, la calidad del mismo, incluso el nivel cultural de un paciente o de un entorno social.

Tabla 12. Ejemplos de factores pronósticos relacionados con el tumor. Tomada de Gospodarowicz y col. (155)

1. Patología	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Características moleculares del tumor; patrones de expresión génica ▪ Clasificación morfológica ▪ Grado histológico ▪ Patrón de crecimiento ▪ Patrón de invasión
2. Extensión anatómica del tumor	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Categorías TNM ▪ Masa tumoral ▪ Tumor aislado o multifocal ▪ Número de localizaciones comprometidas ▪ Marcadores tumorales
3. Biología del tumor	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Marcadores tumorales ▪ Índices de proliferación ▪ Marcadores moleculares
4. Síntomas	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pérdida de peso ▪ Dolor ▪ Edema ▪ Fiebre
5. Capacidad funcional (Performance Status)	

La relevancia clínica de cada uno de estos factores pronósticos evidentemente no es la misma. De hecho, tan solo una minoría influye hoy en la toma de decisiones ante un paciente con cáncer. El siguiente esquema expone los tres pilares en que agrupar los factores pronósticos que a tiempo real conocemos de cara a la toma de decisiones en cáncer. Los factores esenciales han demostrado una aplicabilidad en la práctica clínica y están presentes en los procesos de decisión en oncología. Los que no han aportado hasta el momento una información clara acerca de su influencia los encuadramos como factores pronósticos adicionales y hoy por hoy no influyen en los árboles de decisión. Por su parte, poco a poco, cada vez más rápidamente, aparecen factores nuevos y prometedores que buscan pasar a engrosar el cajón de los esenciales y no quedarse como factores adicionales. Una de las ramas más importantes de la investigación en oncología es la detección de posibles factores nuevos que convenientemente validados, puedan funcionar como factores esenciales que optimicen la práctica clínica y globalmente mejoren el pronóstico de las enfermedades neoplásicas.



2-2. APLICACIÓN DE LOS FACTORES PRONÓSTICOS

Los factores pronósticos son utilizados en la práctica clínica diaria, en la investigación y en el control del cáncer. En la práctica clínica diaria la influencia de los factores pronósticos domina todos los pasos en la toma de decisiones y el tratamiento exhaustivo de pacientes con cáncer, incluyendo la selección del objetivo primario de tratamiento, la modalidad de tratamiento más apropiada y el ajuste del tratamiento de acuerdo con la gravedad de la enfermedad. El conocimiento de los factores pronósticos permite a los clínicos seleccionar las opciones de tratamiento que faciliten la preservación de órganos o funciones sin comprometer la curación y la supervivencia (155). Para resultar relevantes para la práctica clínica, los factores pronósticos han de tener o bien un impacto significativo sobre el resultado del cáncer o bien ser usados para seleccionar los métodos de tratamiento. Es probable que con el progreso en el tratamiento y la mejora de los resultados, los factores pronósticos sean cada vez más relevantes para la selección de las mejores estrategias terapéuticas (las más efectivas con los menores efectos secundarios). La mejora de los métodos de estadificación y, en especial, la caracterización más precisa de la extensión microscópica de la enfermedad, permitirán un agrupamiento de pacientes más homogéneo, con caracterís-

ticas patológicas similares. En resumen, el conocimiento de los factores genéticos se añadirá a una mejor predicción del resultado y a la mayor individualización en las intervenciones terapéuticas.

2-3. FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón constituye un grupo de entidades heterogéneas que comparten orígenes moleculares y celulares, pero con diferentes mutaciones genéticas acumuladas, distintos comportamientos y por tanto pronósticos variables. Gran parte de la actividad científica investigadora clínica y básica ha sido enfocada a los factores pronósticos de pacientes con cáncer de pulmón. Hasta el momento se han comunicado más de 100 factores pronósticos pertenecientes al tumor, al paciente o al ambiente (160-162).

La heterogeneidad clínica reconocida entre pacientes con cáncer de pulmón ha llevado a la división de subgrupos pronósticos. La distinción más importante está entre el carcinoma microcítico y el carcinoma no microcítico. El siguiente paso es la extensión de la enfermedad, o estadio (TNM).

Muchos estudios de los CBNM evalúan a los pacientes con la enfermedad completamente reseada, lo que permite obtener la máxima información de la pieza tumoral. En pacientes que se someten a resección quirúrgica, las tasas globales de recurrencias, aun para resecciones completas, oscilan en un margen tan amplio que varía desde el 20 % al 85 % (162). En estos pacientes es fundamental la determinación de factores pronósticos que nos permitan detectar los tumores con más probabilidades de recidiva y actuar en consecuencia (añadiendo tratamientos complementarios, intensificando el seguimiento o las pruebas a realizar, etc.).

El papel del tipo histológico del tumor como factor pronóstico se ha estudiado ampliamente, sin llegar a conclusiones definitivas. Los estudios muestran una evidencia inconsistente en cuanto a la importancia del adenocarcinoma en comparación con otros subtipos de carcinomas no microcíticos (160). Dentro del propio adenocarcinoma, el subtipo histológico ha demostrado en los últimos años variar el pronóstico, de modo que ya se queda corta la denominación de un tumor como simplemente adenocarcinoma, como hemos visto con la nueva clasificación de Travis. Se ha demostrado que muchos otros factores tumorales tienen una importancia pronóstica independiente, pero no son utilizados de forma rutinaria para la toma de decisiones sobre el tratamiento. Estos factores incluyen la citada subclasificación histológica, factores analíticos y marcadores tumorales en suero, la proliferación del tumor o los marcadores celulares. A nivel molecular se han estudiado reguladores del crecimiento celular (k-ras, RB, EGFR, Erb-b2, MRP-1, HGF), de la cascada metastásica (TPA, ciclina D-I, catepsina) y de la apoptosis (p53, bcl-2) (161, 163).

3. LA INFORMACIÓN GENÉTICA.

Vías de desarrollo oncogénico y sus alteraciones como factores pronósticos en el carcinoma broncogénico no microcítico.

El DNA cromosómico guarda toda la información genética del organismo. Todo lo que un ser vivo manifiesta externamente, su color de pelo, su estatura, el color de sus ojos... pero también el tono de su voz, gran parte de su capacidad de pensar, incluso de su temperamento... todo lo que necesita, se almacena en los genes de cada una de sus células. Muchas de las enfermedades o de la predisposición a las mismas también se almacena en su código genético. Cuánto hay de genético y cuánto de moldeado por parte de eso que se ha venido a llamar “ambiotoma”, es una proporción que todavía no somos capaces de medir.

La *genómica* estudia la secuenciación y organización del genoma. Las instrucciones que guarda el DNA se ejecutan a través del RNA en el fenómeno llamado *transcripción*, por el cual se generan copias de determinadas instrucciones para poder ejecutarlas en el citoplasma celular. El libro maestro, el DNA, no debe salir del núcleo, donde está bien protegido. Por eso se transcriben copias de aquello que la célula necesita procesar. Ese fenómeno de transcripción lo estudia la *genómica funcional*, capaz de estudiar la expresión génica por medio de *arrays de DNA* (figura 4).

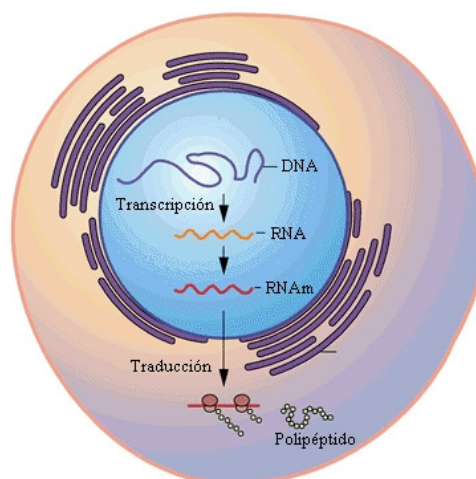
Por último, siguiendo las instrucciones escritas en la copia de RNA que viene del núcleo, la célula fabrica la proteína correspondiente, auténtica ejecutora de aquello que necesita la célula o el organismo (digerir un alimento, destruir un invasor, aumentar la frecuencia cardíaca, etc.). Este último paso de creación de la proteína a partir del RNA constituye la *traducción*, entrando ya en el campo de la *proteómica*, que estudia, como su nombre indica, la expresión proteica y se vale de los *Tissue-arrays* o *arrays de tejido*.

El cáncer, en su origen, es una enfermedad genética. La transformación de un tejido normal en una neoplasia invasiva se entiende como un proceso lento que implica cambios a nivel genético con un doble componente hereditario y somático. La progresión del cáncer se debe a un proceso de acumulación de cambios genéticos y epigenéticos¹. El elemento fundamental a nivel conceptual del cáncer es el crecimiento celular descontrolado. Los tejidos y las células cuentan con sistemas de autocontrol que impiden una multiplicación celular (y con ella un crecimiento tisular) descontrolado que pueda arrastrar modificaciones genéticas que rompan el equilibrio entre los tejidos y den lugar a un tumor.

Alteraciones genéticas y epigenéticas favorecen la activación persistente y sin control de vías de transducción de señales de activación y crecimiento, supresión de los mecanismos de apoptosis o senescencia, alteración del ciclo celular, anormalidad en los mecanismos de reparación del DNA, etc.

¹ Entendemos por alteraciones epigenéticas aquellas que se producen a nivel biomolecular y que son causantes de las modificaciones en la expresión de los genes (metilaciones, modificaciones de histonas, RNA no codificante, etc.).

Figura 4. Esquema de la transmisión de la información genética: del DNA a la proteína



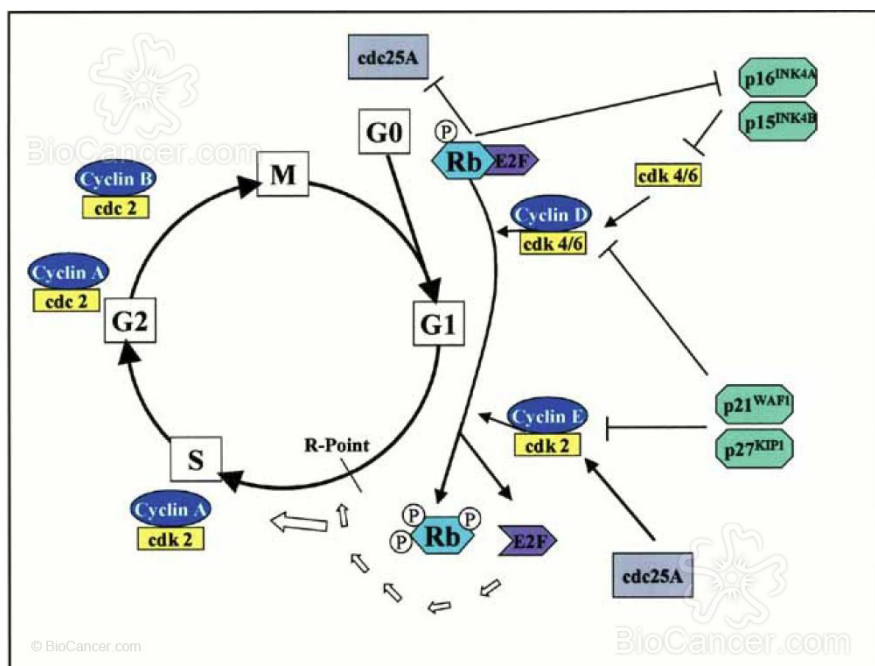
Cambios de este tipo se producen a nivel celular de forma constante. Sin embargo, existen a su vez mecanismos de autoprotección que impiden que células anómalas logren reproducirse y crecer sin control. Generalmente es la acumulación de diferentes alteraciones en distintos *pathways* lo que hace que las células “defectuosas” rompan el equilibrio y predominen sobre los sistemas de defensa del organismo. Se habrá generado un cáncer.

Las vías o *pathways* susceptibles de alterarse son múltiples. Probablemente nuestros conocimientos científicos solo abarquen en la actualidad unas pocas y de manera muy somera (164). Su estudio proporciona día a día claves para comprender la génesis del cáncer, su crecimiento y extensión y las posibles vías para luchar contra él. Resumiremos brevemente las vías que han demostrado alterarse en la patogenia del carcinoma broncogénico y de las cuales salen las proteínas objeto de este estudio. Asimismo mencionaremos otras vías conocidas en el cáncer de pulmón, muchas de las cuales se basan en alteraciones a nivel epigenético en el DNA.

3-1. EL CICLO CELULAR

Es el ciclo por el que pasa cada célula para su división. Está altamente regulado, por factores positivos y negativos (figura 5). Consta de las fases secuenciales G1 (gap), S (síntesis del DNA), G2 y M (mitosis). Las tres primeras fases entre dos mitosis constituyen la interfase. Se rige por una precisa coordinación del ensamblaje y la activación secuencial de complejos proteicos entre ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las ciclinas se unen con sus CDKs de forma secuencial, favoreciendo el avance del ciclo celular y por tanto la replicación de la célula. Por su parte, el punto crítico del ciclo celular es el paso de G1 a S (la célula empieza a duplicar su DNA para dividirse). Ese paso depende de la fosforilación gradual de la proteína supresora de tumores o proteína del gen del retinoblastoma (pRb) (165, 166).

Figura 5. Esquema del ciclo celular y los factores reguladores positivos y negativos. Tomada de <http://www.biocancer.com/journal/1095/2-ciclo-celular-y-cancer>



Esta fosforilación está mediada por complejos ciclina D/CDK 4/6 (167) y continuada por el complejo ciclina E/CDK2 (168). Esta pRb activa a la ciclina A, que unida a CDK2 promueve también la replicación del DNA (169). Por otra parte, ciclinas B unidas a CDK1 favorecen la entrada en mitosis, es decir, en la fase M (170). Otros mecanismos se unen a CDKs para bloquearlas y con ello inhibir el ciclo celular. Por una parte la familia de proteínas INK4: p16, p15, p18 y p19 (171). Y por otra parte las proteínas p21, p27 y p57 (172). A su vez, el gen que codifica p21 corresponde al grupo de dianas de p53 (173). Esta proteína es la mejor caracterizada hasta el momento dentro de las proteínas supresoras de tumores. Responde a situaciones de estrés sobre el DNA, como puede ser su lesión, a raíz de la cual se activa de forma importante. Su función como vemos es regular una posible replicación celular acelerada y peligrosa, lo cual permite a las células tener tiempo para reparar estas lesiones del DNA antes de dividirse de nuevo. Los genes dependientes de p53 también están en relación con metabolismo celular y la apoptosis (174). En células sanas la concentración intracelular de p53 es muy baja, sobre todo porque aparece inhibida por mdm-2 (175). La inactivación de mdm2 conlleva una sobreexpresión de p53, que resulta letal en estudios experimentales, probablemente por bloqueo total del ciclo celular y la consiguiente apoptosis celular (176). A su vez p53 activa algunos complejos ciclina-CDK y la propia p21, acentuando de esa forma su acción bloqueadora del ciclo celular.

¿Por qué mecanismos escapan las células al control del ciclo celular y se avanza en la transformación neoplásica? Sobre todo por la inactivación de genes supresores tumorales como el p53 o el pRb y de inhibidores endógenos de las CDKs, así como por cambios en las concentraciones y actividad de las proteínas que controlan la maquinaria del propio ciclo celular. Destaca la elevación de la concentración de distintas ciclinas que se ha visto en algunos tipos de tumores. La inhibición de CDKs es una vía de desarrollo de fármacos dirigidos a controlar el ciclo celular en células tumorales (177). Así el péptido C4 inhibe significativamente la actividad cinasa de CDK2 (178). Más recientemente, Ji y col han desarrollado un péptido que inhibe indirectamente la actividad

CDK2/ciclina A mediante la estabilización de las concentraciones de p27, induciendo de forma potente la muerte en las células tratadas (179). A partir de estos hallazgos, son ya varios los inhibidores de CDKs de bajo peso molecular registrados como fármacos anticancerosos para ensayos clínicos, si bien los resultados todavía son muy vagos. Así, el flavopiridol, que bloquea el complejo ciclina B/*CDK1*, la roscovitina, o el más reciente AZD5438. Es por tanto una posible línea de tratamiento.

Implicados también en la reproducción celular aparecen otras proteínas como la codificada por el gen *c-myc*. Se trata de un factor de transcripción, es decir, una proteína que favorece la transcripción de otros genes del DNA para dar lugar a sus proteínas correspondientes. En la célula en reposo su expresión es muy baja. Sin embargo, se activa cuando la célula está en fase de crecimiento y replicación. La alteración a nivel del gen *c-myc* puede dar lugar a una sobreexpresión de su proteína que ponga en marcha procesos de replicación celular cuando no corresponde; que actúa pues como protooncogén. La proteína de *c-myc* ha demostrado activar ciclinas, CDKs y otras proteínas implicadas en el ciclo celular (180).

Las proteínas descritas han demostrado actuar como factores pronósticos en CBNM de la siguiente manera;

- Ciclina A. Su expresión aparece disminuida en pacientes con CBNM con buen pronóstico (181, 182). La información pronóstica que ofrece su análisis por inmunohistoquímica parece relevante según algunos estudios (182).

- CDK1. Su sobreexpresión se ha asociado a un peor pronóstico, hasta el punto de que se ha incluido junto con otros cuatro genes en una firma génica desarrollada recientemente (183). Asimismo se ha comprobado que la disminución en la concentración de CDK1 libre citoplásmico se asocia a peor pronóstico y al desarrollo de resistencia al tratamiento quimioterápico (184).

- CDK2/ciclina E. Su importancia radica en que cuando tiene lugar esta unión, se desarrolla un tumor con peor pronóstico. Este hecho se ha comprobado de forma específica en estadios precoces (185).

- p16. Proteína muy estudiada, tanto en expresión por IHQ (186) como en modificaciones epigenéticas y su repercusión en el potencial metastásico del CBNM (187).

- p53. También es una de las proteínas más analizadas no solo en cáncer de pulmón. Su expresión se ha relacionado igualmente con el pronóstico en estadios iniciales (188). En este caso la sobreexpresión de esta proteína conlleva habitualmente un mejor pronóstico (189)

- p27. Se mostró como factor de mal pronóstico cuando estaba sobreexpresado en distintos estadios (190, 191).

- pRb. Su papel en el complejo entramado proteico que supone el ciclo celular también parece que puede aportar una orientación pronóstica. Sin embargo, es difícil valorar su rol como factor pronóstico independiente (192).

- mdm2. En contra de lo que se podría pensar por su acción de inactivación de p53, la sobreexpresión de esta proteína demostró hace ya 15 años ser un factor de buen pronóstico en el CBNM (193).

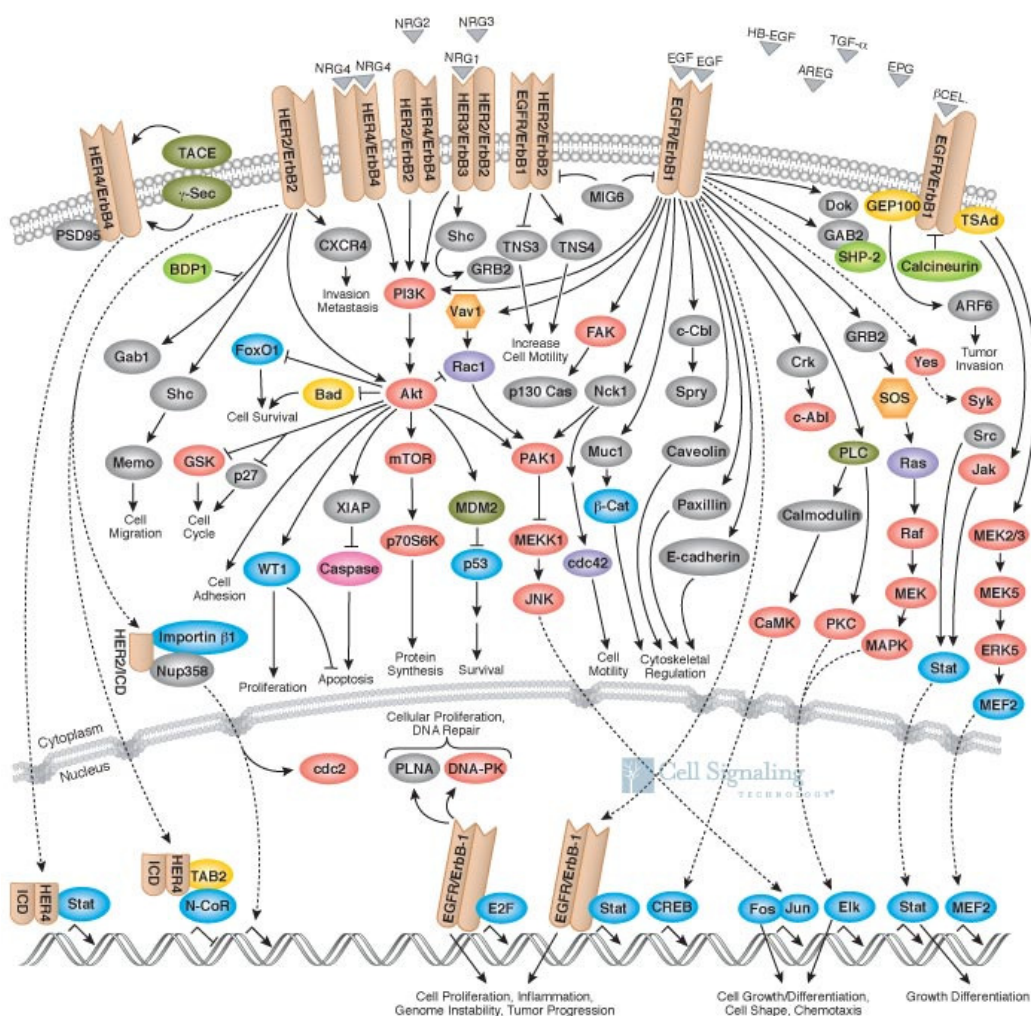
3-2. RECEPTORES DE MEMBRANA

La célula está sometida a la regulación por parte de factores de crecimiento, citocinas y hormonas. La forma en que estos elementos interactúan sobre las células es mediante su unión a receptores de membrana. Esta unión desencadena una serie de reacciones intracelulares en cascada que suelen culminar en el núcleo, donde se activan los genes correspondientes para elaborar la respuesta de la célula a ese factor. La expresión patológica de genes con un papel crítico en las vías de señalización dependientes de factores de crecimiento puede contribuir a una alteración del crecimiento celular que asocie el desarrollo de un cáncer. La activación constitutiva de las vías de señal dependientes de factores de crecimiento, debido a alteraciones genéticas de los genes relacionados, favorece el desarrollo y la progresión de muchos cánceres humanos. Cada vez se conocen más, y cada vez vamos identificando nuevas moléculas dirigidas a bloquear esos receptores o sus acciones anterógradas, es decir algún punto inducido dentro de la cascada de reacciones que intracelulares. Las dos familias de receptores mejor caracterizadas son la familia de señalización *ErbB* y la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*). Sin embargo, esta vía de señalización es compleja, como podemos intuir simplemente echando un vistazo a la figura 6. Los receptores ErbB desempeñan un papel importante en el crecimiento normal y desarrollo celular, relacionados con procesos de división celular, supervivencia, angiogénesis, movilidad y adhesión celular (194). La sobreexpresión de los receptores de esta familia o de sus ligandos puede contribuir a la función oncogénica (195, 196). Se ha demostrado para el CBNM una sobreexpresión frecuente de estos receptores (tabla 13). La sobreexpresión de *ErB-2* se ha correlacionado asimismo con un peor pronóstico en cáncer de mama (197). El EGFR se detecta por inmunohistoquímica en un 40 % al 80 % de los casos de CBNM. Se han encontrado pequeñas deleciones o mutaciones puntuales en los exones 18 a 21 del dominio tirosín cinasa del EGFR hasta en un 17 % de casos de CBNM. Predominan en adenocarcinomas de mujeres no fumadoras. La presencia de estas mutaciones se ha asociado a una mejor supervivencia en aquellos pacientes que responden inicialmente a agentes anti-EGFR, usados ya en la clínica con resultados alentadores (198). La sobreexpresión de EGFR en estudios mediante IHQ por técnicas de visualización semicuantitativas no ha demostrado una clara influencia en el pronóstico (199, 200), si bien se ha relacionado la expresión de esta proteína con la existencia de mutaciones a nivel génico.

Las mutaciones de *ErB-2* son más frecuentes en pacientes con adenocarcinomas, pero se presentan predominantemente en fumadores o exfumadores. Los grados de expresión elevados de *ErB-2* se han asociado a un pronóstico desfavorable. Otros receptores de membrana como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF) o el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) han demostrado un papel pronóstico en el cáncer de mama. En pulmón no hay hallazgos al respecto.

Otro receptor de membrana, asociado en inicio a las células del tracto gastrointestinal, es el *c-kit*. También es un receptor tirosín-quinasa para el cual el *imatinib* es un ligando específico, por lo que se convierte en una diana terapéutica, todavía poco clara en pulmón.

Figura 6. Esquema de las vías de señalización derivadas de agentes extracelulares que interactúan con receptores de membrana de las familias ErbB y EGFR. Tomado de: http://www.cellsignal.com/reference/pathway/ErbB_HER.html



Otro receptor de membrana, asociado en inicio a las células del tracto gastrointestinal, es el *c-kit*. También es un receptor tirosín-quinasa para el cual el *imatinib* es un ligando específico, por lo que se convierte en una diana terapéutica, todavía poco clara en pulmón. No está claro su papel como factor pronóstico en el CBNM, pero algún estudio muestra cierta tendencia en su expresión a mejores supervivencias en estadios precoces (201). También se denomina CD117.

Tabla 13. Sobreexpresión de los distintos receptores de la familia ErB en el CBNM. Normann y cols (202)

RECEPTOR	% CBNM CON SOBREEXPRESIÓN
Erb-1/EGFR	40-80 %
Erb-2	18-60 %
Erb-3	25-85 %
Erb-4	15-40 %

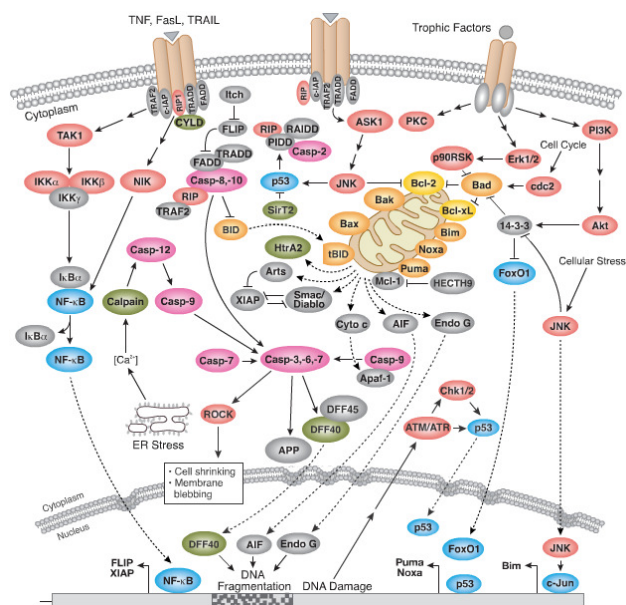
3-3. APOPTOSIS

La apoptosis es la muerte celular programada. La evasión de este fenómeno por parte de la célula ha demostrado contribuir de forma significativa no solo al desarrollo tumoral, sino también a la resistencia a la radioterapia y la quimioterapia (203). El mecanismo que lleva a esa muerte celular es una reacción en cadena de proteínas, entre las que destacan las cisteín-proteasas o caspasas. Se han clonado y secuenciado un total de 14 caspasas, que se clasifican en iniciadoras y ejecutoras. Las *caspasas 3 y 7* son las ejecutoras clave. Distintas vías (intrínseca y extrínseca) con diferentes mediadores inducen la activación de estas caspasas que conduce a la muerte (mejor dicho, suicidio) celular. En una de esas vías de activación desempeña un papel clave la *catepsina D*, una proteasa que aparece sobreexpresada hasta en un 40 % de CBNM, según diferentes estudios. En algunos tumores ha actuado como factor pronóstico (204). Es marcador para el cáncer de mama, e incluso ha demostrado predecir el riesgo de metástasis pulmonares de este tipo de tumor (205). En pulmón los resultados son dispares, aunque recientemente ha sido relacionado con el pronóstico en adenocarcinomas (204). Por su parte la *caspara 3* ha aparecido elevada en CBNM hasta por encima del 90 % de los casos (206), relacionándose en algún caso con el pronóstico (207, 208), aunque de forma no muy clara. La hipótesis de trabajo a la hora de buscar dianas terapéuticas sería pensar que una caspasa sobreactivada impediría que la célula tumoral evadiese la muerte celular programada a la que debe estar abocada por el bien del conjunto del organismo vivo (figura 7).

3-4. VIAS DE REPARACIÓN DEL DNA

La supervivencia y proliferación normales de la célula requieren la estabilidad de su DNA, tanto en cuanto a la codificación de sus genes como a la disposición de la doble hélice. Cualquier cambio en la secuencia del DNA puede tener consecuencias impredecibles. Y ese DNA está expuesto a agresiones exógenas y endógenas como el calor, los accidentes metabólicos, la radiación, las sustancias ambientales, la propia quimioterapia, etc.

Figura 7. Esquema de las vías de apoptosis o muerte celular programada. Tomado de:
<http://www.cellsignal.com/pathways/apoptosis-signaling.jsp>



Se considera que la lesión del DNA solo a partir de fuentes endógenas da lugar a una cifra estimada de 20.000 lesiones en una única célula cada día (209). No obstante, menos de uno de cada 1000 cambios de bases que se producen accidentalmente provoca una mutación permanente; el resto son eliminados mediante sistemas de reparación de DNA con los que cuenta la célula. Un 10 % de los genes del genoma codifican proteínas implicadas en la reparación del DNA, lo cual da una idea de la importancia biológica de estos sistemas en la supervivencia del individuo. Estos genes que podemos llamar de vigilancia, a su vez están expuestos a las citadas agresiones. La mutación en alguno de estos genes, con la consiguiente inactivación del mismo, puede provocar defectos en la capacidad de reparación del DNA que se relacionan con varias enfermedades genéticas humanas (210). Por otra parte, el aumento de la capacidad de reparación del DNA por parte de la célula podría aumentar su resistencia a agentes antitumorales, cuya misión es precisamente dañar el DNA para provocar la destrucción de la célula alterada. En las células de los mamíferos hay seis vías de reparación de DNA, que actúan en función del tipo de daño que éste sufre. Son las siguientes:

- Vía de reparación directa
- Vía de la reparación de la escisión de bases (BER)
- Vía de la reparación de la escisión del nucleótido (NER)
- Vía de la reparación de errores (MMR)
- Vía de la recombinación homóloga (HR)
- Vía de unión de extremos de DNA no homólogos (NHEJ).

Para nuestro estudio se seleccionó la proteína *MSH-2*. Pertenece a la vía MMR y está encargada junto con otras similares del reconocimiento del error, ya que se une al DNA en el punto donde está dañado. Por su parte, la *MLH-1* y otras de similares características proceden a la reparación del daño, que se hace mediante la escisión de la cadena dañada. La expresión de estas proteínas ha demostrado estar disminuida en muestras de CBNM (210-212).

3-5. VIAS DE INVASIÓN Y METÁSTASIS

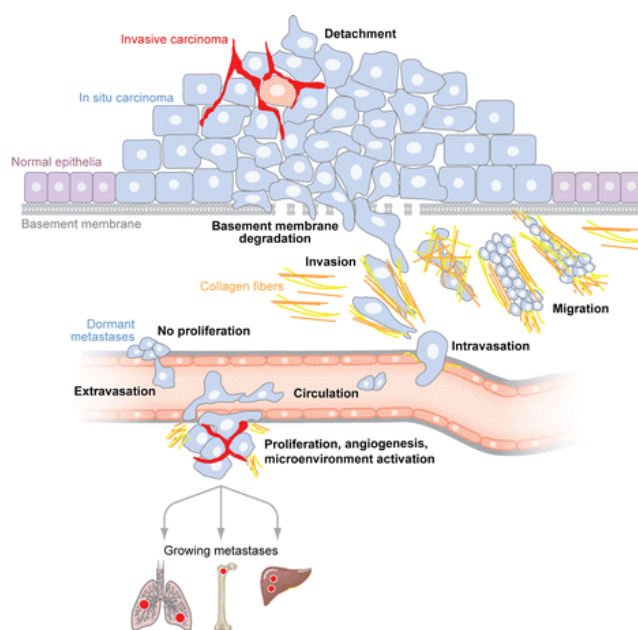
Si trascendente es cómo se desarrolla un tumor, no menos importante es conocer qué vías utiliza para hacerse invasivo, lo cual definirá en gran medida el daño que puede producir sobre el paciente. El proceso, todavía no bien definido (con varias hipótesis en las que no entraremos) de cómo un tumor adquiere propiedades que le permiten invadir y extenderse a distancia, se ha venido a llamar la “cascada metastásica” (figura 8). En síntesis, se combinan fenómenos de angiogénesis, motilidad e invasión de vasos linfáticos y sanguíneos, circulación, adherencia a distancia, extravasación y proliferación en el nuevo punto de implante.

Uno de los puntos más importantes y que más se ha venido estudiando por sus implicaciones en la extensión del cáncer es el de la adhesión celular. La mayoría de los cánceres humanos crecen a partir de células epiteliales. Estas células están en condiciones normales unidas entre sí por distintos mecanismos, la mayoría de los cuales requieren de interacciones mediadas por moléculas de adhesión llamadas *cadherinas*. Constituyen una familia de glicoproteínas transmembrana que a su vez está formada por cinco subfamilias. En la unión de células epiteliales la más importante la *E-cadherina*. Intracelularmente forma un complejo con *beta-catenina*, alfa-catenina y p120.

La disfunción en cualquiera de estas proteínas (muchas producidas por alteraciones epigenéticas en los genes que las codifican, como son procesos de metilación de promotores) puede favorecer la diseminación neoplásica a distancia. La disrupción del complejo e-cadherina/beta-catenina hace que éste que libre en el citoplasma y pueda acceder al núcleo (213). Su papel en la agresividad y potencial metastásico del CBNM ha sido estudiado en los últimos años. Parece que la rotura de este complejo se asocia a una mayor letalidad por parte del tumor (214).

Su acumulación ha demostrado ser capaz de activar factores de transcripción que favorecen el crecimiento descontrolado de la célula (ciclina D1, c-myc, etc.). En este sentido la amplificación de c-myc también ha demostrado actuar como factor pronóstico en adenocarcinomas en estadio precoz (215).

Figura 8. Esquema básico de la “cascada metastásica”. Tomado de Bacac et al. (216)



3-6. OTRAS

Topoisomerasa II alfa.

El papel de las topoisomerasas (I y II) es francamente interesante. Sabemos que el DNA se almacena formando los cromosomas. Y lo hace enrollándose sobre sí mismo para dar lugar a una doble hélice, que debe ser estable. Para que se pueda llevar a cabo la transcripción de información y formar copias de RNA esa doble hélice debe desenrollarse momentáneamente para luego volver a su situación basal. Las topoisomerasas son capaces de romper las uniones que mantienen estable la doble hélice enrollada y luego volver a estabilizarla para su estado de reposo. Son diana terapéutica de las antraciclinas o el etopósido, y se ha visto relacionada su expresión con la respuesta a estos fármacos en tumores con el carcinoma de mama o el carcinoma microcítico de pulmón (217). Sin embargo no está claro su papel clínico ni pronóstico en el CBNM (218) .

Timidilato sintasa

Es una enzima implicada en la síntesis y reparación del DNA. De gran relevancia clínica al ser inhibida por quimioterápicos como el 5-fluorouracilo o el pemetrexed. Su expresión analizada por inmunohistoquímica parece que está en relación con la respuesta al pemetrexed y por tanto actúa en pacientes así tratados como factor pronóstico (219). A nivel de DNA se han identificado distintos polimorfismos que pueden actuar como factor pronóstico en CBNM, si bien su traducción a IHQ en pacientes no tratados con quimioterapia sigue siendo poco claro (220).

Las vías o pathways de oncogénesis actualmente en estudio para el CBNM son múltiples y no vamos a repararlas todas aquí (tabla 14). Hemos analizado aquéllas en que participan las proteínas que se han seleccionado para nuestro estudio. Por supuesto, se trata de un campo de estudio muy amplio cuyo último fin es encontrar dianas terapéuticas que permitan bloquear el desarrollo y en su caso la expansión de neoplasias.

Otros pathways...
Eritropoyetinas
Proteínas de membrana de linfocitos
PTEN
Akt
Vía del m-TOR
Eje OPG/RANK/RANKL
Telómeros y vías de senescencia
Angiogénesis
Histonas
Metilación de DNA
Señales de transducción ras/raf
Fosfoinositol 3-cinasa

Tabla 14. Otras vías de oncogénesis estudiadas para el CBNM con potenciales fármacos dirigidos en estudio o desarrollo.

4. ASPECTOS ESTADÍSTICOS. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA EN CÁNCER

Haremos una pequeña reseña acerca de la metodología estadística que se utiliza cuando se analiza la supervivencia en cáncer y la influencia de posibles factores pronósticos.

Empezamos con una apreciación: los puntos finales relevantes a considerar en el cáncer incluyen la probabilidad de curación, la duración de la supervivencia, la probabilidad de responder al tratamiento, la probabilidad de recaída, el tiempo de recaída, la probabilidad de control del tumor local, la probabilidad de preservación del órgano y la posibilidad de alivio sintomático en un contexto paliativo (155). Por ello, en los estudios los resultados pueden ser muy heterogéneos. En nuestro estudio buscamos analizar probabilidad de recidiva y probabilidad de mortalidad, así como la posible influencia de determinados factores biológicos en estos parámetros. Con esta premisa, en primer lugar debemos tener claros dos conceptos básicos:

Tasa de supervivencia: Índice estadístico que resume la frecuencia probable de resultados específicos para un grupo de pacientes en un punto particular en el tiempo.

Curva de supervivencia: Presentación resumida del patrón de las tasas de supervivencia a lo largo del tiempo.

La mayoría de estudios que se realizan al respecto son estudios retrospectivos de cohortes. En este tipo de estudios, pese a que podemos realizar un período de seguimiento prolongado, describir la supervivencia de un grupo de pacientes como la proporción viva al final del período de investigación nos puede conducir a error. En primer lugar, sería exigible que en todos los pacientes el período de seguimiento hubiera sido el mismo. Y además, todos los pacientes tendrían que haber llegado al final del estudio o haber fallecido a lo largo del mismo.

En la realidad, los últimos pacientes reclutados para el estudio (o seleccionados, hablando con propiedad si nos estamos refiriendo a un estudio retrospectivo, como es el caso), aunque lleguen vivos al final del mismo habrán aportado menos tiempo de supervivencia que otros que lleven en el estudio mucho más tiempo; y sin embargo, no sabemos qué les ocurriría a estos pacientes que llegan vivos al final del estudio si hubieran vivido lo mismo que los pacientes con mucho más tiempo de seguimiento.

Para hacer una aproximación lo más representativa posible de la realidad en un grupo de pacientes con observaciones incompletas, la estadística se vale de la probabilidad estimada de supervivencia, elaborando una curva donde tiene en cuenta el seguimiento de cada paciente, los fallecidos, los perdidos o retirados vivos, etc. Esa estimación es lo más aproximado a la realidad.

El método descrito por Kaplan y Meier es el más frecuentemente utilizado en este tipo de estudios dentro de la investigación médica (221). Este método proporciona lo necesario para calcular la proporción de supervivientes a cada punto del tiempo en que ocurre el fallecimiento.

En oncología la mayoría de estudios expresan sus curvas de supervivencia considerando la *supervivencia observada*, que incluye todas las muertes, sean producidas por el cáncer o sean por otra causa. Sería importante, sobre todo al analizar enfermedades con supervivencias prolongadas (como el cáncer de mama, o los estadios

precoces del carcinoma broncogénico como en nuestro estudio) saber con precisión qué pacientes fallecen por su tumor y qué pacientes mueren por otras causas. Estaríamos obteniendo entonces la *tasa de supervivencia ajustada*. En este caso, los pacientes que fallecen por otra causa son considerados como observaciones censuradas, es decir, como si dejaran el estudio estando vivos, o más concretamente, como si fueran pacientes perdidos a lo largo del estudio. Esto presenta dos problemas, que es lo que lleva a la postre a trabajar con supervivencia observadas en la mayoría de estudios:

En primer lugar, si hay un alto porcentaje de pacientes que fallecen por otras causas, perdemos mucha información, porque son muchos pacientes en los que no sabemos qué hubiera pasado desde el punto de vista oncológico de no haber fallecido. En la práctica estaríamos trabajando con un alto porcentaje de pacientes perdidos. En los estudios de probabilidad de supervivencia estimada mediante métodos como el de Kaplan-Meier, se considera que un porcentaje de pacientes perdidos por encima del 15 % les hace perder mucha fiabilidad (221).

Por otra parte, en la práctica es muy difícil establecer el límite entre “pacientes que fallecen por su tumor” y pacientes que fallecen por otras causas. La aproximación más fiable sería suponer que si un paciente fallece libre de tumor ha sido por otra causa, y que si en el momento del fallecimiento existe enfermedad tumoral, las probabilidades de que el evento esté en relación con su proceso neoplásico son mayores.

La forma de intentar, si no solventar, al menos paliar este problema estadístico, es repetir todos los estudios introduciendo como evento terminal en lugar del fallecimiento la recidiva tumoral. En ese caso la información que obtenemos sobre los posibles diferentes comportamientos de tumores a priori similares en cuanto a estadio, tratamiento y evolución, puede ser muy válida para cumplir objetivos como el de nuestro estudio.

Métodos de regresión

La forma más simple de estudiar múltiples factores posiblemente asociados con la supervivencia o la recidiva tumoral es examinar dicha supervivencia global o libre de recidiva dentro de las categorías de pacientes, enfermedad o tratamientos. Este enfoque, sin embargo, está limitado a los factores en los que pueden ser agrupados los pacientes en general, y no se presta al estudio de los efectos de las medidas que varían en una escala de intervalos. Hay muchos ejemplos de variables de intervalos en el cáncer, como son el número de ganglios, recuentos celulares y valores de marcadores de laboratorio. Si la población de pacientes tuviera que ser dividida entre cada valor del intervalo, habría muy pocos sujetos en cada análisis que fueran significativos. Además, cuando se considera más de un factor, el número de curvas resultantes proporciona tantas comparaciones posibles que los efectos de cada factor son muy difíciles de interpretar.

El análisis convencional de regresión múltiple investiga los efectos conjuntos de múltiples variables sobre un resultado individual, pero es incapaz de ocuparse de las observaciones censuradas. Por esta razón, se han tenido que desarrollar otros métodos estadísticos para evaluar la relación del tiempo de supervivencia o intervalo libre de enfermedad con un número de variables de forma simultánea. El más usado es el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox, desarrollado en 1972 (222). Proporciona un método de estimación de la influencia de múltiples covariables sobre la distribución de la supervivencia a partir de los datos que incluyen observaciones

censuradas. Las covariables son los múltiples factores que hay que estudiar asociados a la supervivencia. En el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox, las covariables pueden ser variables categóricas como el género, medidas de intervalo como la edad o resultados de pruebas de laboratorio como será en nuestro caso la cuantificación de la intensidad de inmunorreactividad de una determinada proteína.

Error estándar de una tasa de supervivencia

Las tasas de supervivencia que describen la experiencia del grupo concreto de pacientes son usadas con frecuencia para generalizar a poblaciones mayores. En nuestro caso el objetivo de los resultados que encontremos será intentar generalizar al grupo de pacientes con estadios precoces de CBNM completamente reseca con una expresión determinada de cada una de las proteínas analizadas. Sin embargo, estos valores son extrapolados estimándolos a partir del grupo en estudio, que es solo una muestra de la población general. Será pues importante que esa muestra represente de la manera más fehaciente posible a la población general objeto de la investigación. Este aspecto será muy importante para nuestro estudio y se comentará con detalle en la discusión. En cualquier caso, y dado que la extrapolación a la población general será siempre estimada, nos debemos apoyar en la estadística para obtener resultados fiables y reproducibles. Por muy homogénea y representativa que sea la muestra que estudiamos, si analizáramos otra muestra de la misma población obtenida con los mismos criterios, las tasas de supervivencia obtenidas no serían exactamente iguales. La diferencia entre los dos resultados es denominada “variación de la muestra” (variación al azar o error de muestreo). El *error estándar* es una medida del grado de influencia de la variación de la muestra sobre la tasa de supervivencia computada. En observaciones repetidas en las mismas condiciones, la tasa de supervivencia verdadera o de la población (la que obtendríamos en el hipotético caso de que pudiéramos analizar la población al completo), se encontrará dentro de la amplitud de dos errores estándar a cada lado de la tasa computada, alrededor de 95 veces de 100. Esta amplitud se denominada *intervalo de confianza del 95 %*.

Comparación de supervivencia entre dos grupos de pacientes

Al comparar las tasas de supervivencia de dos grupos de pacientes obtenemos una significación estadística que viene a responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la probabilidad de que la diferencia observada pueda haber ocurrido al azar? La respuesta nos la da el error estándar de esa tasa de supervivencia. Si los intervalos de confianza del 95 % de dos tasas de supervivencia no se solapan, la diferencia observada habitualmente sería estadísticamente significativa, es decir, sería poco probable que se debiera al azar.

Es posible que las diferencias entre dos grupos en cada momento comparable del seguimiento no difieran significativamente, pero que cuando las curvas de supervivencia sean consideradas en su integridad, las diferencias insignificantes individuales se combinen para dar lugar a un patrón de supervivencia significativamente diferente. La prueba estadística más común que examina el patrón completo de diferencias entre curvas de supervivencia es la prueba del rango logarítmico (log-rank) o prueba de Mantel-Haenszel (223). Esta prueba pondera igualmente los efectos de las diferencias que se dan durante el seguimiento y es la elección apropiada para la mayoría de si-

tuaciones. Otras pruebas ponderan las diferencias de acuerdo con los números de personas en riesgo en diferentes puntos y pueden dar lugar a resultados diversos dependiendo de si las muertes o las recidivas tienden a ocurrir de forma temprana o tardía en el seguimiento.

Estado vital

En un estudio de supervivencia o de supervivencia libre de recidiva, como es el que realizamos aquí, en un momento dado, el estado vital de un paciente es definido como *vivo, muerto o desconocido* (es decir, perdido para el seguimiento). Si hablamos de supervivencia libre de recidiva, el estado pasaría a ser *libre de recidiva, afecto por recidiva o desconocido*. El punto final de participación de cada paciente en el estudio es:

- Un “evento terminal”, que sería la muerte o recidiva
- La supervivencia a la finalización del estudio (que indicaría que el paciente seguía vivo o libre de recidiva al cierre del mismo)
- La pérdida para el seguimiento. La ventaja de los estudios de supervivencia estimada basados en el método de Kaplan y Meier es que los datos que proporcionan estos pacientes también son considerados para el análisis.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El pronóstico de pacientes con carcinoma broncogénico no microcítico en estadios precoces I y II que son completamente reseados es variable, sin que se hayan podido concretar hasta el momento factores pronósticos con suficiente peso como para predecir cuál va a ser la evolución.

El comportamiento tumoral viene definido por las características biomoleculares del mismo.

Los diferentes perfiles de expresión proteica de las células de un tumor son el resultado final de las alteraciones que se producen en ellas a nivel nuclear (DNA).

La inmunohistoquímica y la tecnología de matrices de tejido (tissue-arrays) permiten clasificar los tumores en función de los patrones de expresión proteica.

La identificación de perfiles de expresión que se asociaran a un peor pronóstico en términos de supervivencia global o libre de enfermedad, permitiría actuar sobre esos pacientes, bien añadiendo algún tratamiento complementario (quimio o radioterapia), o bien intensificando los programas de seguimiento con el fin de detectar más precozmente la recidiva y poder tener más opciones de tratamiento con intención curativa.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

▪ **OBJETIVO PRINCIPAL:** Análisis inmunohistoquímico mediante tissue-array de la expresión de 21 marcadores moleculares relacionados con vías oncogénicas (proteínas ciclina A, cdk1, cdk-2, ciclina E, p16, p53, p27, pRb, mdm2, EGFR, ErB-2, c-kit, caspasa 3a, catepsina D, msh2, mlh1, e-cadherina, beta-catenina, c-myc, topoisomerasa II alfa y timidilato sintasa) en muestras tumorales de pacientes intervenidos por carcinoma broncogénico no microcítico en estadios I y II en relación al pronóstico y riesgo de recidiva.

▪ **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

1. Análisis de la expresión proteica en función del tipo histológico epidermoide o adenocarcinoma.
2. Análisis del papel pronóstico de parámetros clínico-patológicos: género, edad, tipo histológico, grado de diferenciación, estadio, clasificación TNM y tipo de resección.
3. Desarrollo de modelos pronósticos de supervivencia global y libre de enfermedad en función de las variables pronósticas clínico-patológicas y los perfiles de expresión proteica.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DE LA SERIE

1-1. Criterios de inclusión y exclusión

Los pacientes objeto del estudio fueron todos aquellos intervenidos por carcinoma broncogénico no microcítico en el *Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo II – Cirugía Torácica* del Hospital Clínico Universitario San Carlos de Madrid entre 1997 y 2005, y que cumplían los siguientes **criterios de inclusión y exclusión**:

- Carcinoma broncogénico no microcítico en estadios quirúrgico-patológicos I y II según la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union Internationale Contra Le Cancer (UICC) de 1997 (47). No se incluyeron pacientes con tumores T3 de dicha clasificación (tabla 15).

Tabla 15. Estadios de carcinoma broncogénico incluidos en el estudio, en función de su estadi-ficación según la AJCC y UICC (1)

	T1	T2	T3	T4
N0	IA	IB	IIB	IIIB
N1	IIA	IIB	IIIA	IIIB
N2	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB
N3	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB

T1	Tumores de 3 cm o menos en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral íntegra, sin evidencia endoscópica de afectación más proximal a un bronquio lobar.
T2	Tumor de más de 3 cm, o bien que afecta a bronquio principal (a no menos de 2 cm de carina), o bien que invade pleura visceral, o bien asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que no afecte al pulmón entero.
T3	Tumor de cualquier tamaño que invade pared torácica, diafragma, pleura mediastínica o pericardio parietal. También el que se encuentra en un bronquio principal a menos de 2 cm de carina sin afectarla. Y también tumor que produce atelectasia o neumonitis obstructiva de todo el pulmón.
N1	Metástasis ganglionares ipsilaterales peribronquiales o hiliares. También afectación de ganglios intrapulmonares por invasión directa por el tumor.

- Ningún paciente tenía antecedentes personales oncológicos, es decir nunca antes había sido diagnosticado de ningún tipo de neoplasia, hubiera requerido tratamiento o no.
- El tratamiento del carcinoma broncogénico no microcítico fue en todos los pacientes la resección quirúrgica exclusivamente. Ningún paciente había recibido tratamiento complementario de quimioterapia y/o radioterapia neoadyuvante (antes de la resección quirúrgica) ni adyuvante (después de la resección quirúrgica).

- La resección quirúrgica había sido completa en todos los casos, es decir, cumplía criterios de resección R0 que hemos indicado en la introducción (tabla 16).

Tabla 16. Criterios que definen la resección completa en carcinoma broncogénico. Rami-Porta, et al. (88)

Confirmación microscópica de márgenes libres de tumor
Disección ganglionar sistemática del mediastino
No invasión extracapsular de las adenopatías con infiltración tumoral
Confirmación de que la adenopatía reseada más distal no presenta infiltración tumoral

- Realización de disección ganglionar sistemática del mediastino, según los criterios de consenso en su momento establecidos por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), así como los definidos por el grupo de trabajo correspondiente de la Sociedad Europea de Cirujanos Torácicos (ESTS) (67, 224). (Tabla 17)

Tabla 17. Criterios de consenso para la estadificación ganglionar mediastínica intraoperatoria (SEPAR)(224)

Extirpación de todos los ganglios en todas las estaciones ganglionares del pulmón y del mediastino del lado operado, a ser posible en bloque con la grasa circundante, de tal forma que no quede constancia visual ni palpatoria de ganglios en ese hemitórax.
El espécimen de linfadenectomía hiliomediastínica contendrá al menos seis adenopatías
Es obligatorio el estudio anatomopatológico de todas las estaciones N1 (lobares, interlobares e hiliares) sea cual sea la localización del tumor
Dependiendo de la localización tumoral se deberán incluir necesariamente: Tumores derechos: regiones 2R, 4R y 7. Tumor en LSI: regiones 3, 5 y 7 Tumor en LII: regiones 7, 8 y 9
Se estudiará histológicamente todo el ganglio. Varios fragmentos de una misma región se considerarán como único ganglio salvo que el cirujano especifique lo contrario. Se debe especificar si hay afectación extracapsular, y en los ganglios hiliares indicar si la infiltración es directa por el tumor

- El hecho de que los pacientes tuvieran diagnóstico previo no influyó a la hora de seleccionarlos. Tampoco las pruebas realizadas preoperatoriamente (tomografía computarizada, punción transtorácica, broncoscopia, etc.).

La valoración funcional respiratoria tampoco fue un criterio de inclusión o exclusión, toda vez que permitía la resección quirúrgica que finalmente se hizo.

- No se seleccionaron para el estudio pacientes fallecidos en el postoperatorio, entendiéndose como tal la mortalidad hospitalaria o la producida en los primeros 30 días tras la resección.
- Tampoco se seleccionaron pacientes que hubieran presentado fístulas de muñón bronquial que precisaran un tratamiento quirúrgico agresivo.
- Debía existir en el momento del análisis del tumor una muestra suficiente para incluir en el tissue-array.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
CBNM estadios I y II	Tumores T3
Resección completa (R0)	Antecedente oncológico de cualquier tipo
Dissección ganglionar sistemática del mediastino	Mortalidad postoperatoria
Muestra de tumor suficiente y apropiada	Fístulas de muñón bronquial en neumonectomía
	Tipo histológico diferente a escamoso, adenocarcinoma o indiferenciado de células grandes

1-2. Variables clínicas

Podemos clasificar las variables analizadas en varios grupos:

Los factores demográficos son características propias del individuo investigado, como la edad o el género. Los datos basales, en un estudio longitudinal como este, son los recogidos en el momento inicial, en nuestro caso en el momento de la intervención quirúrgica.

1-2.1. Variables demográficas y basales.

- Género (hombre/mujer).
- Edad. Se midió como variable continua para los datos descriptivos de la serie. Para su estudio como posible factor pronóstico de supervivencia global y libre de recidiva se dicotomizó en mayores y menores de 70 años (≥ 70 , < 70). Este punto de corte se obtuvo de forma aleatoria. Es cierto que en la actualidad, la mayoría de estudios que analizan la cirugía el cáncer de pulmón en pacientes llamados añosos o longevos, suelen establecer el punto de corte por encima de 75 o incluso 80 años (225). Sin embargo, en nuestro trabajo decidimos situar el punto de corte en 70 años, fundamentalmente guiados por la mediana de edad de los pacientes de

nuestro estudio.

- Estado de fumador. Se dividió en fumador activo (que incluye también a aquellos pacientes que habían cesado en el hábito tabáquico en los seis meses previos a la intervención quirúrgica), exfumador (habían dejado de fumar más de seis meses atrás) y no fumador (si nunca lo había sido).
- Performance Status. Se evaluó con el Índice de Karnofsky (tabla 18).

Tabla 18. Índice de Karnofsky

Índice de Karnofsky	
100	Normal. Sin evidencia de enfermedad . Asintomático
90	Capaz de desarrollar cualquier actividad con mínima sintomatología
80	Actividad normal con esfuerzos. Algunos síntomas
70	Capaz de autocuidado, pero no puede desarrollar una actividad normal
60	Necesita alguna ayuda para la mayoría de los cuidados
50	Necesita asistencia de forma significativa
40	Discapacitado. Necesita asistencia de forma prácticamente continua
30	Discapacidad severa
20	Requiere soporte activo
10	Moribundo

- Comorbilidad. Presente en el momento de la cirugía.
- Pruebas diagnósticas realizadas. Se analizó en qué casos se había realizado tomografía computarizada, broncoscopia con toma de muestras por cepillado o biopsia, punción aspiración con aguja fina transtorácica guiada por TC y mediastinoscopia, identificando en estos casos el rendimiento diagnóstico de dichas pruebas. Asimismo se estudió la función pulmonar de los pacientes, dada por los valores de volumen espiratorio forzado en el primer segundo (VEMS) y capacidad vital forzada (CVF).

1-2.2. Variables relacionadas con el tumor.

- Localización del tumor (lado y lóbulo pulmonar afectos).
- Tamaño del tumor en centímetros (diámetro máximo).
- Tipo histológico. Los tumores se clasificaron en epidermoides o escamosos, adenocarcinomas e indiferenciados de células grandes. El llamado clásicamente adenocarcinoma bronquioloalveolar se incluyó dentro

de los adenocarcinomas.

- Grado de diferenciación, también llamado *grado histológico*. Se refiere a la semejanza o no que tienen las células del tumor con las células normales del mismo tipo de tejido. El *grado nuclear* se refiere al tamaño y forma del núcleo en las células del tumor y el porcentaje de células del tumor que se están dividiendo. La *American Joint Commission on Cancer* (AJCC) recomienda las siguientes directivas para asignar un grado a los tumores (226) : Grado X (indeterminado), G1 (bien diferenciado), G2 (moderadamente diferenciado), G3 (mal diferenciado), G4 (indiferenciado).
- Estadio, según la clasificación TNM de la AJCC (47, 226). Ver tabla 15.

1-2.3. Variables relacionadas con el procedimiento quirúrgico

- Tipo de resección. Distinguimos aquí:
 - Resección segmentaria atípica o resección en cuña: supone la resección de forma no reglada de un fragmento de parénquima que incluye al tumor, con un margen libre amplio cumpliendo los criterios descritos por la ESTS en relación al concepto de resección completa (88, 227).
 - Resección segmentaria anatómica o típica: supone la resección de forma reglada de un segmento o segmentos pulmonares donde se encuentra el tumor. Se secciona la arteria, vena y bronquio específicos de ese segmento o segmentos. En cualquier caso la resección es menor que una lobectomía.
 - Lobectomía, o resección de un lóbulo pulmonar.
 - Bilobectomía, resección de dos lóbulos pulmonares adyacente (superior y medio o inferior y medio derechos).
 - Neumonectomía, es decir, extirpación de todo un pulmón.
- Complicaciones que aparecieran en el postoperatorio.

1-2.4. Variables relacionadas con el seguimiento (recidivas y mortalidad)

- Recidiva (variable dicotómica tipo si/no) y fecha de recidiva. Define el tiempo libre de recidiva en ese paciente.
- Tipo de recidiva.
 - Locorregional, si se produce en la misma zona en que asentaba el tumor inicialmente o en ganglios pulmonares, hiliares o mediastínicos.
 - Pulmonar, entendida como la aparición de un nuevo foco de tumor en parénquima pulmonar a distancia de la ubicación inicial (en distinto lóbulo), sin afectación ganglionar mediastínica.
 - A distancia, que hace referencia a la aparición de metástasis extrapulmonares.

Si la recidiva se produjo a nivel pulmonar y mediastínico se consideró locorregional, mientras que cual-

quier aparición de metástasis extrapulmonares fue tipificada como recidiva a distancia, independientemente de si se acompañó o no de recidiva a nivel pulmonar o ganglionar mediastínico.

- Fallecimiento (variable dicotómica tipo si/no) y fecha de muerte. Define el tiempo de supervivencia del paciente.

- Causa de muerte:

- Su tumor
- Distinta a su tumor

Dada la imprecisión que puede existir en este sentido, se ha considerado como muerte debida a su enfermedad neoplásica aquella que ha acaecido en pacientes con recidiva de la misma debido a la aparición de una complicación relacionada razonablemente con su proceso oncológico. En pacientes que fallecen sin recidiva se asume que la causa es distinta a su tumor.

- Pérdida del paciente durante el seguimiento (variable dicotómica tipo si/no). Si el paciente sale del estudio durante el seguimiento sin que se produzca el evento terminal o el cierre del período de seguimiento.

- Tiempo de seguimiento. Desde la cirugía al fallecimiento o a la salida del estudio, bien por finalizar el período de seguimiento, bien porque el paciente entra en la categoría de perdido.

Tabla 19. Variables clínicas analizadas

Variables demográficas y basales	Variables relacionadas con el tumor	Variables relacionadas con el procedimiento quirúrgico
Género	Localización: -Lado -Lóbulo	Tipo de resección
Edad	Tamaño en centímetros	Complicaciones
Fumador	Tipo histológico	
Performance Status (Índice de Karnofsky)	Grado de diferenciación	
Comorbilidad	Estadio (clasificación TNM)	
Pruebas diagnósticas realizadas: -Tomografía computarizada -Broncoscopia -Punción transtorácica -Mediastinoscopia de estadificación preoperatoria -Pruebas funcionales respiratorias (VEMS y CVF)		

1-3. Variables biomoleculares

Para el objetivo principal de este estudio se analizó la expresión de un total de 21 proteínas relacionadas con distintas fases del proceso oncogénico del cáncer de pulmón (tabla 20).

La expresión de dichas proteínas se analizó mediante inmunohistoquímica, y se hizo de forma semicuantitativa. Para analizar toda la batería de proteínas en todas las muestras tumorales de una sola vez se construyó un *tissue-array* constituido por muestras correspondientes a los 160 tumores resecaados, junto con algunas muestras de control. El proceso de construcción de una matriz de tejido de estas características se explica a continuación.

Proteínas analizadas	
ciclina A	c-kit
cdk1	Caspasa 3a
cdk2	catepsina D
ciclina E	msh2
p16	mlh1
p53	e-cadherina
p27	beta-catenina
proteína del gen del retinoblastoma	C-myc
mdm2	topoisomerasa II
EGFR	timidilato sintasa
c-erb2	

Tabla 20

2. METODOLOGÍA DE TISSUE-ARRAYS

2-1. Características y construcción de las matrices de tejidos

Las nuevas tecnologías están permitiendo el acercamiento eficiente a los análisis masivos de expresión en tumores. En la última década esta tecnología se ha desarrollado ampliamente. Paralelamente, modernos métodos matemáticos, hoy completamente informatizados, permiten el manejo de modo eficiente de la abundante información generada en dichos análisis masivos (228).

La tecnología de tissue-arrays, que podemos traducir como “matrices de tejido”, posibilita el estudio de múltiples genes en una determinada muestra, o bien de un gen sobre una matriz de múltiples muestras de tejido (229-231). Se fundamenta en la realización de “biopsias” cilíndricas a tejidos tumorales embebidos en parafina. Los Tissue-Arrays se han convertido en el método de referencia para el estudio, en series tumorales amplias, de perfiles de expresión génica deducidos mediante el análisis del ADN (mediante técnicas de hibridación FISH) (232), el ARN (mediante ISH) (233) o la expresión de la proteína mediante inmunohistoquímica (IHQ). Este último es el caso que se aplica para el objetivo de nuestro estudio (234, 235).

Esta tecnología permite el análisis de cientos de marcadores tumorales en secciones consecutivas del tumor, con un mínimo requerimiento tisular. Este aspecto es fundamental en los tiempos actuales, por cuanto cada vez se obtiene más información de las muestras del tumor a través de distintas técnicas, lo cual va mermando la cuantía de la muestra, amenazando con no disponer de material suficiente para todos los análisis que, con fines clínicos o investigadores, deseamos realizar (236).

Toda la serie tumoral es analizada a la vez, de modo que se garantiza la homogeneidad de las técnicas entre las muestras y se evitan así sesgos.

Homogeneidad
Ahorro de tejido
Todas las muestras a la vez
Expresión de DNA, RNA o proteínas

Tabla 21. Ventajas de la tecnología de Tissue-Arrays.

En un solo porta pueden analizarse hasta 500 muestras, con un área suficiente para la IHQ. La calidad de la tinción debe ser uniforme, y el gasto en reactivos y en tiempo es mínimo.

La construcción del TMA en nuestro estudio constó de dos partes (237):

a) Selección de los tejidos. De cada una las 160 muestras de tumor que se utilizaron para nuestro estudio se obtuvo un bloque de tejido parafinado. Con el microtomo se realizó un corte de unas 4 micras de grosor, que se tiñó con hematoxilina-eosina y fue examinado por un patólogo, que procedió a seleccionar un corte de tejido con

muestra tumoral suficiente. Se cogieron cilindros de muestra de 0,6 mm de diámetro. Asimismo se incluyeron también zonas de tejido sano para utilizar como controles en el TMA (en número de 25).

Inclusión de los tejidos en el bloque receptor. Se tomó un bloque de parafina virgen (receptor), y mediante una aguja se fueron realizando pequeñas perforaciones en las cuales se fueron incluyendo los cilindros procedentes de los bloques donadores de los 160 pacientes. Este proceso se realizó utilizando un Tissue-Arrayer (Manual Tissue Microarrayer). N° modelo: MTA1675. Beecher Instrument Inc, Wisconsin, USA).

El proceso lo podemos ver en la siguiente secuencia de imágenes (figuras 9 a 11):

Figura 9. Imagen del equipo básico de Tissue-Microarrayer utilizado para la construcción del TMA. Detalle de sus elementos más importantes

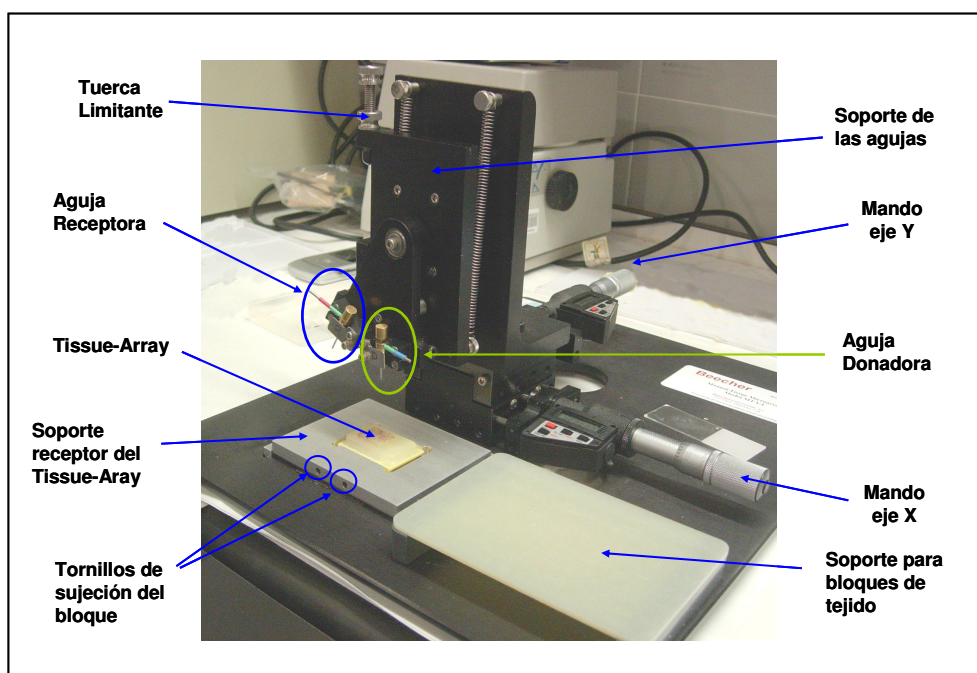


Figura 10. A. Bloque donador con las muestras de los 160 tumores, junto con 25 zonas sanas de control. B. Tissue-Arrayer con un bloque donador correspondiente a una muestra de tumor (derecha) y el bloque receptor (izquierda) esperando recibir la totalidad de las muestras procedentes de otros tantos bloques donadores.

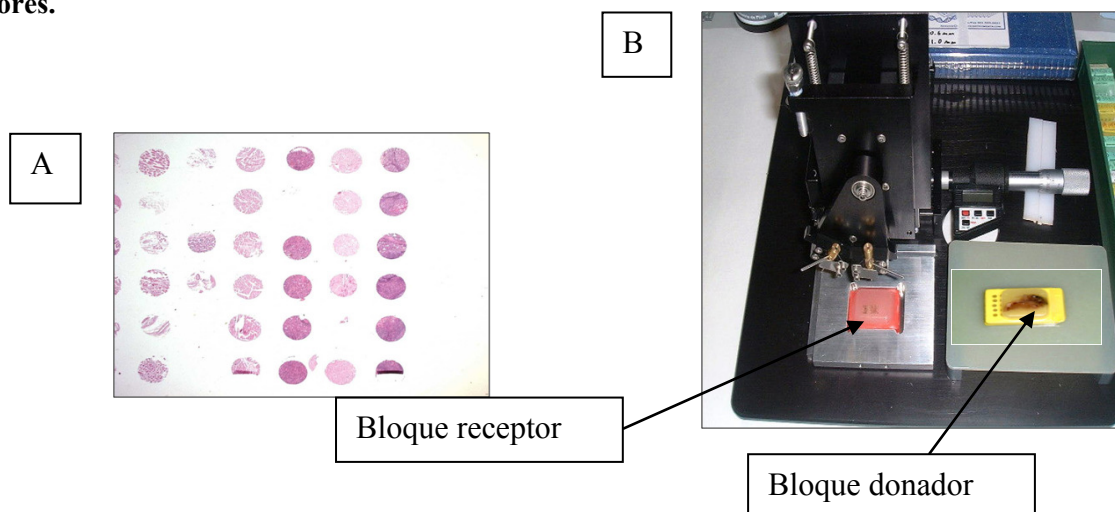
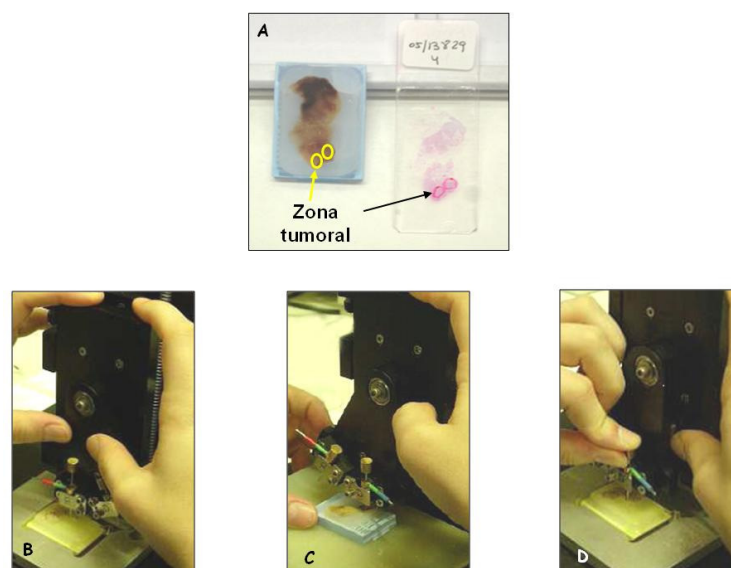


Figura 11. Pasos para la transferencia de un cilindro de tejido desde el bloque donador del tumor correspondiente (A) al bloque receptor común (B, C, D).



Se comprobó que se cumplían los criterios generales para validación de los datos que iban a ser obtenidos de la lectura del TMA (238, 239), que incluyen:

- Comparación con biopsias enteras
- Selección de diferentes zonas del tumor
- Utilización de al menos 2 ó 3 cilindros de cada muestra tumoral
- Durabilidad del antígeno

La tecnología de TMA para identificación de perfil de expresión proteico mediante inmunohistoquímica presenta ventajas adicionales en la fase de análisis, como son:

- Análisis simultáneo de gran número de muestras
- Destrucción mínima de los bloques de tejido originales
- Cada muestra se trata de forma idéntica (reconocimiento antigénico, concentración de los reactivos, tiempo de incubación, condiciones de temperatura y lavado constantes). Además, la cantidad de reactivos necesaria se minimiza.

Sin embargo, esa metodología no está exenta de limitaciones, a saber:

- Se pueden perder muestras en la seriación o durante el procesamiento del TMA
- Muestras que pueden no corresponder a tejido tumoral (es importante una buena selección de las mismas)
- El área de tejido analizado puede no ser representativa del tumor entero, por lo que se nos puede escapar información.

¿Cuáles son las posibles aplicaciones del análisis de TMA?

- Optimización de sondas y anticuerpos

- Validación en tumores humanos de los datos obtenidos en estudios con líneas celulares o modelos animales
- Análisis simultáneo y masivo del perfil molecular de cientos de tumores
- Validación de datos obtenidos en los cDNA Arrays
- Valoración del potencial diagnóstico, pronóstico y terapéutico de nuevos genes implicados en tumores humanos.
- Estudios colaborativos a gran escala de tumores incluidos en ensayos clínicos o tumores poco frecuentes.
- Banco de células y/o tejidos de organismos genéticamente modificados
- Mayor rentabilidad y aprovechamiento de los archivos de bloques de Patología.
- Estudios de control de calidad y mejora de las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas en la rutina diagnóstica.

Una vez construido el TMA se procede a cortarlo y almacenarlo.

El protocolo completo de la tecnología de construcción y almacenamiento de TMA utilizado para la realización de este estudio se adjunta como anexo II.

2-2. Metodología del estudio inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica se realizó sobre el material fijado en formol e incluido en la parafina, sobre las secciones de los Tissue-arrays de 4 micras colocadas en portas con xilol.

La valoración de la inmunorreactividad se realizó con un *immunostainer* automático. Los antígenos utilizados para la detección de las distintas proteínas analizadas se indican en la tabla 22.

Se analizaron dos discos de 1 mm de cada tumor y dos *cores* de cada control. Se valoraron también los cilindros con parénquima pulmonar no tumoral, para valorar la posible expresión de las proteínas a analizar en tejido sano. Todas las preparaciones inmunohistoquímicas fueron evaluadas independientemente por dos patólogos. Ninguno de ellos sabía a qué caso correspondía la preparación que estaban visualizando.

Los criterios de valoración dependieron de cada proteína analizada. Se trató de simplificar al máximo evaluando el porcentaje de células que presentaban inmunorreactividad dentro de la muestra, dando lugar a una puntuación cualitativa con el menor número de categorías posibles.

* * *

A continuación describimos el método de cuantificación de la expresión de las proteínas analizadas. En cada caso se partió de una revisión de la literatura al respecto, para decidir en qué puntos establecer la positividad o negatividad de la expresión de cada una de ellas.

Una vez calculado el porcentaje de células inmunorreactivas y asignada una categoría (habitualmente de 0 a 3), y dado que a la hora de realizar el análisis se deseaba establecer variables dicotómicas de expresión “Sí” o “No”, se agruparon dichas puntuaciones para formar dos únicos grupos: “Expresión Sí” o “Expresión No”.

Para ello se tuvieron en cuenta dos aspectos:

1. La revisión de la literatura al respecto.
2. La distribución de los valores de expresión de cada proteína. Es decir, si la inmunorreactividad de una proteína era positiva en más del 20 % de las células en muy pocos pacientes, no se estableció el punto de corte para positivo o negativo en 20 % (incluso aunque la literatura lo hiciera habitualmente). Ello es debido a que con muy pocos casos positivos y casi todos negativos, muy probablemente la valoración de la variable iba a resultar no significativa por falta de casos y por tanto no nos iba a dar ninguna información. Así pues se intentó establecer el punto de corte allá donde hubiera un número de casos positivos y negativos suficiente para un análisis estadístico adecuado. Evidentemente ese punto fue arbitrario en muchos casos.

Por otra parte, y salvo en casos muy concretos, valores de inmunorreactividad en menos del 5 % de las células nunca se consideraron como positivos, ya que está comprobado que incluso en tejido normal pueden aparecer pequeños focos de positividad IHQ (por propia expresión o por artefactos de la técnica) de algunas de las proteínas analizadas, lo cual podría llevar a confusión a la hora de interpretar los resultados. Así pues, generalmente el punto de corte entre “Positiva” y “Negativa” no se estableció por debajo del 5 % de células inmunorreactivas.

Cuando se evidenció discordancia en la puntuación entre los dos patólogos o entre los dos discos analizados, se corrigió habitualmente hacia el menor valor de inmunorreactividad. Sin embargo, detallamos esta circunstancia a continuación para todas y cada una de las proteínas analizadas.

Tabla 22. Nombres comerciales de los antígenos utilizados para el estudio inmunohistoquímico

Ciclina A	Novocastra. Clon 6E6. RefNCL-Ciclina A)	c-kit	DAKO Ref A4502
cdk1	BD Transduction Labs, Ref 610038	caspasa 3a	Cell signal 9662
cdk-2	Neo markers Clon 8D4. Ref MS-463-P1	catepsina D	DAKO. Ref M7243
ciclina E	Novocastra. Clon 13-A-3. Ref NCL-Ciclina E	msh2	N20 Santa Cruz biotech
p16	Santa Cruz, 1:50	mlh1	Abcam 9144
p53	DAKO DO7, 1:40	e-cadherina	DAKO 36135, 1:50
p27	Transduction Lab, 1:1000	beta-catenina	DAKO, 1:25
proteína del gen del retinoblastoma	BD Phar, 1:250	c-myc	Novocastra 1:250
mdm2	Oncogen, clon IF2	topoisomerasa II	IRE1 alfa ab
EGFR	Novocastra 1:25	timidilato sintasa	Clon T6-106 (ab3145)
c-erb2	DAKO 0485, 1:250		

3. VALORACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS DISTINTAS PROTEÍNAS ANALIZADAS

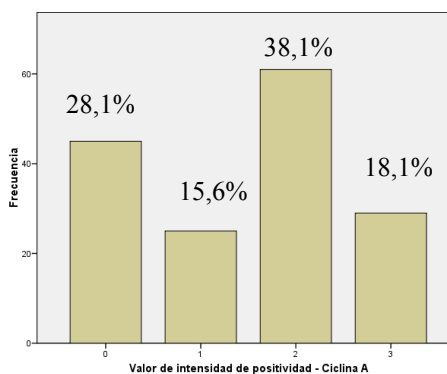
3-1. Ciclina A

El número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos:

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 5 % y un 30 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 50 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de ciclina A” se indica en la figura 12.

Figura 12. Distribución de los valores de expresión de ciclina A.



De igual manera que en estudios previos revisados en la bibliografía (240), y considerando la distribución de grados de expresión de la proteína, se ha considerado positiva la expresión de ciclina A si la inmunorreactividad era detectada en un 5 % o más de las células, de modo que las categorías 0 y 1 son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 son consideradas como expresión positiva.

Tabla 23. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	1	1
1	2	1
2	2	2
3	3	3

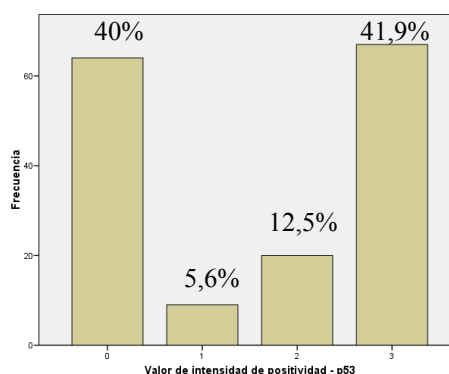
3-2. p53

El número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos (241, 242):

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 10 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 10 % y un 25 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 25 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de p53” se indica en la figura 13.

Figura 13. Distribución de los valores de expresión de p53.



En el caso de esta proteína se han realizado los estudios estableciendo dos puntos de corte de positividad diferentes (241). En primer lugar se ha considerado positivo si el número de células que marcaban era superior al 25 % (es decir considerando positivo solo el valor 3 y negativos los valores 0, 1 y 2), y en otro caso se ha considerado positivo si el número de células inmunorreactivas era mayor del 10 % (esto es, estimando como positivos los casos con valores 2 y 3, y como negativos los valores 0 y 1).

Tabla 24. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	1
2	0	1
3	3	3
2	3	3
3	2	3

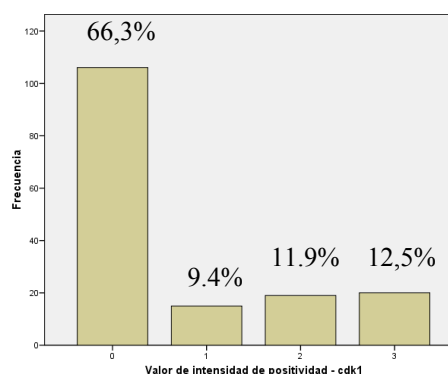
3-3. cdk1

El número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos:

0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
2. Inmunorreactividad en entre un 5 % y un 30 % de las células.
3. Inmunorreactividad en más de un 30 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de cdk1” se indica en la figura 14.

Figura 14. Distribución de los valores de expresión de cdk1.



Analizando en estudios previos revisados en la bibliografía (240), y adaptándolos a la expresión encontrada en nuestra serie, se ha considerado positiva la expresión de ciclina dependiente de quinasa 1 si la inmunorreactividad era detectada en más del 5 % de las células, de modo que las categorías 0 y 1, son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 son consideradas como expresión positiva.

Tabla 25. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
2	3	2
3	2	2
3	3	3

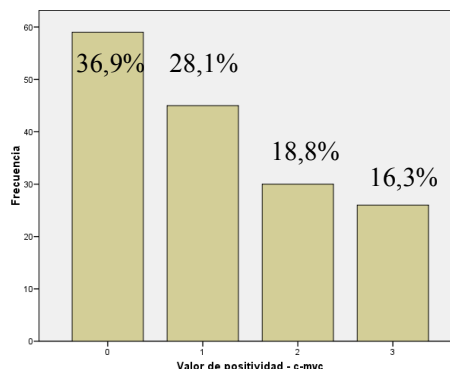
3-4. c-myc

El número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos:

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 5 % y un 20 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 20 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de c-myc” se indica en la figura 15.

Figura 15. Distribución de los valores de expresión de c-myc



De igual manera que en estudios previos revisados en la bibliografía (240) y la distribución de la expresión en nuestra serie se ha considerado positiva la expresión de c-myc si la inmunorreactividad era detectada en más del 5 % de las células, de modo que las categorías 0 y 1 son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 son consideradas como expresión positiva.

Tabla 26. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

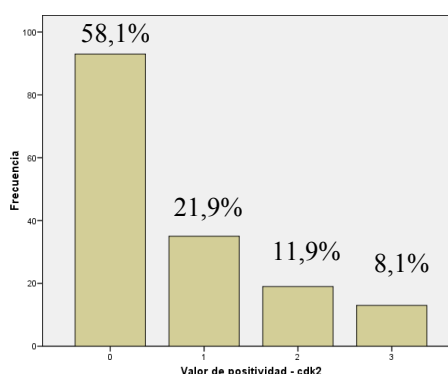
3-5. cdk-2

El número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos (240):

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 5 % y un 30 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 30 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de cdk2” se indica en la figura 16.

Figura 16. Distribución de los valores de expresión de cdk2.



De igual manera que en estudios previos revisados en la bibliografía (240) se ha considerado positiva la expresión de cdk-2 si la inmunorreactividad era detectada en más del 5 % de las células, de modo que las categorías 0 y 1 son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 son consideradas como expresión positiva. Sin embargo, en este caso también se ha hecho una segunda agrupación, considerando positivas todas aquellas muestras con alguna células positiva, es decir, las de categorías 1, 2 y 3, dejando como negativas exclusivamente las de categoría 0, es decir, sin ningún grado de expresión de la proteína.

Tabla 27. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
1	3	3
2	3	3
3	2	3
3	3	3

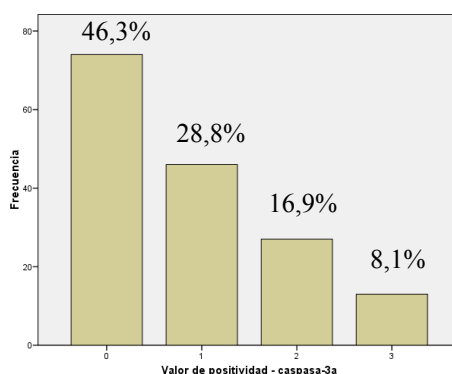
3-6. caspasa-3a

En este caso, y de manera acorde con estudios biomoleculares previos, la inmunorreactividad celular para esta proteína citoplasmática se ha evaluado de forma semicuantitativa:

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 25 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 25 % y un 50 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 50 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de caspasa-3a” se indica en la figura M6.

Figura 17. Distribución de los valores de expresión de caspasa-3a



De forma similar a otros estudios revisados en la literatura (243) se ha considerado positiva la expresión de caspasa3 si aparecía inmunorreactividad en más del 25 % de las células. Dicho de otro modo, las categorías 0 y 1 son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 lo son como expresión positiva.

Tabla 28. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

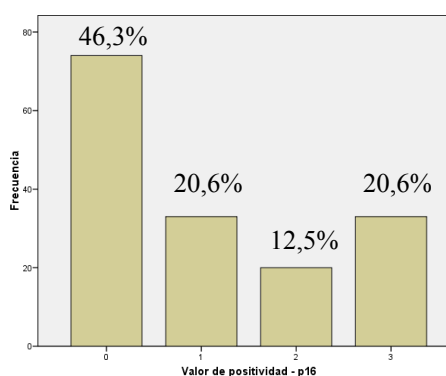
3-7. p16

El número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos (241, 243):

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 10 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 10 % y un 50 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 50 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de p16” se indica en la figura 18.

Figura 18. Distribución de los valores de expresión de p16



De forma similar a otros estudios revisados en la literatura (243) se ha considerado positiva la expresión de p16 si la inmunorreactividad era positiva en un 10 % o más de las células, por lo que las categorías 0 y 1 son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 lo son como expresión positiva.

Tabla 29. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

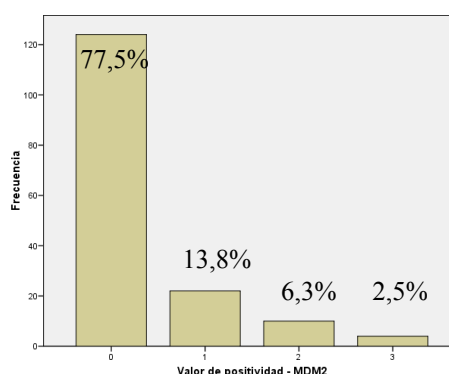
3-8. MDM2

En este caso la inmunorreactividad también se ha valorado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos (244):

0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
1. Inmunorreactividad en menos del 10 % de las células.
2. Inmunorreactividad en entre un 10 % y un 50 % de las células.
3. Inmunorreactividad en más de un 50 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de MDM2” se indica en la figura 19.

Figura 19. Distribución de los valores de expresión de MDM2



Como en proteínas anteriores, se ha considerado positiva la expresión de MDM2 si la inmunorreactividad era positiva en al menos el 10 % de las células, por lo que las categorías 0 y 1 son clasificadas aquí también como expresión negativa, siendo positivas las categorías 2 y 3.

Tabla 30. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

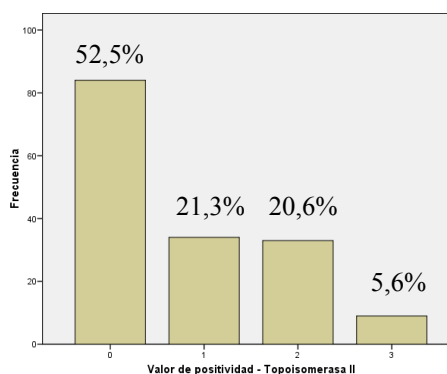
3-9. Topoisomerasa II alfa

El número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos (243):

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 10 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 10 % y un 50 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 50 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de Topoisomerasa II” se indica en la figura 19.

Figura 20. Distribución de los valores de expresión de MDM2



De forma similar a otros estudios revisados en la literatura (245) se ha considerado positiva la expresión de Topoisomerasa II si la inmunorreactividad era positiva en más del 10 % de las células, por lo que las categorías 0 y 1 son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 lo son como expresión positiva.

Tabla 31. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

3-10. MSH2

En estudios previos analizados se describen métodos de valoración diversos. Destacan los métodos de Friedrich y Kouso, con sus respectivos colaboradores (246, 247), que cuantificaban la inmunoreactividad multiplicando los valores del grado de intensidad por los valores que cuantificaban el número de células positivas.

El primer parámetro de este producto, es decir la cuantificación mediante variable cuantitativa discreta de la intensidad de la positividad de las células se categorizaba de la siguiente manera:

0. Ausencia absoluta de inmunoreactividad
1. Inmunoreactividad débil.
2. Inmunoreactividad moderada.
3. Inmunoreactividad intensa.

Por su parte la cuantificación del número de células positivas se convirtió también en variable cuantitativa discreta de la siguiente manera:

1. Positividad en no más del 10 % de las células.
2. Positividad en un número de células entre el 11 % y el 50 %.
3. Positividad de entre el 51 % y el 80 % de las células.
4. Positividad de más del 80 % de las células.

Este producto daba lugar a un valor resultante que se categorizó en grupos para dar con una variable cualitativa discreta de 0 a 3, de la siguiente manera:

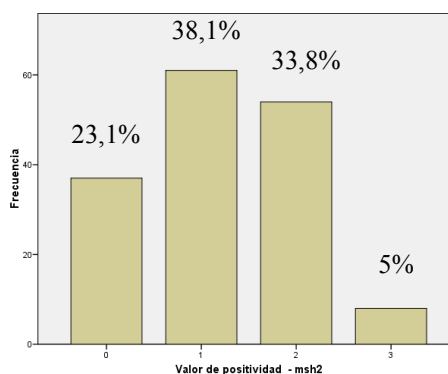
1. Producto = [0 – 1]; Producto = [2 – 4]; Producto = [5 – 8]; Producto = [9 – 12].

Nosotros hemos preferido dar un valor semicuantitativo sencillo a la evaluación. Sus resultados son equiparables al “score” que obtenían los autores citados. Así, para nosotros:

0. Fue positividad en menos del 5 % de las células.
1. Positivas entre el 5 y el 20 % de las células.
2. Positivas entre el 20 % y el 50 % de las células.
3. Positiva más del 50 % de las células

La distribución de los valores de la variable “expresión de msh2” se indica en la figura 20.

Figura 21. Distribución de los valores de expresión de msh2



En este caso se consideró expresión negativa de MSH2 en aquellas muestras con valor 0 ó 1, mientras que un valor positivo de 1 ó más fue suficiente para considerar positiva la expresión de MSH2 en esa muestra. Dicho de otro modo, se evaluaron como positivas aquellas muestras con positividad en más de un 5 % de las células.

Tabla 32. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

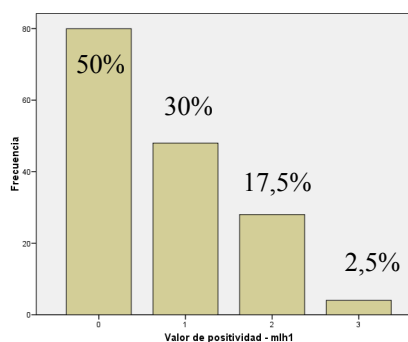
Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3

3-11. MLH1

Esta proteína, perteneciente también como hemos dicho en la introducción al *mismatch repair system (MMR)*, o sistema reparador de DNA, tiene características muy similares a la MSH2, por lo que la forma de definir y cuantificar su expresión ha sido similar (247). Remitimos pues al lector a la categorización descrita para la MSH2, así como a la tabla correspondiente.

La distribución de los valores de la variable “expresión de mlh1” se indica en la figura 21.

Figura 22. Distribución de los valores de expresión de mlh1



De igual manera, el valor 0 fue considerado expresión negativa de la proteína, mientras que el resto de valores se identificaron como expresión positiva (es decir, por encima del 5 % se evaluó como positiva).

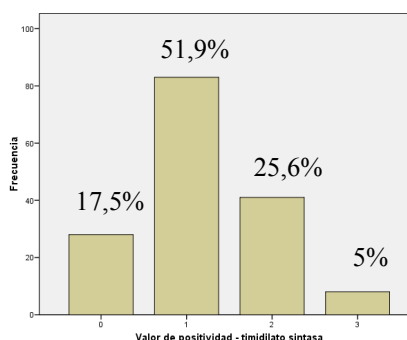
3-12. Timidilato Sintasa

En este caso la cuantificación de la inmunorreactividad se realizó utilizando una escala analógica visual, técnica realizada y validada en estudios previos sobre muestras de carcinoma broncogénico no microcítico en estadio precoz (220, 248). Dicha escala clasifica la inmunorreactividad en:

- 0. Nula.
- 1. Débil o parcheada (grado 1)
- 2. Moderada (grado 2)
- 3. Intensa (grado 3).

La distribución de los valores de la variable “expresión de Timidilato Sintasa” se indica en la figura 22.

Figura 23. Distribución de los valores de expresión de timidilato sintasa



Se tomó como expresión negativa de timidilato sintasa el valor 0. Los casos que indicaban cualquier tipo de expresión, es decir, los valores 1, 2 y 3 fueron considerados positivos para la expresión de timidilato sintasa.

Tabla 33. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3

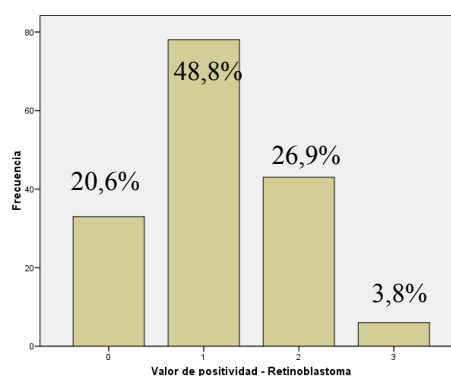
3-13. Proteína del gen del retinoblastoma

Como en otras proteínas ya citadas, y en base a estudios previos (241), el número de células positivas se ha clasificado de forma semicuantitativa dando lugar a los siguientes grupos:

- 0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad
- 1. Inmunorreactividad en menos del 10 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad en entre un 10 % y un 50 % de las células.
- 3. Inmunorreactividad en más de un 50 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de Retinoblastoma” se indica en la figura 23.

Figura 24. Distribución de los valores de expresión de retinoblastoma



De forma similar a otros estudios revisados en la literatura (192, 241) se ha considerado positiva la expresión de la proteína del Rb si la inmunorreactividad era positiva en un 10 % o más de las células, por lo que las categorías 0 y 1 son clasificadas como expresión negativa mientras que las categorías 2 y 3 lo son como expresión positiva.

Tabla 34. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

3-14. e-cadherina

En este caso se tuvo en cuenta tanto el número de células positivas como la intensidad de dicha positividad (249).

Porcentaje de células positivas mayor o menor de 75 %

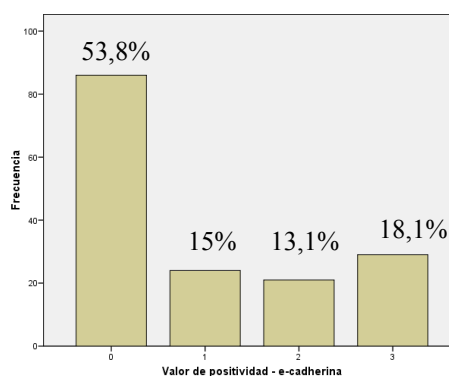
Intensidad: Negativa, débil, moderada y fuerte.

Combinando ambos scores se ha obtenido una puntuación final que define la positividad para la proteína en los distintos cortes:

- 0. Inmunorreactividad negativa.
- 1. Positividad de intensidad débil en menos del 75 % de las células.
- 2. Positividad de intensidad moderada o fuerte en menos del 75 % de las células.
- 3. Positividad de intensidad moderada o fuerte en más del 75 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de e-cadherina” se indica en la figura 27.

Figura 25. Distribución de los valores de expresión de e-cadherina



De forma similar a otros estudios revisados en la literatura (249) se ha considerado positiva la expresión de E-cadherina solo en casos de positividad moderada o fuerte en más del 75 % de las células, es decir se evaluó como positivo el valor 3, únicamente.

Tabla 35. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

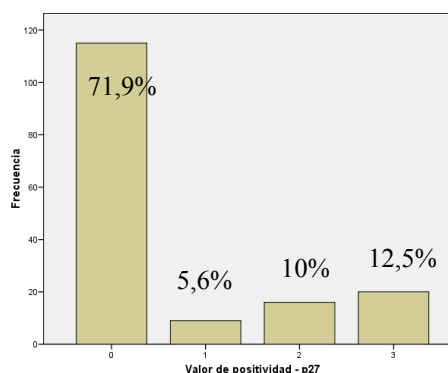
3-15. p27

De nuevo se clasificó la inmunorreactividad en función del número de células positivas (250).

- 0. No inmunorreactividad.
- 1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad entre un 5 y un 20 % de las células
- 3. Inmunorreactividad en más del 20 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de p27” se indica en la figura 28.

Figura 26. Distribución de los valores de expresión de p27



Se establecieron tres posibles puntos de corte a la hora de considerar positiva la expresión de p27:

- 1. Considerando negativo el valor 0 y positivo cualquier otro valor (es decir, cualquier positividad de las células).
- 2. Considerando negativos los valores 0 y 1 y positivos a partir de 2 (es decir por encima del 5 % de las células).
- 3. Considerando negativos los valores de 0 a 2 y positivo solo el 3 (es decir, por encima del 20 % de las células).

Tabla 36. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

3-16. Catepsina D

De nuevo se clasificó la inmunorreactividad en función del número de células positivas:

0. No inmunorreactividad.
1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
2. Inmunorreactividad entre un 5 y un 20 % de las células
3. Inmunorreactividad en más del 20 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de catepsina D” se indica en la figura 29.

Se establecieron tres posibles puntos de corte a la hora de considerar positiva la expresión de catepsinaD:

1. Considerando negativo el valor 0 y positivo cualquier otro valor (es decir, cualquier inmunorreactividad).
2. Considerando negativos los valores 0 y 1 y positivos a partir de 2 (es decir, a partir de 5 % de células positivas).
3. Considerando negativos los valores de 0 a 2 inclusive y positivo solo el 3 (es decir, por encima del 20 % de células positivas).

Figura 27. Distribución de los valores de expresión de catepsina D

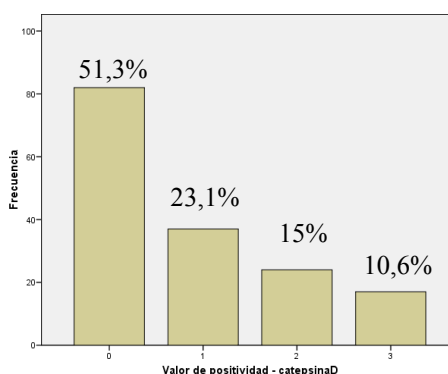


Tabla 37. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	1	3
3	3	3

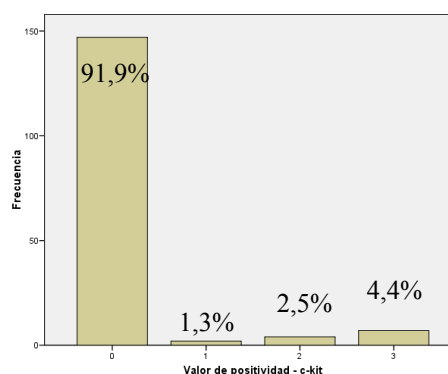
3-17. c-kit

Una vez más se clasificó la inmunorreactividad en función del número de células positivas:

- 0. No inmunorreactividad.
- 1. Inmunorreactividad en menos del 30 % de las células.
- 2. Inmunorreactividad entre un 30 y un 50 % de las células
- 3. Inmunorreactividad en más del 50 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de c-kit” se indica en la figura 30.

Figura 28. Distribución de los valores de expresión de c-kit



Aquí se consideró positiva la expresión de c-kit con valores superiores a 1, es decir con un más de un 30 % de células positivas. Valores de 0 y 1 fueron considerados como expresión negativa de c-kit.

Tabla 38. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	1	3
3	3	3

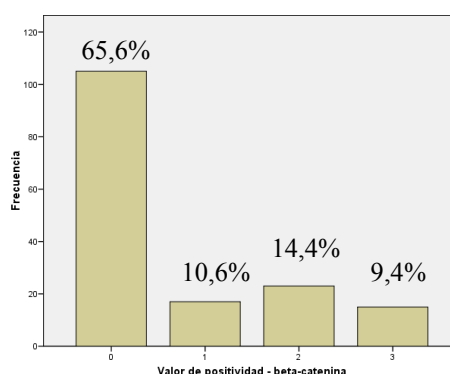
3-18. Beta-catenina

De forma superponible a otras moléculas ya citadas, la positividad de la beta-catenina se midió de la siguiente manera:

0. No inmunorreactividad.
1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
2. Inmunorreactividad entre un 5 y un 20 % de las células
3. Inmunorreactividad en más del 20 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de beta-catenina” se indica en la figura 31.

Figura 29. Distribución de los valores de expresión de beta-catenina



Se consideró positiva la expresión de beta-catenina (251, 252) cuando la positividad fue mayor del 5 % (> 1) o cuando se detectó en la membrana o en núcleo de la célula.

Tabla 39. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	1	3
3	3	3

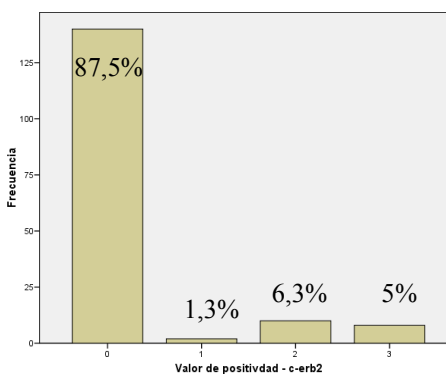
3-19. c-erb2

Una vez más se clasificó la inmunorreactividad en función del número de células positivas:

0. No inmunorreactividad.
1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
2. Inmunorreactividad entre un 5 y un 20 % de las células
3. Inmunorreactividad en más del 20 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de c-erb2” se indica en la figura 32.

Figura 30. Distribución de los valores de expresión de c-erb2



Se consideró positiva la expresión de c-erb2 cuando la inmunorreactividad fue positiva en más del 5 % de las células, es decir, con valores de 2 ó 3 según lo descrito previamente.

Tabla 40. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	1	3
3	3	3

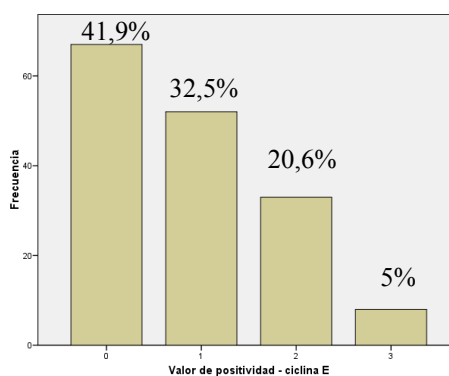
3-20. Ciclina-E

En este caso el grado de inmunorreactividad se evaluó de forma similar al c-erb2 previamente descrito. Lo recordamos:

0. No inmunorreactividad.
1. Inmunorreactividad en menos del 5 % de las células.
2. Inmunorreactividad entre un 5 y un 20 % de las células
3. Inmunorreactividad en más del 20 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de ciclina E” se indica en la figura 33.

Figura 31. Distribución de los valores de expresión de ciclina E



Se consideró positiva la expresión de ciclina-E cuando la inmunorreactividad fue positiva en más del 5 % de las células, es decir, con valores de 2 ó 3.

Tabla 41. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

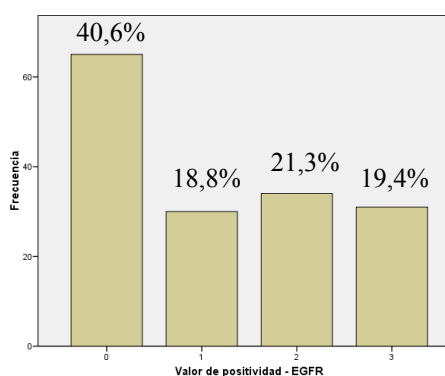
3-21. EGFR

Siguiendo estudios previos (253), la inmunorreactividad de las células a la hora de detectar la expresión de EGFR se clasificó en cuatro categorías, una vez más:

0. Ausencia absoluta de inmunorreactividad.
1. Inmunorreactividad en no más del 1 % de las células.
2. Positividad en un porcentaje de células entre el 1 % y el 10 %.
3. Inmunorreactividad positiva en más del 10 % de las células.

La distribución de los valores de la variable “expresión de EGFR” se indica en la figura 34.

Figura 32. Distribución de los valores de expresión de EGFR



Se consideró positiva la expresión de EGFR cuando la inmunorreactividad fue positiva en más del 1 % de las células, es decir, con valores de 2 ó 3.

Tabla 42. Valor global asignado en función de la inmunorreactividad en los dos niveles del bloque de parafina evaluados o del resultado discordante entre las puntuaciones de los dos patólogos

Nivel A	Nivel B	Valor
0	0	0
0	1	0
1	0	0
1	1	1
1	2	1
2	1	1
2	2	2
0	2	2
2	0	2
2	3	3
3	2	3
3	3	3

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron los siguientes análisis estadísticos:

1. Estudio descriptivo de la serie.

Se describen las variables clínicas (demográficas, basales, relacionadas con el tumor y con el tipo de intervención quirúrgica) que hemos definido previamente. Se muestran en gráficos de sectores o en histogramas de frecuencias. Las variables cuantitativas continuas se expresan como media y mediana con desviación estándar. El estudio de la sensibilidad de las pruebas diagnósticas se expresa como el cociente en porcentaje entre el número de pruebas positivas y el total de pacientes con diagnóstico de tumor, que en esta serie es el N global, es decir 160 casos.

2. Análisis de supervivencia. Estudios univariantes:

a. Supervivencia global y libre de recidiva de la serie, estimada mediante el método de Kaplan y Meier, expresando la supervivencia global y libre de recidiva a 1, 3 y 5 años. Se indican también los estadísticos de frecuencia (medias, medianas y cuartiles para ambas distribuciones de frecuencias). Se expresan los intervalos de confianza al 95 % para media y mediana, así como el error típico para primer y tercer cuartiles. Se representan a continuación las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad del total de la serie, según el citado método de Kaplan y Meier (221).

b. Patrón de mortalidad y recidivas, clasificando la causa de mortalidad y el tipo de recidiva según hemos indicado previamente. Se representan las gráficas de densidad de probabilidad de mortalidad durante los 5 y los 10 primeros años de seguimiento, tanto de forma global, como en función de la causa de fallecimiento. Igualmente se representan las funciones de densidad de probabilidad de recidiva de la serie global y subdividida en función del tipo de recidiva.

c. Supervivencia en función de factores demográficos, como el género y la edad (con el punto de corte que ya hemos definido de 70 años).

d. Supervivencia en función de factores derivados del tumor, como son el tipo histológico, el grado de diferenciación, el estadio y la clasificación TNM.

e. Supervivencia en función de factores derivados del procedimiento quirúrgico, concretamente del tipo de resección (segmentaria, lobectomía o neumonectomía), tratando de investigar si hay alguna de esas resecciones que se diferencia del resto en cuanto a pronóstico.

f. Supervivencia en función de factores biomoleculares. La forma de realizar este análisis para las 21 proteínas estudiadas se detalla en la tabla 43.

3. Patrón de expresión de las distintas proteínas analizadas en función de las variables fumador, tipo histológico y grado de diferenciación.

4. Estudio multivariante. Se plantea desarrollar un modelo de regresión logística con finalidad predictiva incluyendo las variables de cualquier tipo que se hayan comportado como factor pronóstico en el estudio uni-

variante. Se desarrollan sendos modelos para supervivencia global y para supervivencia libre de recidiva.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS (IBM Systems®) en su versión 18.0. Para los estudios de variables cuantitativas se ha utilizado el test de *Chi cuadrado de Pearson* o el *test exacto de Fisher*. La comparación en el estudio univariante de las curvas de supervivencia en función de la expresión de las distintas proteínas se ha hecho con el test de log-rank (223), como ya hemos dicho. Sin embargo, en todos los casos se han aplicado también los tests de Breslow (254) y de Tarone-Ware (255, 256). En el modelo de regresión logística para las variables que resultan comportarse como factor pronóstico independiente se expresa el Hazard Ratio o Tasa de Riesgo, junto con su intervalo de confianza el 95 %. Se considera significativo un valor de p inferior de 0,05 ($p < 0,05$). Sin embargo, en el estudio multivariante fueron incluidos factores que en el univariante mostraron unas diferencias bien estadísticamente significativas, o bien solo tendentes a la significación, con un valor de p por debajo de 0,1.

Tabla 43

Metodología de análisis de supervivencia en relación con la expresión de las proteínas estudiadas
<p><u>“Tasa de expresión de la proteína”</u>: Determinación de en qué proporción de las muestras analizadas se expresan dichas proteínas y a qué intensidad de inmunorreactividad corresponden las categorías positiva y negativa (ver sección de material y métodos).</p> <ul style="list-style-type: none"> • <u>“Expresión en función del tipo histológico”</u>: Desarrollo de una tabla de contingencia que determine el nivel de expresión en función del tipo histológico del tumor, buscando si existen diferencias significativas en función de los grupos. • <u>“Expresión en función del grado de diferenciación”</u>: Desarrollo de una segunda tabla de contingencia en que se ponga de manifiesto la expresión de la proteína en función del grado de diferenciación del tumor, analizando igualmente si hay diferencias en función de dicha variable. • <u>“Supervivencia global”</u>: Análisis del nivel de expresión de la proteína como potencial factor pronóstico de supervivencia global. <ul style="list-style-type: none"> Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank <ul style="list-style-type: none"> Del global de la serie Estratificando por tipo histológico y grado de diferenciación (si la expresión era diferente en función de alguna de dichas variables según las tablas de contingencia) Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox • <u>“Supervivencia libre de recidiva”</u>: Análisis del nivel de expresión de la proteína como potencial factor pronóstico de recidiva. <ul style="list-style-type: none"> Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank <ul style="list-style-type: none"> Del global de la serie Estratificando por tipo histológico y grado de diferenciación (si la expresión era diferente en función de alguna de dichas variables según las tablas de contingencia) Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox • <u>“Conclusiones”</u>: resumen de los hallazgos en el estudio de la variable. <p>En las proteínas en las que la intensidad de inmunorreactividad ha sido cuantificada de más de una manera los pasos arriba reseñados se repiten para las distintas formas en que se ha realizado dicha evaluación.</p>

RESULTADOS



RESULTADOS

La selección de forma retrospectiva de casos que cumplieran los criterios de inclusión dio lugar a un grupo de 160 pacientes intervenidos entre marzo de 1997 y diciembre de 2005.

Todos ellos habían sido operados con intención curativa por carcinoma broncogénico no microcítico.

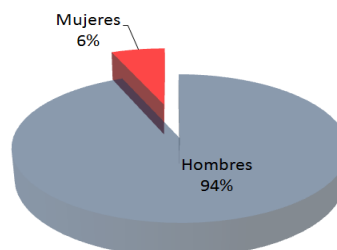
La recogida de todos los datos de la serie se hizo de forma prospectiva y a tiempo real por parte del propio equipo quirúrgico.

1. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE

1-1. DATOS BASALES Y DEMOGRÁFICOS

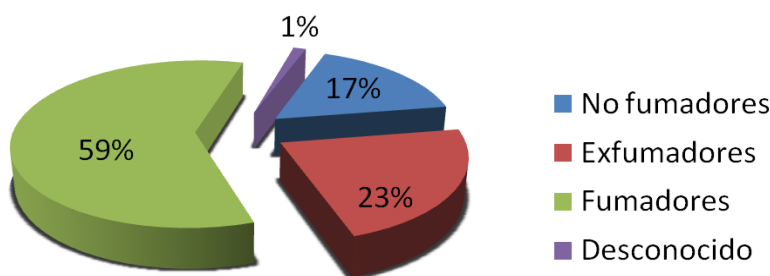
En la tabla 44 se hace referencia a los datos basales y demográficos de los pacientes. De los 160 pacientes un total de 150 (93,7 %) eran hombres y 10 (6,3 %) fueron mujeres (figura 33). La edad media en el momento de la cirugía de resección pulmonar fue de 65,8 años, con una edad máxima de 87 años y una edad mínima de 46 años. La mediana de edad fue de 67 años, con una desviación típica de 8,2 años.

Figura 33. Género de los pacientes de la serie.



Veintisiete pacientes (16,9 %) no eran ni habían sido fumadores, 95 pacientes (59,4 %) eran fumadores activos y 36 (22,5 %) eran exfumadores, entendiéndose como tales los que habían cesado en el hábito tabáquico al menos 6 meses antes de la fecha de la intervención quirúrgica. Los pacientes que habían dejado de fumar en los últimos 6 meses se consideraron fumadores activos. En dos casos (1,3 %) no se conocía esta variable (figura 34).

Figura 34. Distribución de la serie en función de la variable “fumador”



En el momento de la intervención quirúrgica 89 pacientes (55,6 %) tenían algún síntoma relacionado con su enfermedad, mientras que 71 (44,4 %) pacientes estaban asintomáticos desde el punto de vista de su tumor primario pulmonar. Respecto al índice de Karnofsky (tabla 18), 149 de los pacientes de la serie presentaban un índice de 90 ó 100. Solo en 8 casos fue inferior, con un performance status de 80. En 3 casos no está reseado este dato en la historia clínica.

La mayoría de los pacientes, un total de 136 (85 %), presentaba algún tipo de comorbilidad asociada en el momento de la intervención quirúrgica (tabla 45).

Así, 55 (un 34,4 % de la serie) estaban diagnosticados de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bien en su forma de bronquitis crónica o de enfisema pulmonar.

Tabla 44. Características demográficas y basales de los pacientes incluidos en el estudio.

Características	Total de pacientes (N = 160) Media ± desviación estándar o frecuencia en porcentaje
Edad [años]	67 ± 8,2 (rango 46-81)
Género:	
Hombre	150 (93,7 %)
Mujer	10 (6,3 %)
Tabaquismo	
Activo	83 (51,9 %)
Exfumador/a	71 (44,4 %)
No fumador/a	27 (16,9 %)
Performance status (Karnofsky)	
100	55 (34,9 %)
90	94 (58,7 %)
80	8 (5,4 %)
NR	3 (1,9 %)
Comorbilidad asociada	
Sí	136 (85 %)
No	24 (15 %)

Quince pacientes (9,4 %) tenían antecedentes de tuberculosis pulmonar, con distintos grados de secuelas respiratorias, si bien todos ellos habían recibido un tratamiento completo y correcto y en ningún caso existía contraindicación para la cirugía de resección pulmonar debido a esta circunstancia.

Veinte pacientes (12,5 %) presentaban hipertrofia benigna prostática, la mayoría de los casos en tratamiento. Sin embargo ninguno tenía antecedentes o sospecha de neoplasia prostática. Incluso se descartaron los adenomas prostáticos.

Un total de 32 pacientes (2,5 %) eran hipertensos en el momento de la intervención, todos ellos con tratamien-

to adecuado y buen control de esta patología. Otros 15 (9,4 %) tenían diagnóstico de algún tipo de vasculopatía periférica, la mayor parte de ellos claudicación intermitente, insuficiencia venosa crónica, o vasculopatía diabética. De hecho 22 pacientes (13,7 %) eran diabéticos, la mayoría de ellos con diabetes mellitus de tipo 2.

Desde el punto de vista cardiológico, 19 (11,9 %) tenían antecedentes de cardiopatía isquémica previa, que en ningún caso contraindicaba la intervención, y otros 10 (6,3 %) padecían algún tipo de arritmia, la mayor parte de ellos arritmias supraventriculares, destacando la fibrilación auricular. Finalmente, 79 de los 160 pacientes (49,4 %) tenían algún otro tipo de patología reseñada en la base de datos como comorbilidad, aunque ninguna tenía naturaleza oncológica ni influía en el momento de la indicación o el planteamiento terapéutico del paciente.

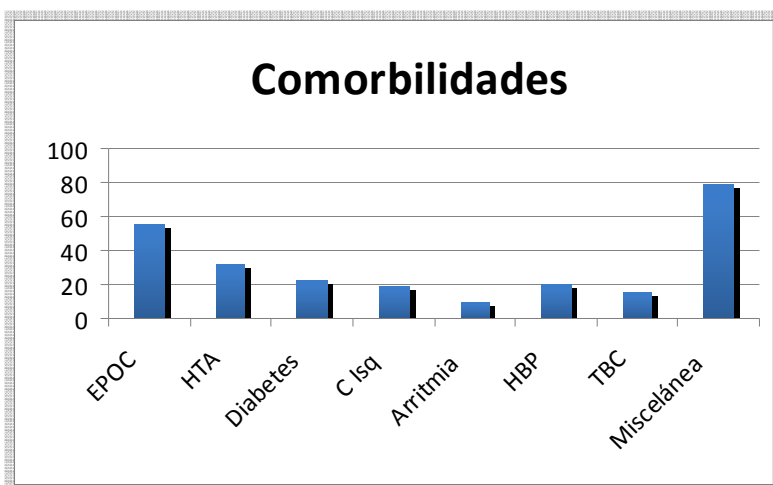
1-2. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

1-2.1. Diagnóstico del tumor

Respecto a las pruebas diagnósticas, todos los pacientes contaban con una radiografía de tórax y una TC antes de la intervención. De los 138 pacientes a los que se realizó citología de esputo, ésta resultó positiva en 41 de ellos, lo cual supone una sensibilidad del 29,7 %. Se hizo broncoscopia en 138 de los pacientes (86,2 %). Ésta resultó negativa, es decir, no encontró ninguna lesión sospechosa de malignidad en todo el árbol bronquial, en 72 casos (52,2 %). En gran parte de estos casos se realizó cepillado bronquial a ciegas en función de la zona donde las pruebas de imagen mostraban que podría localizarse el tumor. En 13 casos (9,4 %) se apreció alguna imagen dudosa e inespecífica que podría ser compatible con lesión tumoral, tomando muestra histológica (citología y/o biopsia) de dicha área. En 53 casos (38,4 %) se encontró una lesión de aspecto tumoral macroscópicamente, de la cual se tomó biopsia.

Tabla 45. Comorbilidad asociada a los pacientes del estudio en el momento de la intervención quirúrgica.

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica; HTA: hipertensión arterial; C Isq: cardiopatía isquémica; TBC: tuberculosis.



De los 128 casos en que se hizo cepillado bronquial (bien a ciegas, bien sobre una lesión macroscópicamente visible), en 70 casos fue positiva para malignidad, lo cual supone una sensibilidad del 54,6 %, si bien incluye co-

mo hemos dicho toma de citología sobre lesiones visibles en unos casos y sobre el bronquio supuestamente más cercano al área de la lesión en otros. Por último, de los 64 casos en que se realizó biopsia bronquial de alguna lesión visible macroscópicamente o bien alguna área sospechosa, en 55 fue diagnóstica de malignidad, lo cual supone una sensibilidad de la prueba en esas circunstancias particulares del 85,9 %.

Se realizó punción aspiración con aguja fina (PAAF) transtorácica en 51 casos. En todos ellos existía una lesión pulmonar visible en la TC y accesible por vía transtorácica. Todas estas punciones fueron realizadas por el mismo equipo de radiólogos bajo control de TC. De ellas, 45 fueron positivas para malignidad y por tanto diagnósticas, lo cual supone una sensibilidad de la prueba en estos pacientes del 88,2 %.

1-2.2. Estadificación preoperatoria

La estadificación clínica se realizó mediante tomografía computarizada (TC). En aquellos pacientes en que no se apreciaban adenopatías mediastínicas de tamaño mayor de 1 centímetro en su eje mayor no se hizo ninguna prueba destinada a confirmar histológicamente la negatividad de las mismas. En casos en que se evidenciaba en la TC alguna adenopatía mediastínica en región N2 con un tamaño superior a 1 centímetro en su eje mayor se procedió a confirmar histológicamente la positividad de dichas adenopatías por medio de mediastinoscopia.

Se efectuaron 5 mediastinoscopias, todas las cuales fueron negativas.

La inclusión de pacientes en el estudio se realizó antes de que la tomografía por emisión de positrones (PET) se incluyera de rutina en el estudio de extensión del carcinoma broncogénico (lo que ha venido a llamarse “*era pre-PET*”), por lo que esta prueba no se realizó en ninguno de los pacientes.

1-2.3. Valoración funcional preoperatoria

Se realizó en la mayor parte de los casos mediante espirometría. Se disponía de los datos espirométricos de 130 de los 160 pacientes.

La capacidad vital forzada media fue en términos absolutos de 3034 centímetros cúbicos (cc), mientras que el volumen espirado en el primer segundo (VEMS) presentó un valor medio de 2089 cc también medido en términos absolutos. En el caso del VEMS el valor mínimo fue de 840 cc y el máximo de 2510 cc.

La media del valor del porcentaje de la CVF y el VEMS respecto de los valores predichos para cada paciente fue de 76,5 % y 72,7 % respectivamente.

1-3. CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR

1-3.1. Localización anatómica

Setenta y cinco de los 160 tumores (47 %) estaban localizados en el lado derecho, mientras que 85 (53 %) fueron izquierdos (figura 35).

La localización específica en los distintos lóbulos pulmonares se refleja en la figura 36. Más de la mitad de los

tumores (61,2 %) se ubicaban en los lóbulos superiores, a partes iguales en el lado derecho e izquierdo (49 casos en cada lado). En el lóbulo inferior izquierdo se hallaron el 13 % de los tumores. Un 10 % en el lóbulo inferior derecho, un 8,7 % en bronquio principal izquierdo, un 4,4 % en lóbulo medio, un 1,25 % (2 casos) en el bronquio principal derecho y otros dos casos en el bronquio intermediario.

Figura 35: distribución por lado de los tumores.

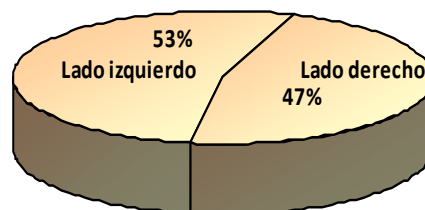
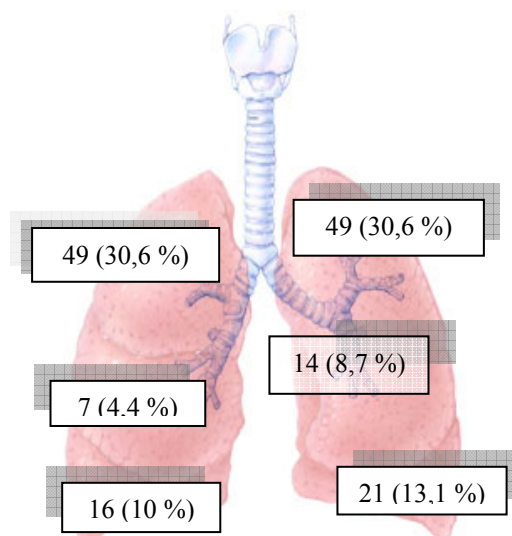


Figura 36. Localización de los tumores



1-3.2. Clasificación histológica y grado de diferenciación

La distribución de la serie en función del tipo histológico se indica en la figura 37. Un total de 99 casos (61,9 %) fueron carcinomas epidermoides, 52 (32,6 %) adenocarcinomas y 9 (5,7 %) indiferenciados de células grandes. Respecto al grado de diferenciación (figura 38) hubo 48 bien diferenciados (30 %), 72 moderadamente diferenciados (45 %), 31 pobremente diferenciados (19,4 %) y 9 indiferenciados (5 %).

Figura 37: Tipo histológico

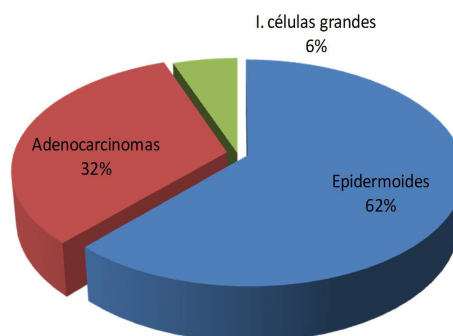
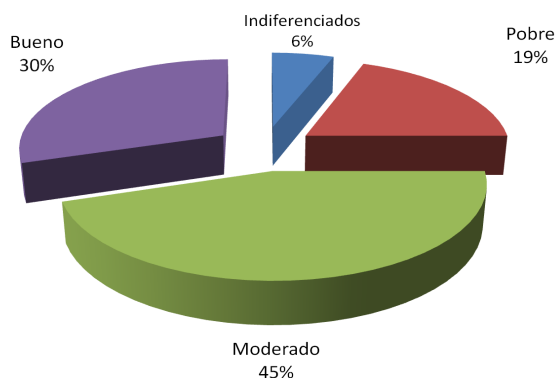


Figura 38: Grado de diferenciación



1-3.3. Estadio tumoral. Clasificación TNM

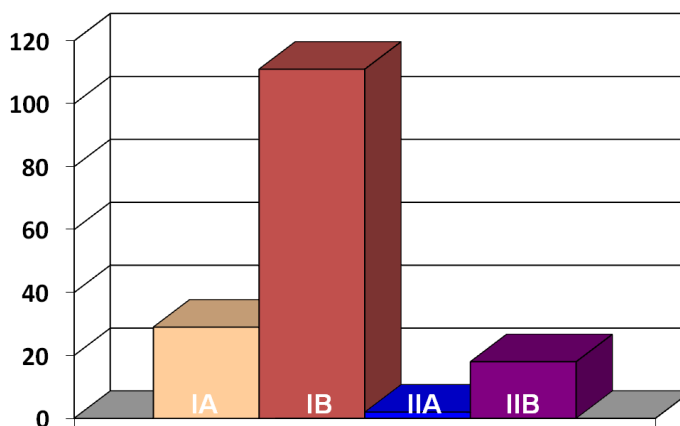
Un total de 140 pacientes (87,5 %) presentaban un carcinoma broncogénico no microcítico en estadio quirúrgico-patológico I, mientras que los 21 restantes (12,4 %) lo tenían en estadio II, es decir, presentaban al menos una adenopatía positiva en territorio N1 del sistema de estadificación internacional de Mountain de 1996 (47), es decir en territorios 10 y/o 11.

La distribución final fue (figura 39):

- 29 casos (18,1 %) en estadio IA
- 111 casos (62,5 %) en estadio IB
- 2 casos (8,1 %) en estadio IIA y
- 18 casos (11,3 %) en estadio IIB.

Todos los estadios I incluían tumores T1-T2N0M0 (IA-IB), mientras que todos los estadios II incluían tumores T1-T2N1M0 (IIA-IIB). No hubo ningún caso de T3N0M0 que también habría podido ser incluido como estadio II (en este caso IIB).

Figura 39: Clasificación en función del estadio del tumor



1-4. CARACTERÍSTICAS DE LA CIRUGÍA

1-4.1. Tipo de resección

Todos los pacientes fueron intervenidos con intención curativa, es decir, con fines radicales, conforme a las recomendaciones de resección en el carcinoma broncogénico no microcítico (67, 88, 224, 227).

Se realizaron (figura 40):

Resecciones segmentarias: 31 (19,4 %)

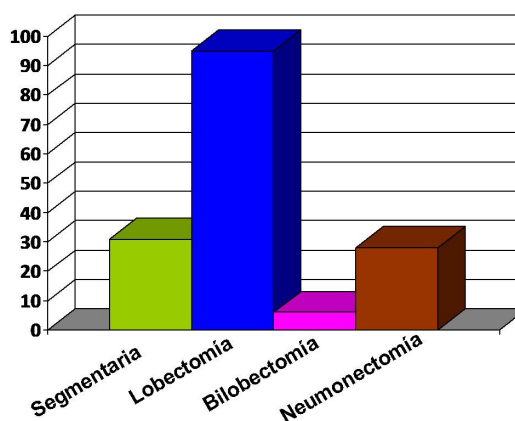
Lobectomías: 95 (59,4 %)

Bilobectomías: 6 (3,4 %)

Neumonectomías: 28 (17,5 %). De ellas, 20 fueron izquierdas y 8 derechas.

Los criterios para decidir la realización de una resección segmentaria en lugar de una lobectomía, bilobectomía o neumonectomía, fueron la situación funcional límite del paciente o su comorbilidad. Por estadios, la distribución del tipo de resección queda conforme se aprecia en la tabla 46.

Figura 40: Clasificación en función del tipo de resección quirúrgica realizada.



Durante el procedimiento quirúrgico, además de la resección pulmonar, se realizó en todos los casos una disección ganglionar sistemática del mediastino (67), es decir, una linfadenectomía mediastínica sistemática, incluyendo las siguientes regiones:

- En el lado derecho:
 - Paratraqueal derecha alta (2R)
 - Paratraqueal derecha baja (4R)
 - Traqueobronquial o hiliar (10)
 - Subcarinal (7).
 - De forma variable en algunos casos se incluyeron:
 - Paraesofágica (8)
 - Ligamento pulmonar (9).

- En el lado izquierdo:
 - Lóbulo superior izquierdo:
 - Para-aórtica (6)
 - Sub-aórtica (5)
 - Subcarinal (7)
 - Traqueobronquial o hiliar (10)
 - Lóbulo inferior izquierdo:
 - Subcarinal (7)
 - Traqueobronquial o hiliar (10)
 - Paraesofágica (8)
 - Ligamento pulmonar (9)
 - De forma variable se incluyeron las regiones 5 y 6.

Tabla 36: Tipo de resección por estadio tumoral

Tipo de resección	Estadio				
	IA	IB	IIA	IIB	Total
Segmentaria	8	21	1	1	95
Lobectomía	20	65	1	9	95
Bilobectomía	1	5	0	0	31
Neumonectomía	0	20	0	8	28

Todas las resecciones quirúrgicas fueron realizadas a través de una toracotomía posterolateral. El paciente se posicionó en todos los casos en decúbito lateral contralateral al lado a intervenir. Se realizó intubación orotraqueal selectiva con tubo de doble luz para colapso del pulmón a operar.

Todos los procedimientos quirúrgicos fueron realizados por un mismo equipo de cirujanos con criterios homogéneos y consensuados en cuanto a indicación, tipo de resección, técnica quirúrgica, protocolos de cuidados postoperatorios y seguimiento.

1-4.2. Complicaciones

Aparecieron complicaciones postoperatorias en 45 casos (28,1 %). Entre ellas cabe señalar:

- Infección de la herida quirúrgica en 8 casos
- Infección respiratoria/neumonía en 8 casos
- Arritmias en 23 casos (22 de ellos taquicardias supraventriculares)

- Fuga aérea persistente en 7 casos
- Empiema en 2 casos
- Atelectasias en 22 casos
- Hemotórax en 4 casos
- Tromboembolismo pulmonar, como manifestación de una enfermedad tromboembólica venosa (ETE), en 1 caso
- Infarto agudo de miocardio, en 1 caso

Como ya hemos dicho, en la muestra seleccionada no se incluye ningún caso de mortalidad postoperatoria. De manera que todos los pacientes que presentaron complicaciones postquirúrgicas se recuperaron de ellas satisfactoriamente y se consideró que su presencia no condicionó su situación clínica a largo plazo.

2. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

2-1. SUPERVIVENCIA GLOBAL DE LA SERIE

Para la totalidad de la serie la **supervivencia estimada** según el método de Kaplan y Meier a uno, tres y cinco años desde el momento de la resección pulmonar fue de 93,1 %, 67,4 % y 54,4 % respectivamente. La **supervivencia estimada libre de enfermedad** a uno, tres y cinco años fue 83,7 %, 61,9 % y 51,9 % respectivamente.

SERIE GLOBAL	1 año	3 años	5 años
Supervivencia global	93,1 %	67,4 %	54,4 %
Supervivencia libre de enfermedad	83,7 %	61,9 %	51,9 %

Media de supervivencia global: 82,4 meses [IC al 95 % (70,9 – 93,9)]

Mediana de supervivencia global: 73 meses [IC al 95 % (52,4 – 93,6)]

Primer cuartil Q1 (25 %): 129 meses (error típico: 19,3)

Tercer cuartil Q3 (75 %): 27 meses (error típico: 3,4)

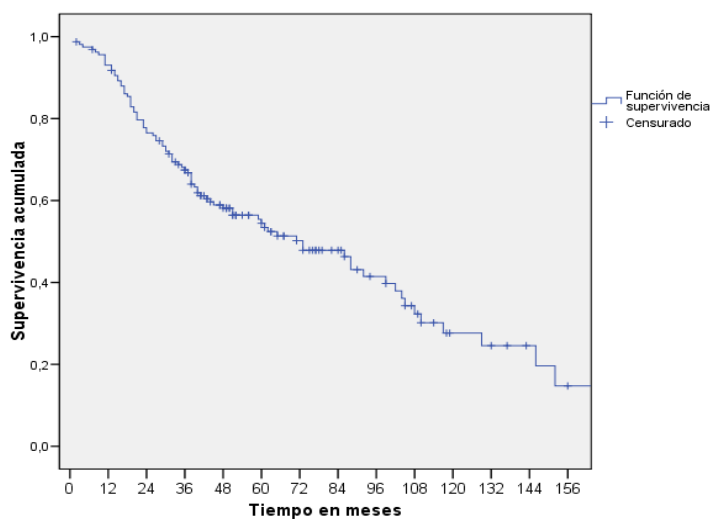
Media de supervivencia libre de enfermedad: 78,1 meses [IC al 95 % (66,1 – 90,1)]

Mediana de supervivencia libre de enfermedad: 61 meses [IC al 95 % (40 – 82)]

La mediana de seguimiento fue de 58 meses

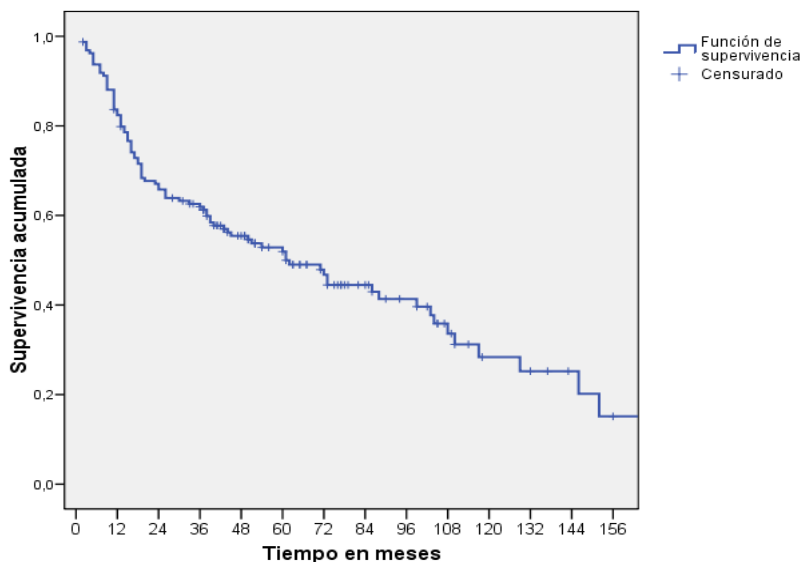
Las figuras 41 y 42 muestran las funciones de supervivencia global y de intervalo libre de enfermedad, respectivamente.

Figura 41: Curva de supervivencia global de la serie. Método de Kaplan y Meier.



Tiempo en meses	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Casos expuestos	147	121	102	74	55	43	32	24	16	9

Figura 42: Curva de intervalo libre de recidiva. Método de Kaplan y Meier.



Tiempo en meses	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
Casos expuestos	131	104	93	69	55	41	30	24	15	9

2-2. PATRÓN DE MORTALIDAD Y RECURRENCIAS

A lo largo del seguimiento de los pacientes, no todos fallecieron en relación a su enfermedad neoplásica pulmonar. En 35 pacientes (39,8 % de los 88 fallecidos durante dicho seguimiento) la causa no estuvo relacionada directamente con el proceso oncológico objeto de estudio.

Causa de muerte (N=88 fallecidos)	Total	%
Cáncer de pulmón	53	60,2 %
Otras causas	35	39,8 %

Las figuras 43 y 44 muestran las funciones de densidad de probabilidad de mortalidad y de recidiva, respectivamente. Nos permiten apreciar, especialmente si observamos la correspondiente al riesgo de recidiva, cómo la mayor densidad de dicho riesgo tiene lugar durante el segundo y tercer año, lo cual coincide con una densidad de mortalidad aumentada. A partir de los 5 años ambas gráficas tienden hacia una meseta.

Figura 43: Funciones de densidad de probabilidad de mortalidad de la serie global para 5 años (izquierda) y 10 años (derecha)

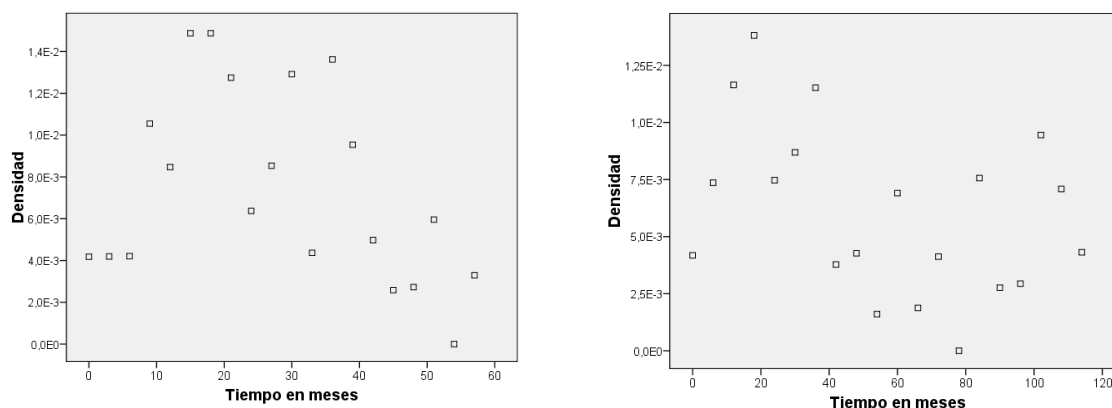
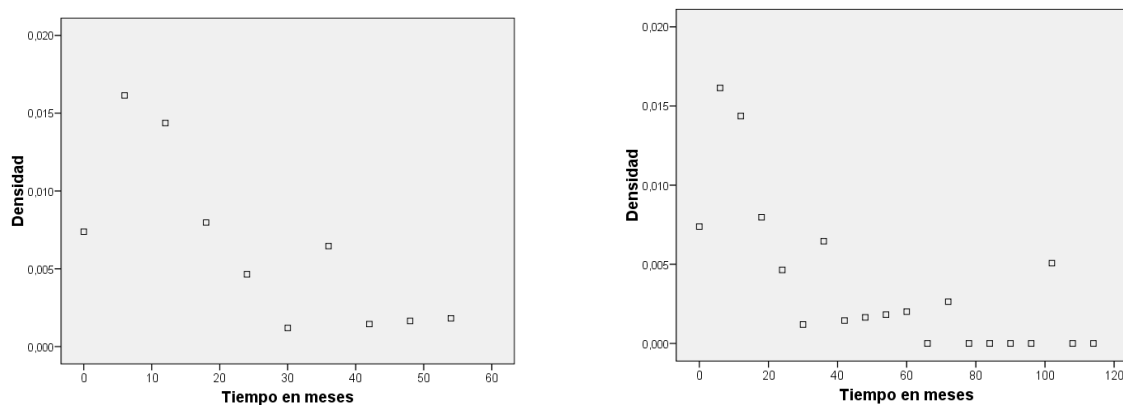
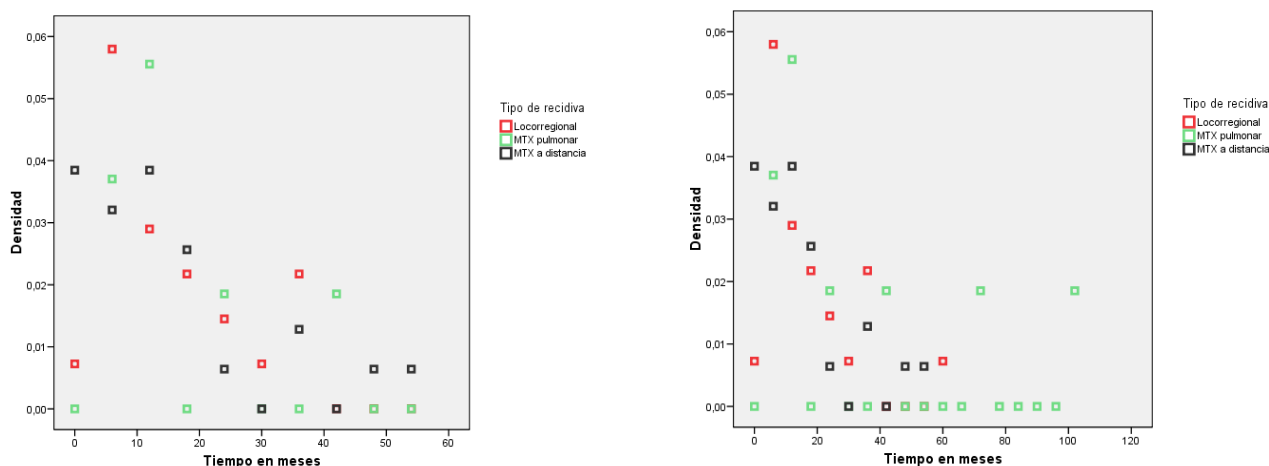


Figura 44: Funciones de densidad de probabilidad de recidiva de la serie global para 5 años (izquierda) y 10 años (derecha)



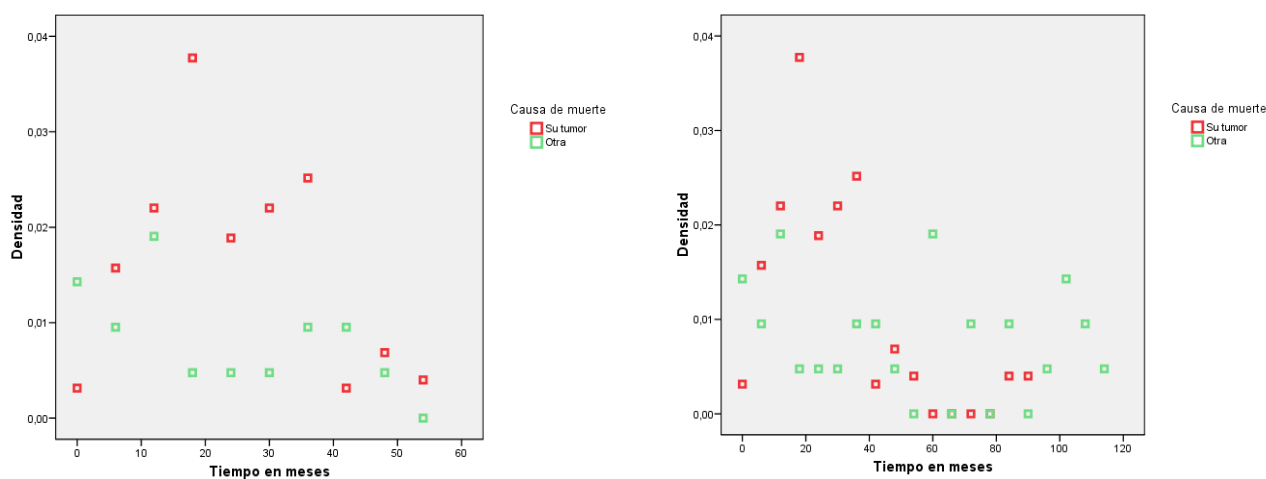
Si estratificamos la recidiva por el tipo (figura 45) encontramos que se distribuyen de forma más o menos uniforme, con un claro predominio en los primeros 24 meses. Pasados los 3 años aproximadamente ya no hay recidivas locorregionales, y pasados los 5 años ya solo se producen nuevas lesiones pulmonares (marcas de color verde), lo cual hace pensar que se trata de nuevos tumores, y no de recidivas.

Figura 45: Funciones de densidad de probabilidad de recidiva por tipo para 5 y 10 años



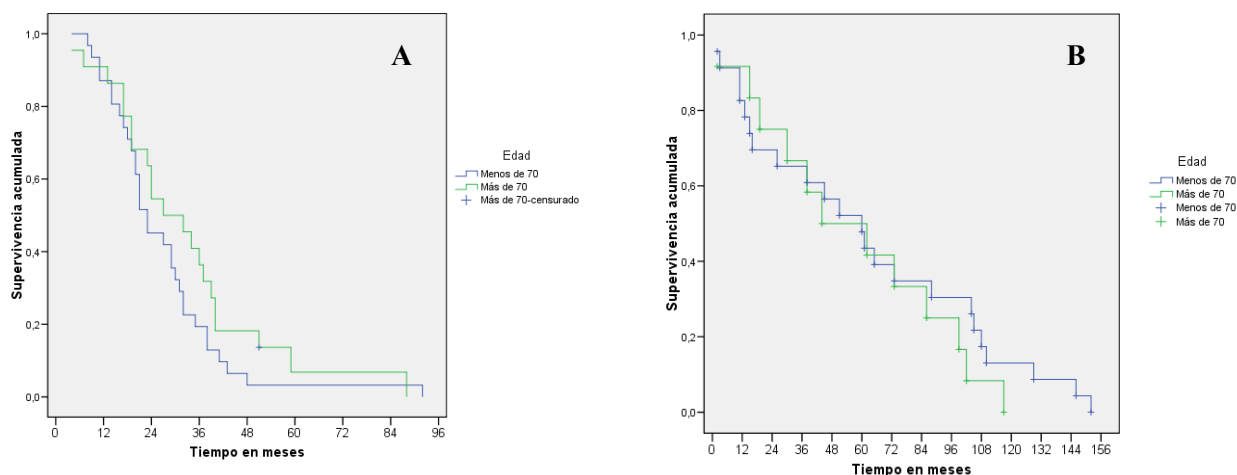
Del mismo modo podemos estratificar la mortalidad por causa, en función de los valores descritos anteriormente (figura 46). Vemos también que la mortalidad derivada del propio tumor acontece durante los primeros años, mientras que pasados aproximadamente tres años, deja paso a mortalidad por otras causas. Sí destaca un pequeño pico de mortalidad por causas ajenas al tumor durante los primeros 12 meses (marcas verdes en la zona izquierda de las gráficas, que se manifiesta más en la que representa solo los cinco primeros años desde la resección).

Figura 46: Funciones de densidad de probabilidad de mortalidad por causa para 5 y 10 años



Finalmente, analizamos si la causa de muerte por el tumor y la causa de muerte por una circunstancia ajena al mismo, varían en pacientes por encima y por debajo de 70 años (figura 47). No se encontraron diferencias en las curvas de supervivencia en ninguno de los casos.

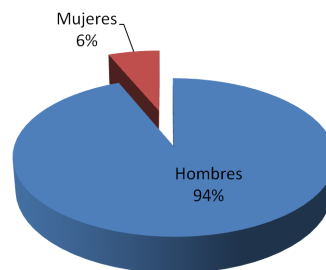
Figura 47: Curvas de supervivencia considerando como causa de muerte el tumor (A) y una causa distinta al tumor (B) estratificando en función de la edad.



2-3. SUPERVIVENCIA EN FUNCIÓN DE FACTORES DEMOGRÁFICOS

2-3.1. Género

Entre los pacientes varones la **supervivencia estimada** según el método de Kaplan y Meier a 1, 3 y 5 años desde el momento de la resección pulmonar fue de 92,6 %, 66,1 % y 53,4 % respectivamente. En el grupo de mujeres ascendió a 100 %, 88,9 % y 66,7 % respectivamente.



La **supervivencia estimada libre de enfermedad** a 1, 3 y 5 años fue 86,3 %, 67,4 % y 62,1 % respectivamente para los varones y de 80 %, 80 % y 64 % respectivamente para las mujeres.

GÉNERO	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Masculino	92,6 %	66,1 %	53,4 %	71 meses
Femenino	100 %	88,9 %	66,7 %	88 meses

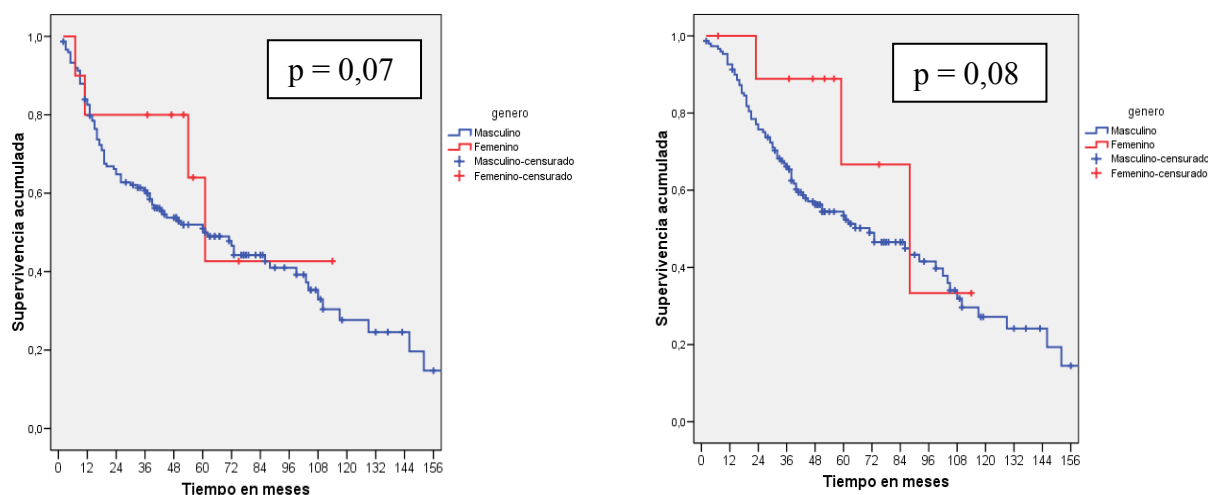
SV = probabilidad de supervivencia en el tiempo indicado

GÉNERO	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Masculino	83,9 %	60,7 %	51 %	61 meses
Femenino	80 %	80 %	64 %	61 meses

LR = probabilidad de mantenerse libre de recidiva en el tiempo indicado

Se encontró una tendencia a un mejor pronóstico en términos de supervivencia global y libre de recidiva, si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas en el estudio univariante (figura 48).

Figura 48: Funciones de probabilidad de supervivencia (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en función del género.

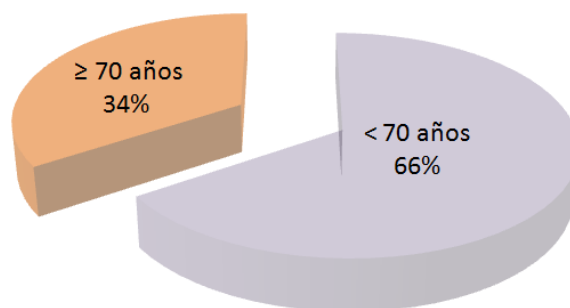


2-3.2. Edad

Al ser la edad una variable cuantitativa se ha establecido un punto de corte arbitrario en 70 años. Si bien en la actualidad la mayoría de estudios que buscan clasificar los pacientes intervenidos por carcinoma broncogénico en función de su riesgo quirúrgico establecen habitualmente el punto de corte en los 75 o incluso los 80 años (225, 257), la edad de 70 años ha sido durante mucho tiempo la que abría las puertas a ese grupo llamado de pacientes “longevos” (258, 259).

El primer grupo incluye en nuestro caso pacientes menores de 70 años (105 casos) y el segundo aquéllos de 70 o más años de edad (55 casos).

La probabilidad de supervivencia estimada según el método de Kaplan y Meier quedó distribuida de la siguiente forma:



EDAD	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
< 70 años	92,3 %	68 %	57,4 %	92 meses
≥ 70 años	94,5 %	66,5 %	48,5 %	59 meses

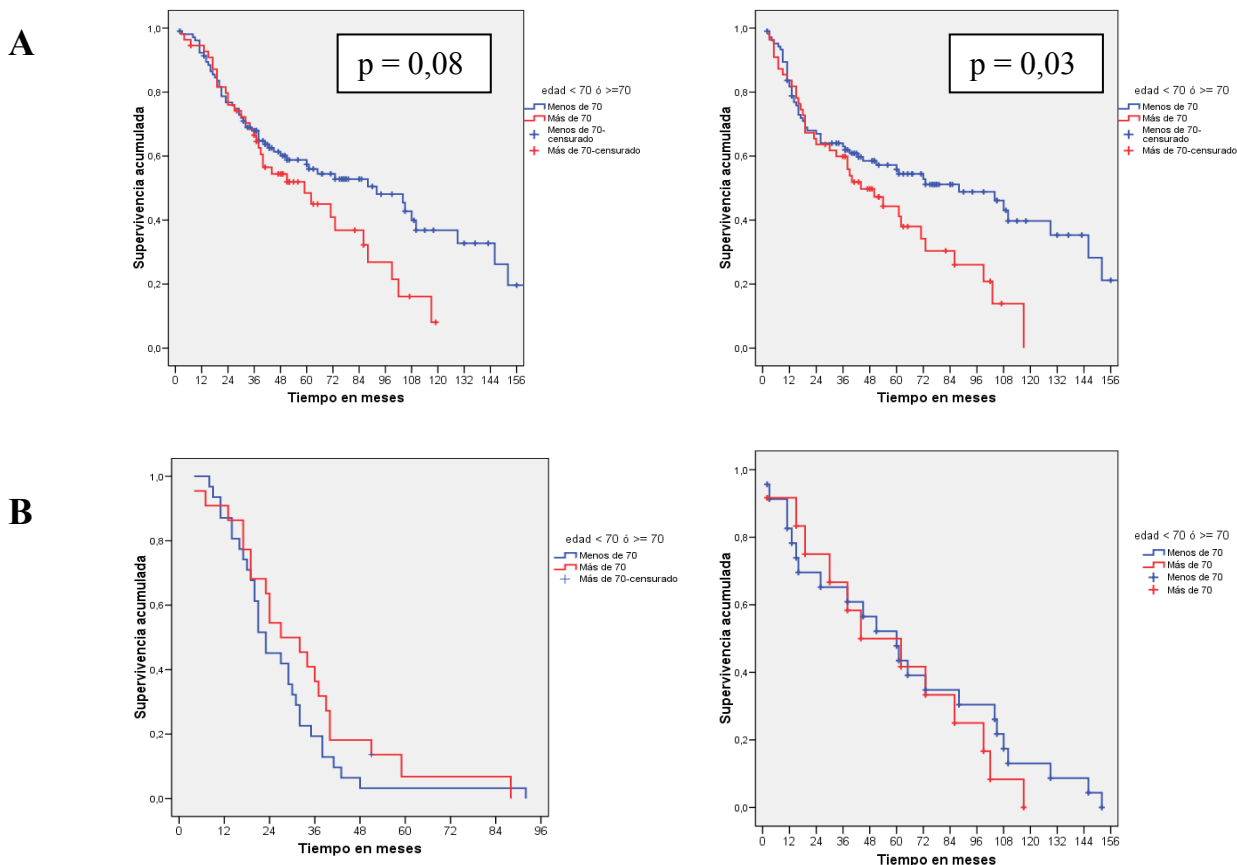
SV = probabilidad de supervivencia en el tiempo indicado

EDAD	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
< 70 años	83,7 %	63 %	55,8 %	88 meses
≥ 70 años	83,6 %	59,9 %	44,3 %	44 meses

LR = probabilidad de mantenerse libre de recidiva en el tiempo indicado

Al comparar las curvas de supervivencia se aprecia una tendencia no significativa a favor de pacientes del grupo de menor edad ($p = 0,08$). Esta tendencia se convierte en diferencia con significación estadística cuando hablamos de comparar las curvas de probabilidad de ausencia de recidiva (figura 49A). Si comparamos las curvas de supervivencia de los pacientes fallecidos por su tumor o por otra causa, no encontramos diferencias en el patrón de cómo se produce esa mortalidad en el tiempo entre pacientes por debajo y por encima de 70 años (figura 49B).

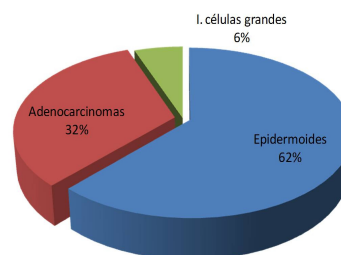
Figura 49: A. Funciones de probabilidad de supervivencia (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en función de la edad (punto de corte: 70 años). B. Comparación entre curvas de supervivencia para los pacientes fallecidos por su tumor (izquierda) y por otra causa (derecha).



2-4. SUPERVIVENCIA EN FUNCIÓN FACTORES DERIVADOS DEL TUMOR

2-4.1. Tipo histológico

La probabilidad de supervivencia en función del tipo histológico del tumor se indica en la siguiente tabla:



Tipo Histológico	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Epidermoide	93,9 %	65,4 %	58,4 %	65 meses
Adenocarcinoma	92,3 %	71,2 %	54,1 %	64 meses
ICG	88,9 %	66,7 %	66,7 %	88 meses

ICG: Indiferenciado de células grandes

SV: probabilidad de supervivencia

La probabilidad de permanecer libre de enfermedad según el tipo histológico es:

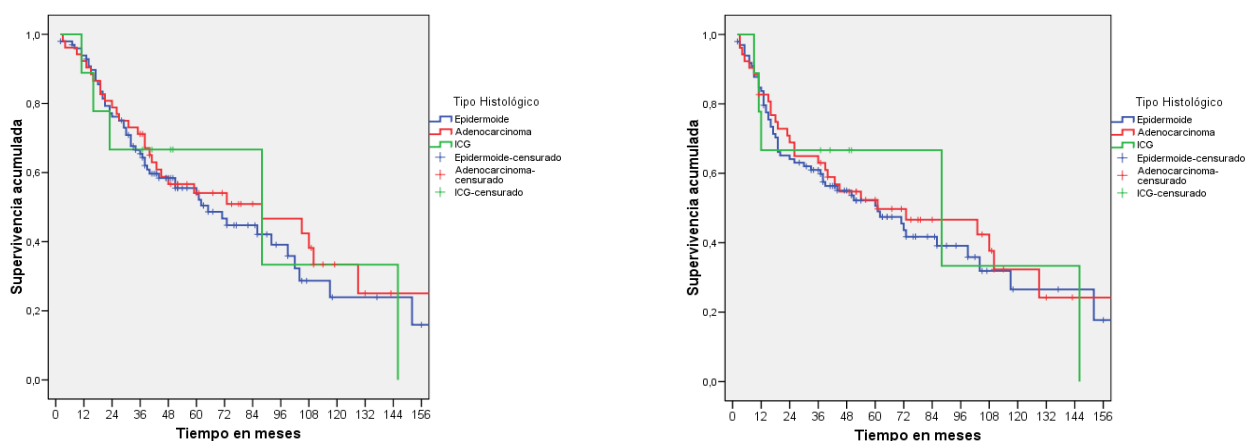
Tipo Histológico	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Epidermoide	83,7 %	60,9 %	50,6 %	61 meses
Adenocarcinoma	82,7 %	63 %	52,3 %	61 meses
ICG	66,7 %	66,7 %	66,7 %	88 meses

ICG: Indiferenciado de células grandes

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

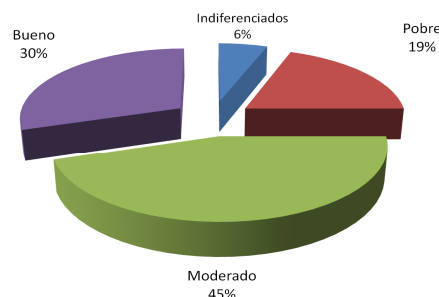
En el estudio por el método de *log-rank* no se encontraron diferencias en la probabilidad de supervivencia global o libre de recidiva al comparar las curvas correspondientes a cada tipo histológico (figura 50).

Figura 50: Funciones de probabilidad de supervivencia (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en función del tipo histológico



2-4.2. Grado de diferenciación

La probabilidad de supervivencia en función del grado de diferenciación del tumor resecaado queda de la siguiente manera:



Grado diferenciación	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Bueno	100 %	77 %	64,3 %	129 meses
Moderado	94,3 %	66,6 %	53,3 %	62 meses
Pobre	80,6 %	54,6 %	40,4 %	43 meses
Indiferenciado	88,9 %	66,7 %	66,7 %	88 meses

SV: probabilidad de supervivencia

La probabilidad de permanecer libre de recidiva en función del grado de diferenciación del tumor es:

Grado diferenciación	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Bueno	85,4 %	68,6 %	61,2 %	104 meses
Moderado	87,3 %	61,2 %	51,2 %	61 meses
Pobre	71 %	51,6 %	36,4 %	39 meses
Indiferenciado	66,7 %	66,7 %	66,7 %	88 meses

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

Al comparar las curvas de supervivencia mediante el método de *log-rank* (figura 51) se encuentra que el pronóstico en términos de supervivencia empeora de forma casi significativa conforme disminuye el grado de diferenciación del tumor ($p=0,05$). Los tumores indiferenciados, en número de nueve, parecen no seguir esta tendencia, aunque este escaso número de ellos no permite establecer conclusiones al respecto.

Esta tendencia también se aprecia al hablar de probabilidad de permanecer libre de recidiva (figura 52); sin embargo pierde claramente su significación ($p = 0,2$).

Figura 51: Función de probabilidad de supervivencia global en función del grado de diferenciación

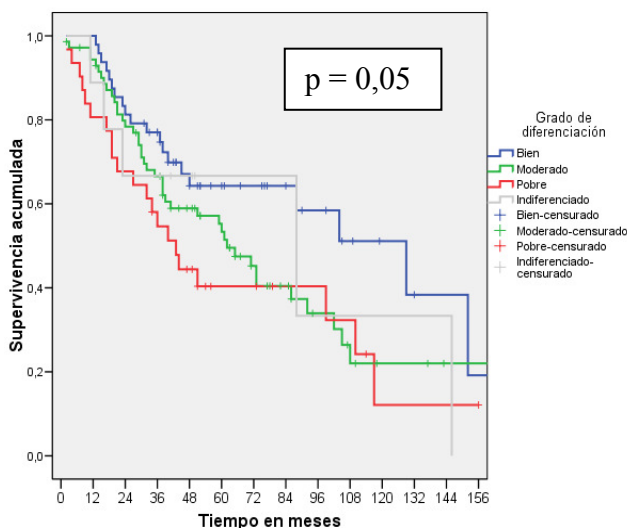
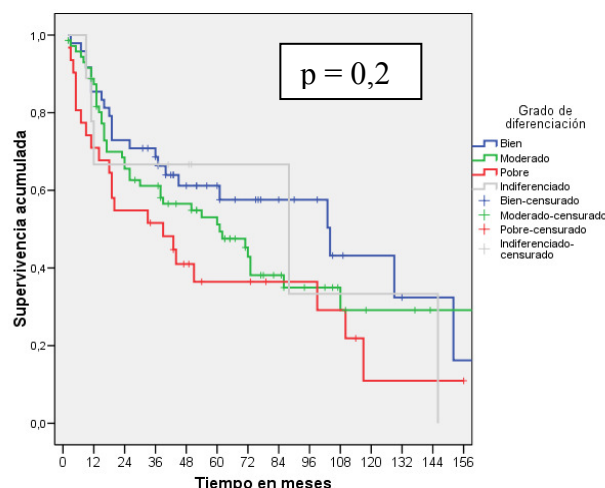


Figura 52: Función de intervalo libre de recidiva en función del grado de diferenciación



Para profundizar un poco más en el valor pronóstico de esta variable procedemos a realizar un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para variable pronóstica con k categorías (en este caso 4). Este modelo confirma que el riesgo de mortalidad aumenta según disminuye el grado de diferenciación del tumor resecao. Y pone de manifiesto que dicha mortalidad se duplica cuando el tumor es poco diferenciado en relación a si el tumor es muy diferenciado.

$$\text{Exp}(B) = 2,01. \text{ IC } 95 \% (1,09 - 3,70)$$

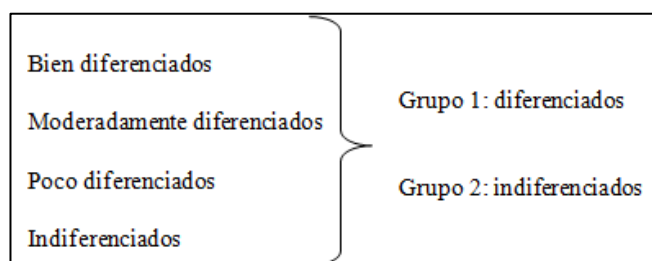
$$p = 0,03$$

Asimismo se evidencia que la tendencia en términos de supervivencia libre de recidiva se mantiene de forma significativa.

$$\text{Exp}(B) = 1,83. \text{ IC } 95 \% (1,02 - 3,28)$$

$$p = 0.04$$

A continuación definimos de forma aleatoria dos grupos en función del grado de diferenciación del tumor, bajo la hipótesis parcialmente confirmada con el modelo de regresión de Cox de que el empeoramiento significativo de la supervivencia se producía en el escalón entre moderadamente y pobremente diferenciado. Se establecieron pues dichos dos grupos:



Grado diferenciación	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Grupo 1: diferenciados	96,6 %	70,9 %	57,7 %	73 meses
Grupo 2: indiferenciados	82,5 %	57,4 %	45,1 %	44 meses

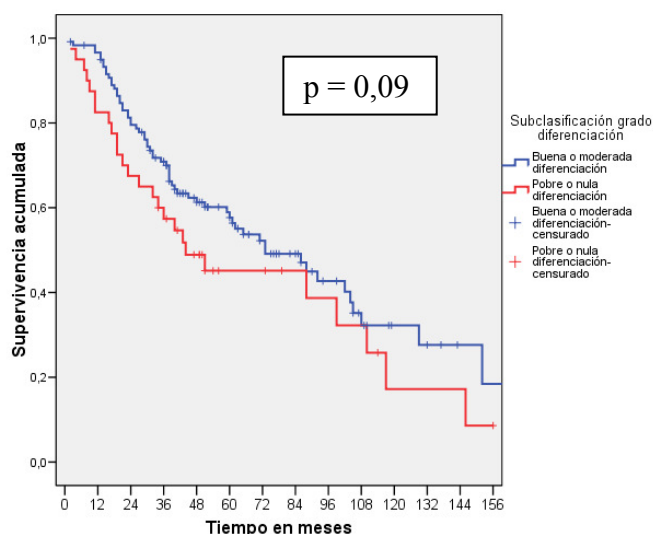
SV: probabilidad de supervivencia

Grado diferenciación	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Grupo 1: diferenciados	86,6 %	64,3 %	55,1 %	71 meses
Grupo 2: indiferenciados	70 %	55 %	42,1 %	43 meses

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

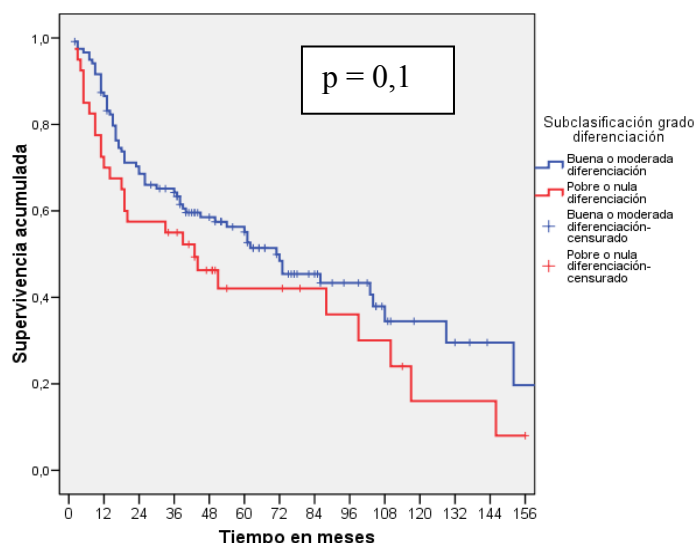
Con esta subclasificación la comparación entre las curvas de supervivencia global demuestra una tendencia a un peor pronóstico para los casos indiferenciados (grupo 2), pero que no resulta estadísticamente significativa al realizar la comparación con el test de Breslow (Wilcoxon generalizado), con un valor p de 0,09 (figura 53).

Figura 53: Función de probabilidad de supervivencia global en función del grado de diferenciación tras crear dos grupos llamados diferenciados e indiferenciados.



Esta falta de significación se mantiene si comparamos las curvas de intervalo libre de recidiva ($p = 0,1$) (figura 54).

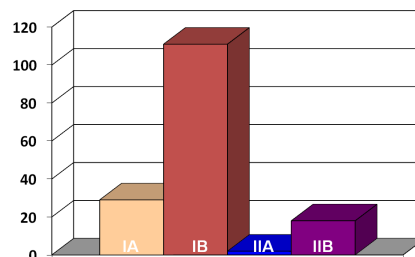
Figura 54: Función de intervalo libre de recidiva en función del grado de diferenciación tras crear dos grupos llamados diferenciados e indiferenciados.



2-4.3. Estadío

En lo referente al estadio se hizo un primer estudio de posible influencia en el pronóstico de la variable estadio entendiendo como tal el estadio I ó II.

Recordemos que de los 160 pacientes, 140 presentaban carcinomas broncogénicos no microcíticos en estadio I y los 20 restantes en estadio II. Comparamos la supervivencia y el intervalo libre de recidiva entre ambos grupos:



Estadio	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Estadio I	94,2 %	68,3 %	56,1 %	86 meses
Estadio II	85,7 %	61,9 %	45,7 %	59 meses

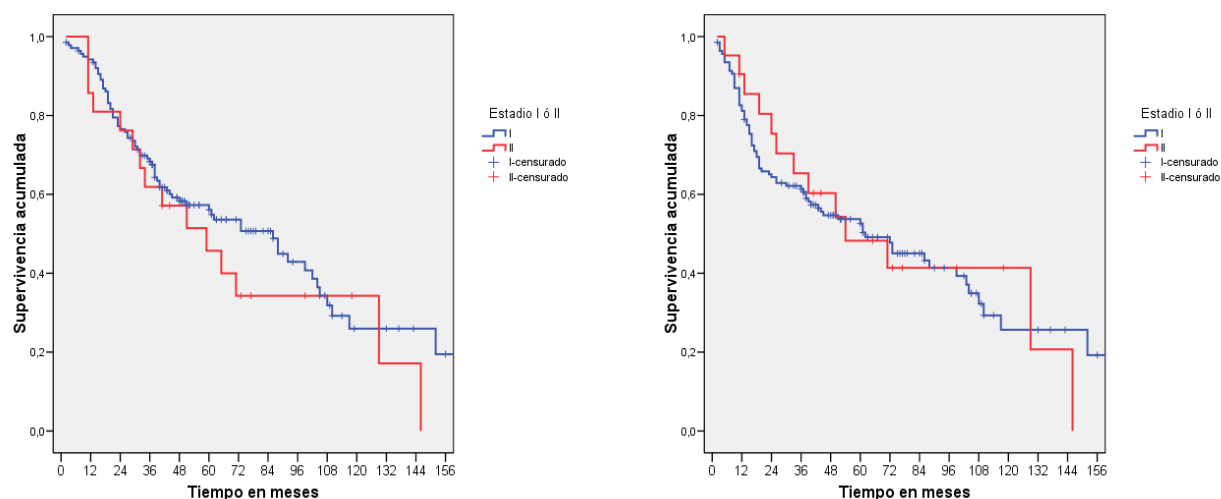
SV: probabilidad de supervivencia

Estadio	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Estadio I	82,6 %	61,4 %	52,6 %	62 meses
Estadio II	90,5 %	65,3 %	48,3 %	54 meses

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

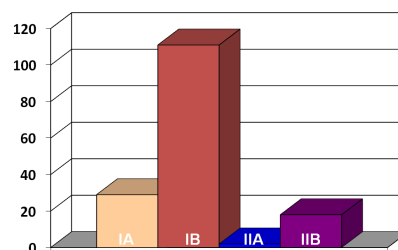
Al comparar las curvas de supervivencia e intervalo libre de recidiva no se encontraron diferencias en función del estadio (figura 55), ni aplicando el test de log-rank ni el modelo de regresión de Cox para variables pronósticas binarias ($p = 0,3$ para supervivencia y $p = 0,9$ para libre de enfermedad).

Figura 55: Función de supervivencia global (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en función del estadio tumoral (I ó II)



2-4.4. Clasificación TNM

Si particularizamos para la clasificación TNM encontraremos que tampoco hay diferencias pronósticas entre los cuatro grupos. Las tablas de supervivencia e intervalo libre de enfermedad quedan de la siguiente manera:



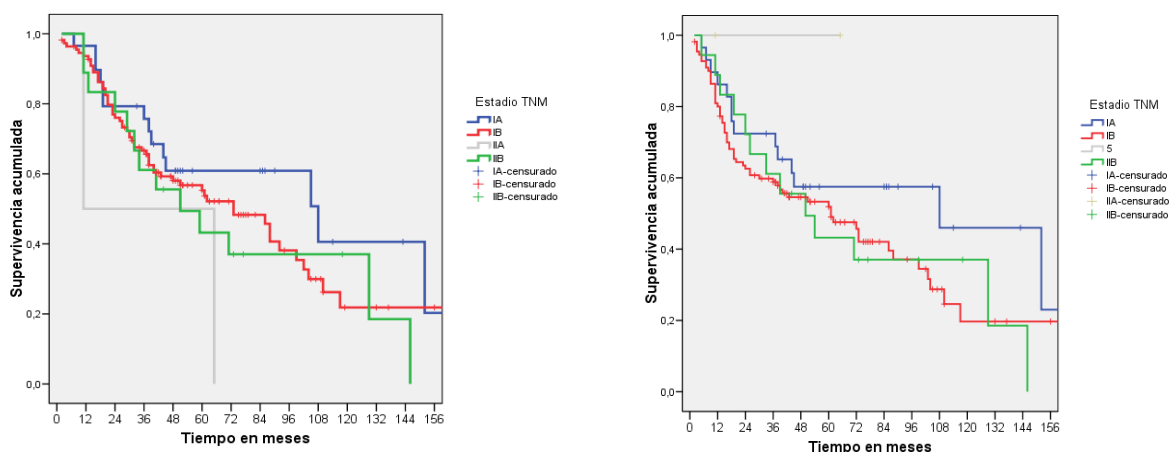
Estadio	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
IA (T1N0M0)	96,6 %	75,7 %	60,9 %	108 meses
IB (T2N0M0)	93,6 %	66,6 %	55,3 %	73 meses
IIA (T1N1M0)	50 %	50 %	50 %	11 meses
IIB (T2N1M0)	88,9 %	61,1 %	43,2 %	51 meses

SV: probabilidad de supervivencia

Estadio	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
IA (T1N0M0)	86,2 %	72,4 %	57,5 %	108 meses
IB (T2N0M0)	80 %	58,8 %	51,9 %	50 meses
IIA (T1N1M0)	--	--	--	--
IIB (T2N1M0)	88,9 %	61,1 %	43,2 %	61 meses

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

Figura 55: Función de supervivencia global (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en función de la clasificación TNM del tumor

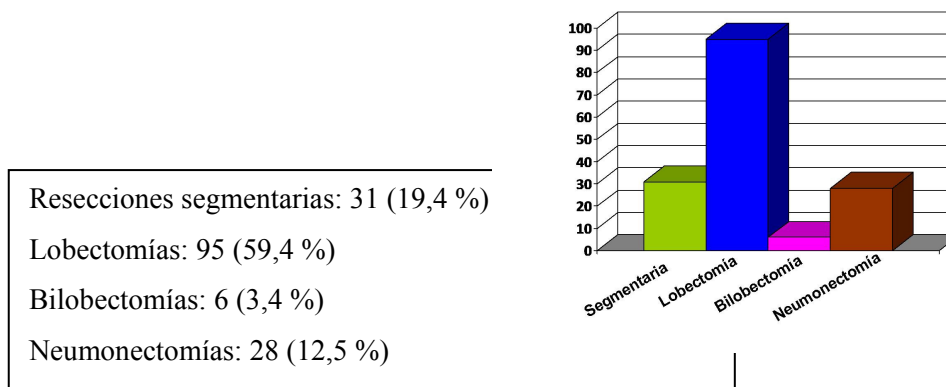


No se incluyen datos de los 2 pacientes en estadio IIA por el reducido número de casos. Ambos permanecieron sin recidiva durante todo el seguimiento.

Tampoco haciendo el cálculo mediante un regresión de Cox para variable pronóstica con k categorías encontramos que la clasificación TNM sea un factor pronóstico independiente (p=0,4).

2-5. SUPERVIVENCIA EN FUNCIÓN DE FACTORES DERIVADOS DEL PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

2-5.1. Tipo de resección



Al analizar los resultados en términos de supervivencia global y libre de enfermedad en relación a la técnica quirúrgica resectiva empleada encontramos los siguientes datos:

Tipo de cirugía	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Segmentaria	93,3 %	63,3 %	44,4 %	45 meses
Lobectomía	93,6 %	71,2 %	59,1 %	99 meses
Bilobectomía	100 %	66,7 %	66,7 %	No alcanzada
Neumonectomía	89,3 %	55,7 %	47,4 %	73 meses

SV: probabilidad de supervivencia

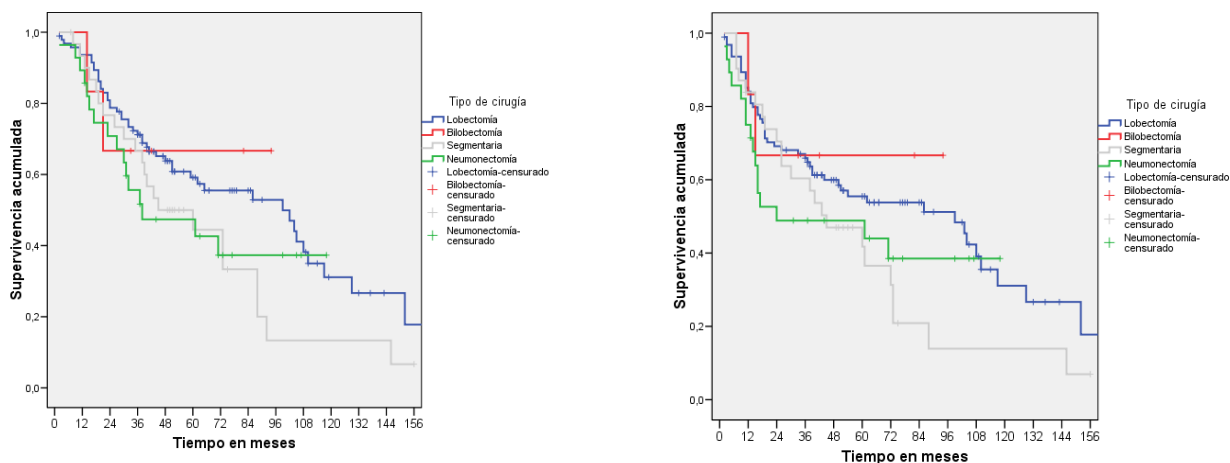
Tipo de cirugía	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Segmentaria	83,9 %	60,4 %	41,7 %	45 meses
Lobectomía	84,1 %	65,9 %	55,5 %	99 meses
Bilobectomía	83,3 %	66,7 %	66,7 %	No alcanzada
Neumonectomía	75 %	48,9 %	48,9 %	61 meses

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

La comparación de las curvas de supervivencia global muestra una clara tendencia hacia mejor pronóstico en pacientes en quienes se realizó una lobectomía o bilobectomía. Sin embargo, como se ve en la figura 56 izquierda, la divergencia de las curvas aparece tardíamente, a partir de los tres años de seguimiento. La comparación de dichas curvas resultó casi significativa con el test de log-rank ($p = 0,06$).

Respecto a la supervivencia libre de enfermedad, solo la curva de neumonectomía se “descolgó” a partir de los 12 meses, sin alcanzar diferencias significativas (figura 56 derecha).

Figura 56: Función de supervivencia global (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en relación al tipo de cirugía de resección pulmonar realizada.



Es cierto que la técnica quirúrgica más frecuentemente realizada fue la lobectomía (95 casos, 59,4 %). Sin embargo, hay un número no desdeñable de resecciones segmentarias atípicas (19,4 % de la serie) y de neumonectomías (17,5 % del total).

Bajo la hipótesis de que la resección segmentaria atípica podría ser la única a priori no oncológica (aunque este aspecto es discutible), procedimos a comparar la supervivencia global y libre de enfermedad entre pacientes con resección segmentaria atípica y todos los demás (incluyendo en el mismo grupo lobectomías, bilobectomías y neumonectomías). Las tablas quedaron de la siguiente manera:

Tipo de cirugía	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Segmentaria	93,3 %	66,7 %	44,4 %	45 meses
Resto	93 %	67,6 %	56,9 %	86 meses

SV: probabilidad de supervivencia

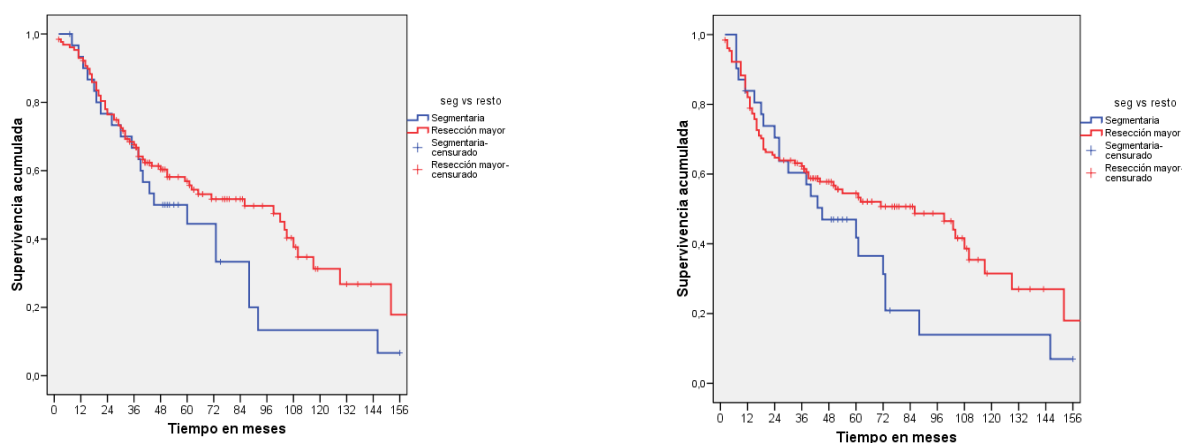
Tipo de cirugía	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Segmentaria	83,9 %	60,4 %	41,7 %	45 meses
Resto	83,6 %	62,3 %	54,5 %	86 meses

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

Las curvas de supervivencia (figura 57 izquierda) comienzan a divergir a partir de los tres años. Sin embargo, en la curva de intervalo libre de enfermedad no hay tal divergencia, sobre todo si cortamos a los cinco años de

seguimiento. En cualquier caso no hubo diferencias en el estudio de log-rank. Interpretaremos este aspecto en la discusión.

Figura 57: Función de supervivencia global (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en relación al tipo de cirugía de resección pulmonar realizada, agrupando las categorías de la variable en resección segmentaria versus el resto de tipos de resección



Dado que no se hallaron diferencias se pensó que quizá la tendencia encontrada al evaluar los distintos tipos de cirugía dependía de una supervivencia disminuida que pudiera venir determinada por el propio procedimiento que supone la neumonectomía. Así pues, se recodificó de nuevo la variable agrupando en dos nuevas categorías, a saber, neumonectomía versus resto de tipos de resección quirúrgica (incluyendo en el mismo grupo resecciones segmentarias, lobectomías y bilobectomías). Estos fueron los resultados:

Tipo de cirugía	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Neumonectomía	89,3 %	55,7 %	47,4 %	38 meses
Resto	93,9 %	69,9 %	55,8 %	86 meses

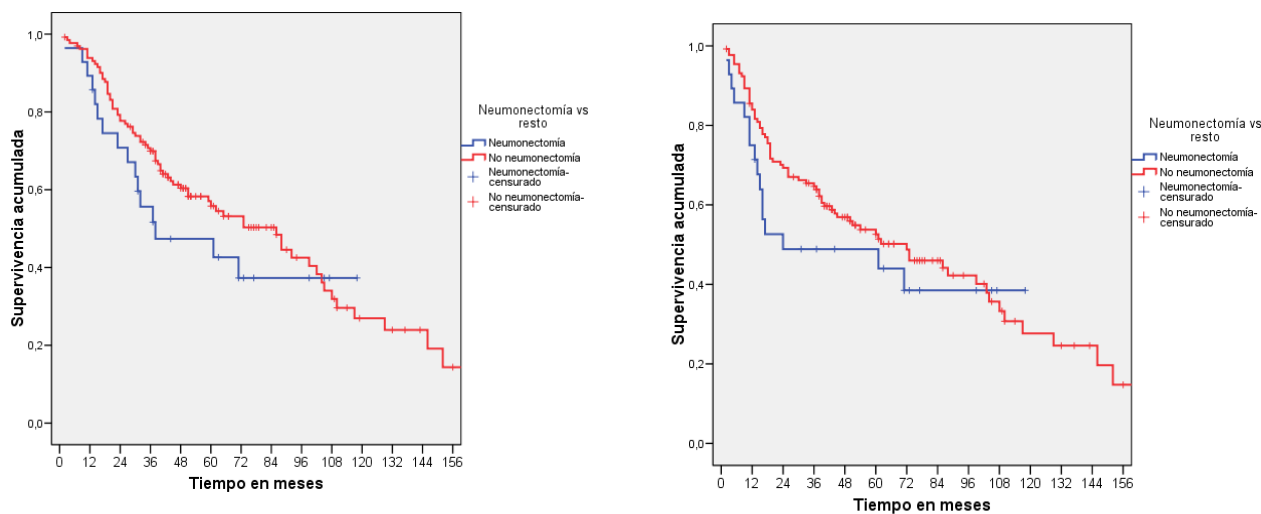
SV: probabilidad de supervivencia

Tipo de cirugía	LR a 1 año	LR a 3 años	LR a 5 años	Mediana
Neumonectomía	75 %	48,9 %	48,9 %	24 meses
Resto	85,5 %	64,7 %	52,6 %	72 meses

LR: probabilidad de permanecer libre de recidiva en un tiempo dado

No encontramos tampoco diferencias estadísticas en cuanto al tipo de resección, ni en SV ($p=0,3$) ni en SLE ($p=0,4$) (figura 58).

Figura 58: Función de supervivencia global (izquierda) e intervalo libre de recidiva (derecha) en relación al tipo de cirugía de resección pulmonar realizada, agrupando las categorías de la variable en neumonectomía versus el resto de tipos de resección.

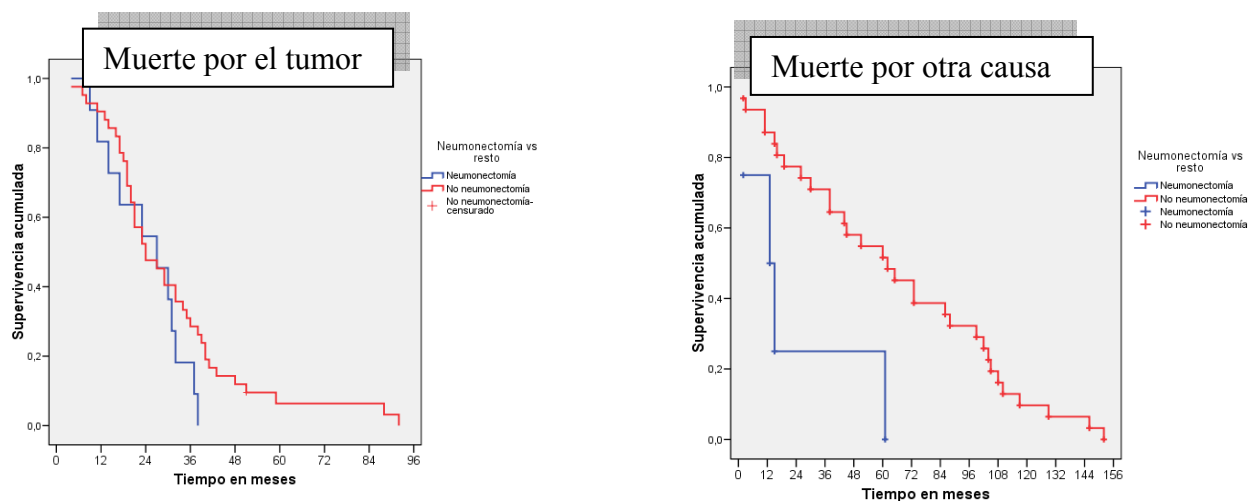


La interpretación de estos resultados nos hace pensar que el incremento de la mortalidad en los primeros años de seguimiento en pacientes neumonectomizados podría haber estado en relación con la mortalidad inherente al propio tipo de resección, más que debida a un peor pronóstico derivado del tumor. Sobre todo por cuanto una neumonectomía puede parecer una resección más radical y oncológica que otras de menor cuantía. Por eso se decidió estratificar al análisis de esta variable (neumonectomía versus resto de resecciones) por la causa muerte (derivada del tumor o no).

Los resultados hallados se indican en la figura 59. Vemos cómo la mortalidad aumentada en la curva de neumonectomía no estaba en relación a un peor pronóstico del tumor en esos pacientes, sino a una mayor mortalidad no oncológica ($p = 0,01$ en el test de log-rank al comparar las curvas de neumonectomía versus resto de resecciones).

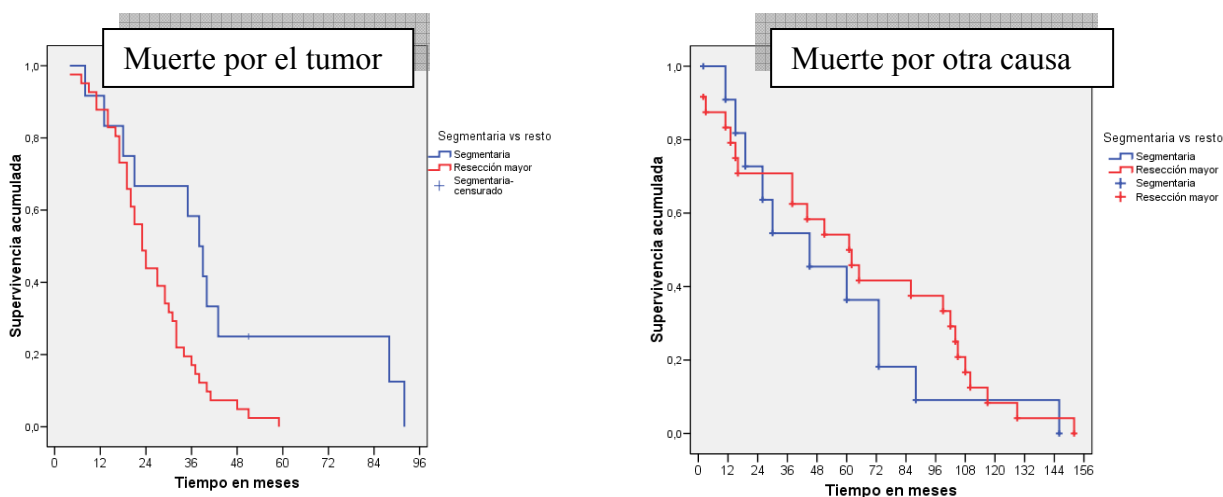
Con este resultado pensamos en hacer lo mismo para los casos con resección segmentaria, valorando así si esa mayor mortalidad no significativa de la resección segmentaria atípica se hacía significativa al filtrar por muerte de causa oncológica o si la diferencia se tornaba hacia un fallecimiento de los pacientes en los primeros años por otra causa distinta.

Figura 59: Función de supervivencia global en relación al tipo de cirugía de resección pulmonar realizada, agrupando las categorías de la variable en neumonectomía el resto de tipos de resección y estratificando por causa de muerte (el tumor, a la izquierda, y otra causa, a la derecha).



Los resultados de este análisis se muestran en la figura 60. No se aprecian diferencias ni en la muerte asociada al tumor, ni en muerte por otra causa. Esto explica la ausencia de diferencias significativas en el estudio de la resección segmentaria como factor pronóstico en nuestra serie (figura 57).

Figura 60: Función de supervivencia global en relación al tipo de cirugía de resección pulmonar realizada, agrupando las categorías de la variable en resección segmentaria versus el resto de tipos de resección y estratificando por causa de muerte (el tumor, a la izquierda, y otra causa, a la derecha).



2-6. SUPERVIVENCIA EN FUNCIÓN DE FACTORES BIOMOLECULARES

2-6.1. Introducción

Aunque ya lo hemos detallado en el apartado de Material y Métodos, reproducimos de nuevo aquí la forma de desarrollar los resultados para las 21 proteínas analizadas, con el fin de que sea más sencilla su comprensión. En todos los casos se hace de la misma manera y siguiendo los siguientes pasos:

- **“Tasa de expresión de la proteína”**: Determinación de en qué proporción de las muestras analizadas se expresan dichas proteínas y a qué intensidad de inmunorreactividad corresponden las categorías positiva y negativa (ver sección de material y métodos).
 - **“Expresión en función del tipo histológico”**: Desarrollo de una tabla de contingencia que determine el nivel de expresión en función del tipo histológico del tumor, buscando si existen diferencias significativas en función de los grupos. Se representa con diagrama de barras, indicando sobre la barra correspondiente a cada valor de la variable el porcentaje de muestras en que la expresión de la proteína es positiva (ejemplo +61,2%).
 - **“Expresión en función del grado de diferenciación”**: Desarrollo de una segunda tabla de contingencia en que se ponga de manifiesto la expresión de la proteína en función del grado de diferenciación del tumor, analizando igualmente si hay diferencias en función de dicha variable. También se representa con diagrama de barras, indicando sobre la barra correspondiente a cada valor de la variable el porcentaje de muestras en que la expresión de la proteína es positiva (ejemplo +50,3%).
 - **“Supervivencia global”**: Análisis del nivel de expresión de la proteína como potencial factor pronóstico de supervivencia global.
 - a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie
 - ii. Estratificando por tipo histológico y grado de diferenciación (si la expresión era diferente en función de alguna de dichas variables según las tablas de contingencia)
 - b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox
 - **“Supervivencia libre de recidiva”**: Análisis del nivel de expresión de la proteína como potencial factor pronóstico de recidiva.
 - a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie
 - ii. Estratificando por tipo histológico y grado de diferenciación (si la expresión era diferente en función de alguna de dichas variables según las tablas de contingencia)
 - b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox
 - **“Conclusiones”**: resumen de los hallazgos en el estudio de la variable.
- **Nota importante**: En las proteínas en las que la intensidad de inmunorreactividad ha sido cuantificada de más

de una manera (ver sección de material y métodos) los pasos arriba reseñados se repiten para las distintas formas en que se ha realizado dicha evaluación.

- **Puntualización respecto a las gráficas:** las curvas que analizan supervivencia global se presentan en color azul y verde, mientras que las que hacen referencia a la supervivencia libre de enfermedad lo son en azul y rojo.

2-6.2. Análisis previo. Patrón de expresión de las distintas proteínas analizadas en función de la variable fumador.

Dado que en los últimos años, y con la tecnología de Tissue-Arrays, varios estudios han relacionado distintos patrones de expresión de proteínas en pacientes con carcinoma broncogénico con el patrón de su hábito tabáquico (260), decidimos hacer nuestro primer análisis de forma similar. De encontrar relación en alguna o algunas de las variables, el enfoque de su estudio posterior podría variar.

Como resultados, encontramos que solo la expresión de p27 (considerando positiva cualquier grado de inmunorreactividad) mostró una tendencia a expresarse en mayor medida entre pacientes no fumadores, aunque no alcanzó significación estadística ($p = 0,08$). No se encontró una relación entre el grado de expresión y el hábito tabáquico para ninguna de las restantes proteínas.

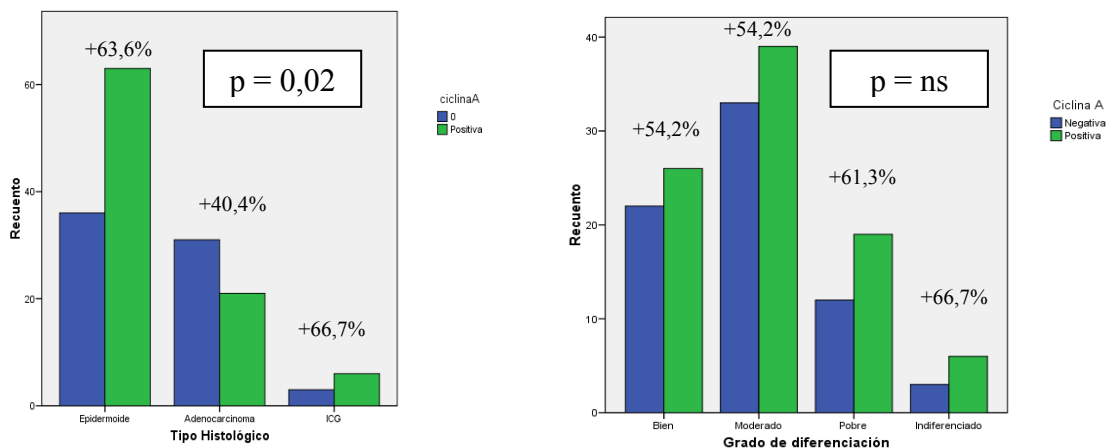
2-6.3. Proteína Ciclina A

2-6.3.a. Criterio único: positiva si inmunorreactividad > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



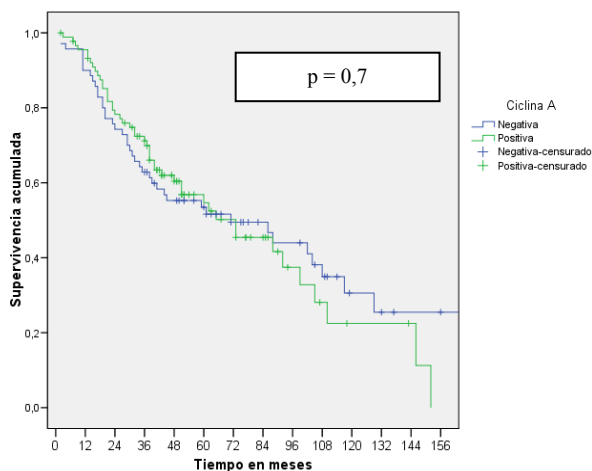
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Estratificado por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

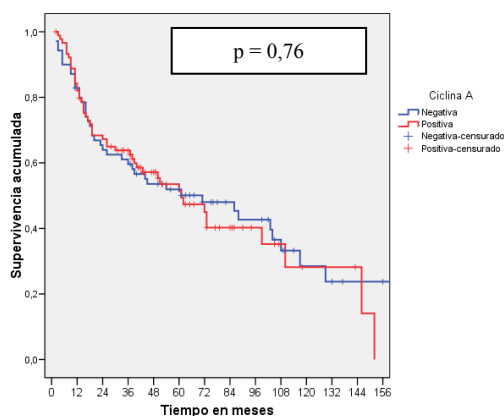
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox

HR = 1,06. IC 95 % (0,7 – 1,6). p = 0,78

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Estratificado por tipo histológico: No hubo diferencias significativas

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox

HR = 1,07. IC 95 % (0,7 – 1,6). p = 0,9.

5. Conclusiones:

La expresión de ciclina A, correspondiente a una inmunorreactividad superior al 5 % fue significativamente mayor en los tumores de estirpe escamosa que en el adenocarcinoma y el indiferenciado de células grandes ($p < 0,05$).

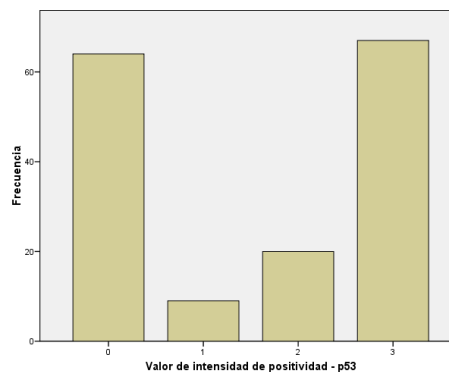
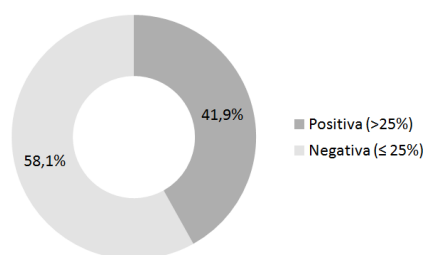
No hubo diferencias en la expresión en función del grado de diferenciación del tumor.

La ciclina no se manifiesta como factor pronóstico independiente de supervivencia global ni libre de recidiva en nuestra serie.

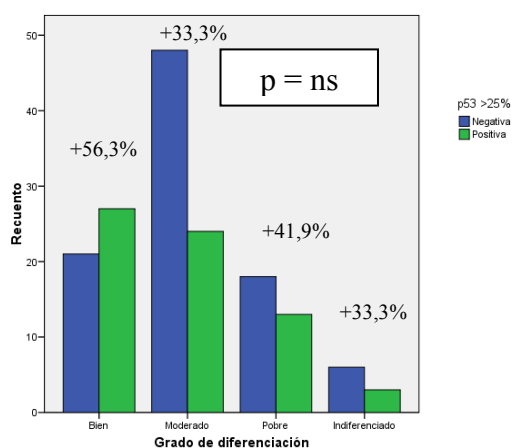
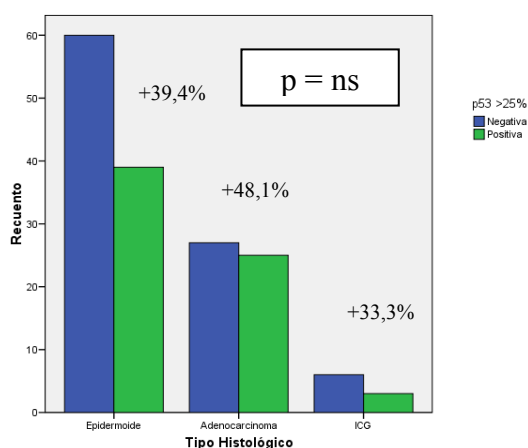
2-6.4. Proteína p53

2-6.4.a. Criterio 1: p53 positiva si inmunorreactividad > 25 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



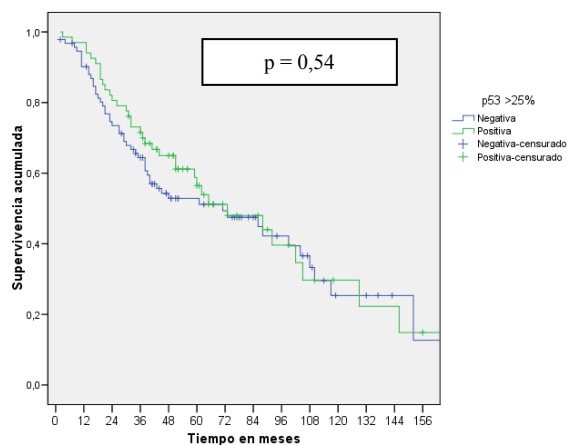
2. Expresión en función del tipo histológico y grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

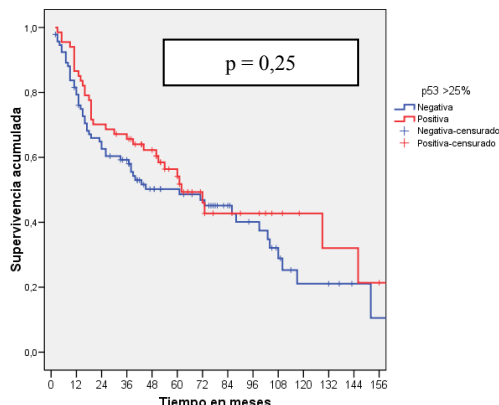
i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 $HR = 0,88$. IC 95 % (0,6 – 1,3)

4. Supervivencia libre de recidiva:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox
 $HR = 0,78$. IC 95 % (0,5 – 1,2). $p = 0,26$.

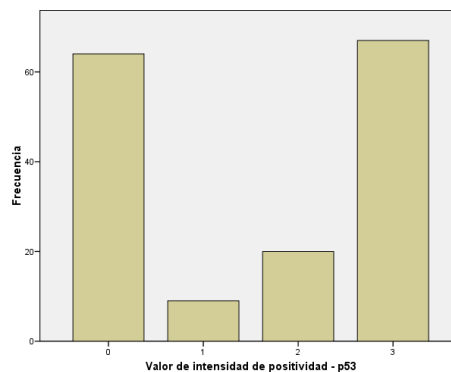
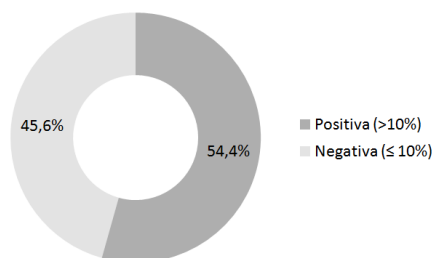
5. Conclusiones:

El patrón de distribución de p53 fue similar en función del tipo histológico y del grado de diferenciación.

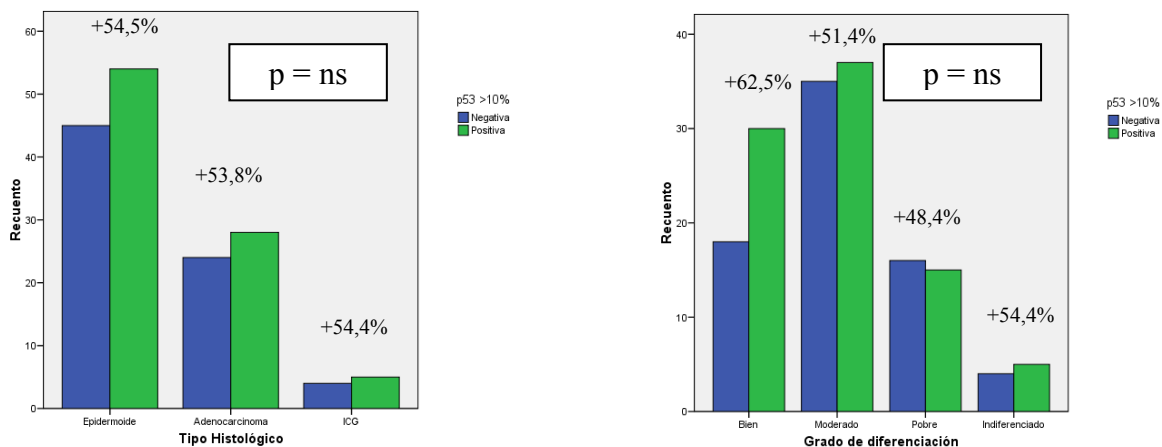
El p53 no se manifiesta como factor pronóstico independiente de supervivencia libre de enfermedad en nuestra serie.

2-6.4.b. Criterio 2: p53 positiva si inmunorreactividad > 10 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



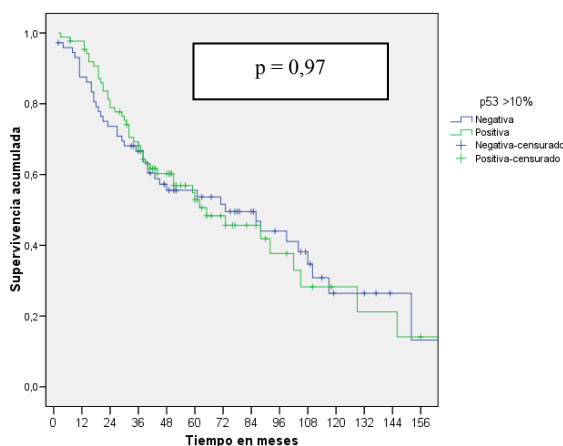
2. Expresión en función del tipo histológico y grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

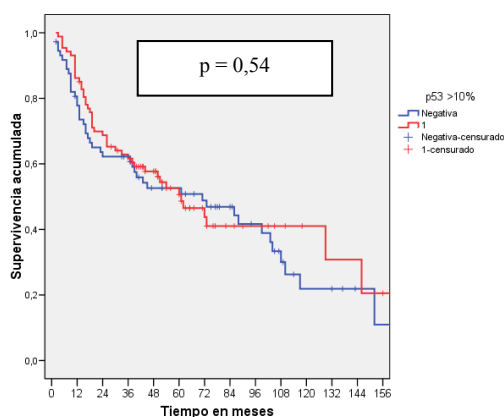
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,99. IC 95 \% (0,7 - 1,5). p = 0,97$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,89. IC 95 \% (0,6 - 1,3). p = 0,88$$

5. Conclusiones:

El p53 no se manifiesta como factor pronóstico independiente de supervivencia global en nuestra serie, tampoco bajo el criterio de positividad de inmunorreactividad por encima del 10 % de las células.

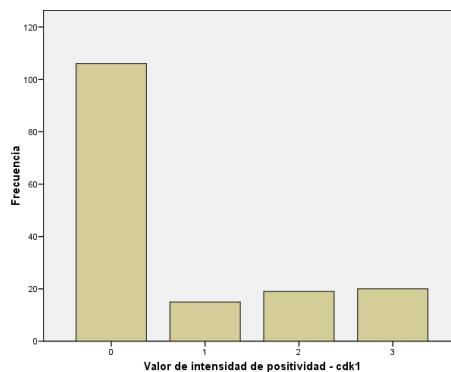
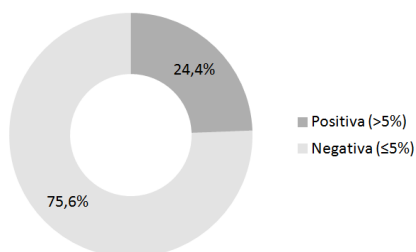
Con este criterio, el patrón de distribución continuó siendo homogéneo en función del tipo histológico y el grado de diferenciación.

* * *

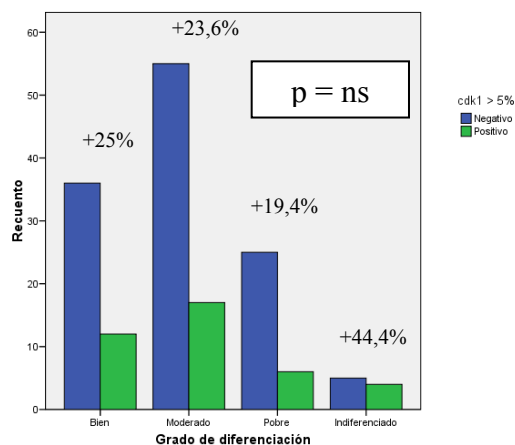
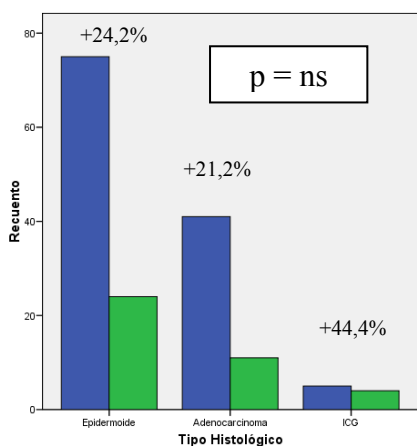
2-6.5. Proteína cdk1

2-6.5.a. Criterio único: cdk1 positiva si inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



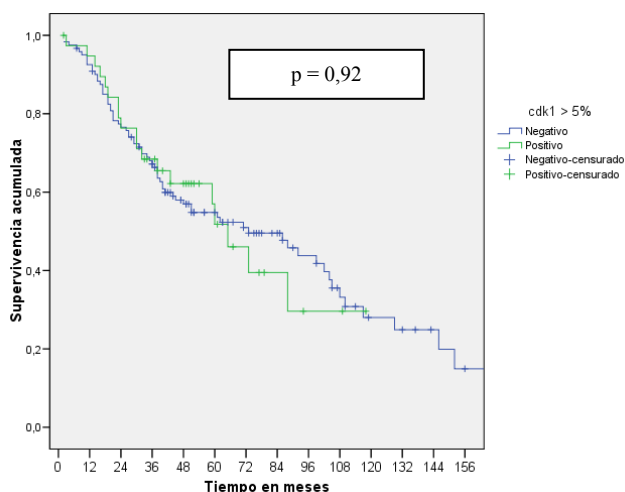
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

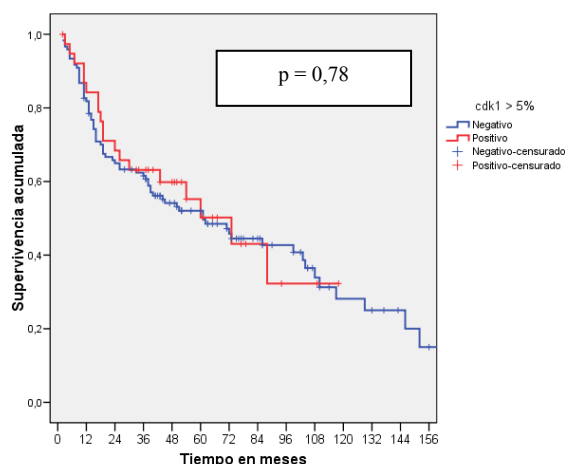
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,03. IC 95 \% (0,61 - 1,71). p = 0,92$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,93. IC 95 \% (0,56 - 1,55). p = 0,77$$

5. Conclusiones:

La proteína cdk1 se distribuyó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral.

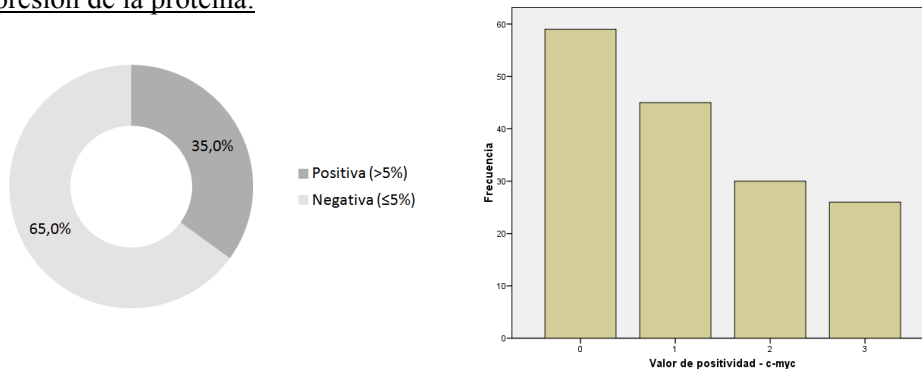
La expresión de proteína cdk1 en más del 5 % de las células no resultó un factor pronóstico en nuestra serie.

* * *

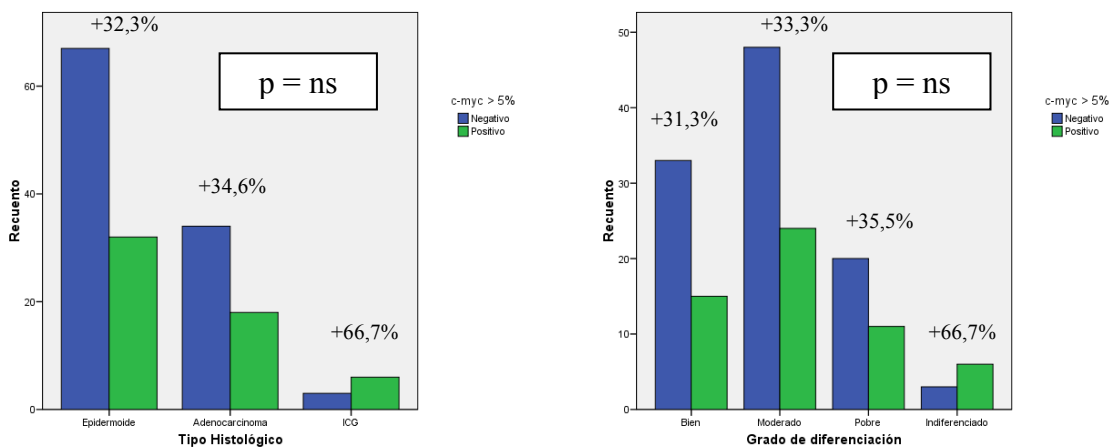
2-6.6. Proteína c-myc

2-6.6.a. Criterio 1: c-myc positiva si inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



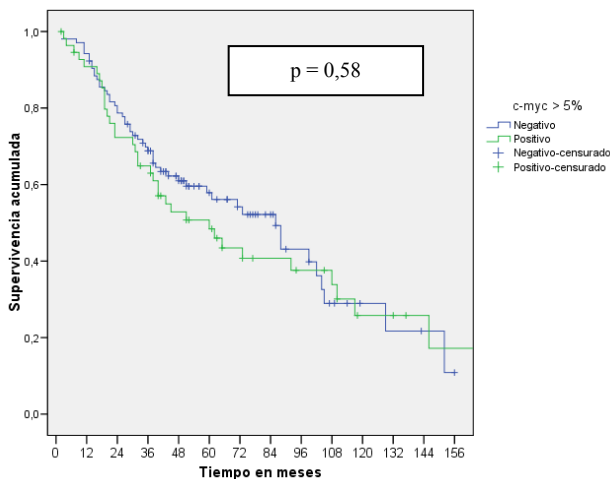
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

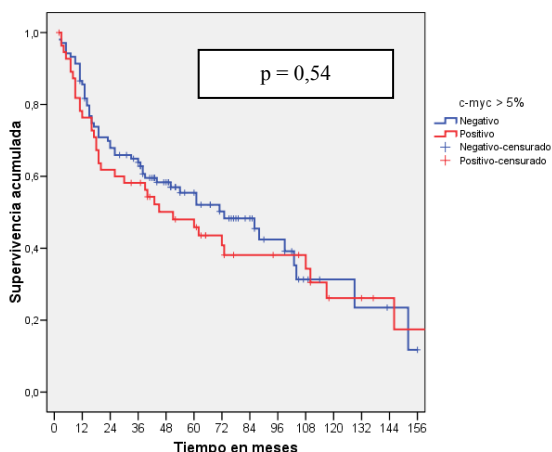
i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 1,13. IC 95 % (0,73 – 1,74)

4. Supervivencia libre de recidiva:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 1,14. IC 95 % (0,75 – 1,74)

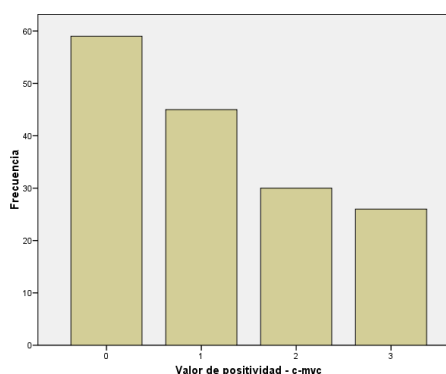
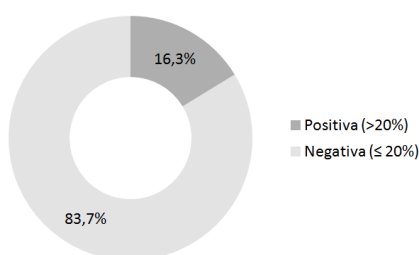
5. Conclusiones:

La proteína c-myc se distribuyó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral.

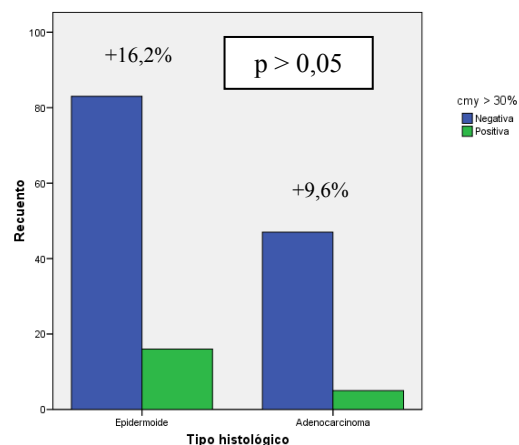
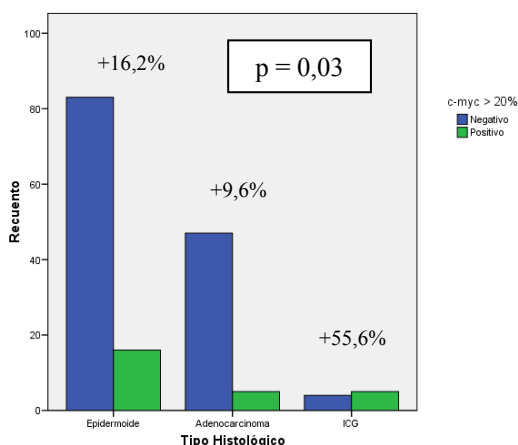
La expresión de proteína c-myc en más del 5 % de las células no resultó un factor pronóstico en nuestra serie.

2-6.6.b. Criterio 2: c-myc positiva si inmunorreactividad en > 20 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



2. Expresión en función del tipo histológico:

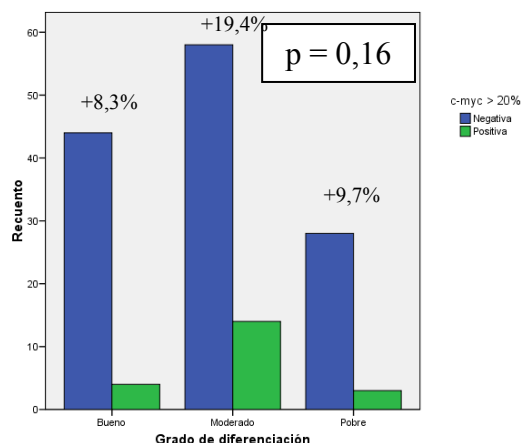
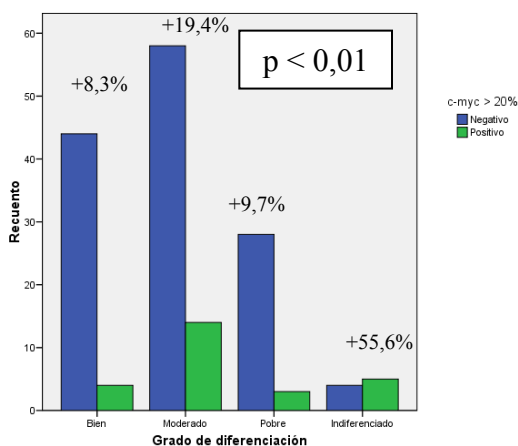


Encontramos que la expresión de c-myc es diferente en función del tipo histológico del tumor, a expensas de una mayor expresión en los tumores de tipo indiferenciados de células grandes.

Recodificando la variable para valorar si la expresión es homogénea entre los dos tipos histológicos más prevalentes (escamoso y adenocarcinoma), procedemos a repetir el cálculo eliminando los indiferenciados de células grandes (gráfico de la derecha).

En efecto, vemos cómo la expresión de c-myc considerando positiva la inmunorreactividad por encima del 20% de las células, es homogénea entre carcinoma escamoso y adenocarcinoma, y está aumentada de forma significativa en los carcinomas indiferenciados de células grandes.

3. Expresión en función del grado de diferenciación:



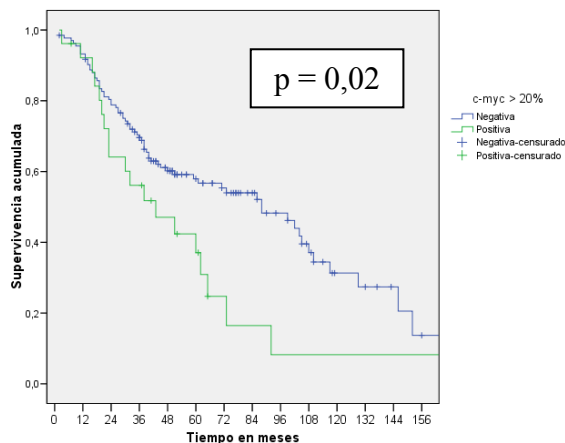
De igual manera vemos que la expresión de c-myc según el criterio definido previamente es significativamente mayor en los tumores indiferenciados. Si recodificamos eliminando dicho subgrupo de tumores, encontramos que

la expresión es homogénea entre los tumores bien, moderada y pobremente diferenciados ($p = 0,16$ en el test de chi-cuadrado de Pearson).

4. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



Encontramos que la expresión de c-myc con una inmunorreactividad en más del 20 % de las células se comporta como factor pronóstico de supervivencia global para los pacientes del estudio.

EXPRESIÓN	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana	IC 95 %
Negativa	93,2 %	69,6 %	57,9 %	88 meses	60 – 116 meses
Positiva	92,1 %	56,1 %	37,1 %	43 meses	15,4 – 70,6 meses

ii. Estratificando por tipo histológico.

El estudio univariante ajustado por tipo histológico mantiene la expresión de c-myc como factor pronóstico de supervivencia global en nuestra serie ($p = 0,03$).

iii. Estratificando por grado de diferenciación.

El estudio univariante ajustado por grado de diferenciación mantiene la expresión de c-myc como factor pronóstico de supervivencia global en nuestra serie ($p = 0,025$).

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox

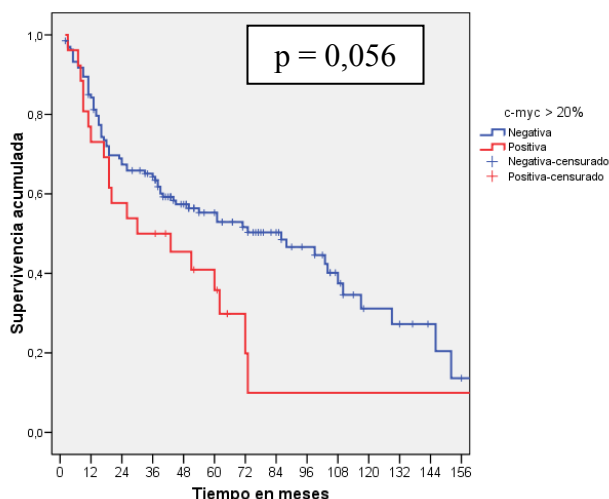
La expresión de c-myc actuó como factor pronóstico independiente de peor supervivencia en los pacientes analizados, ajustado por tipo histológico, asociándose a un aumento de 1,8 veces del riesgo a fallecer, con un IC al 95 %: 1,08 a 3,1 ($p=0,028$).

La expresión de c-myc actuó como factor pronóstico independiente de peor supervivencia en los pacientes analizados, ajustado por grado de diferenciación, asociándose a un aumento de 1,8 veces del riesgo a fallecer, con un IC al 95 %: 1,08 a 3 (p=0,025).

5. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



Encontramos que la expresión de c-myc con una inmunorreactividad en más del 20 % de las células presenta una tendencia que no llega a ser significativa a comportarse como factor de mal pronóstico de supervivencia libre de recidiva en la serie (p= 0,056).

ii. Estratificando por tipo histológico y por grado de diferenciación

No aparecen diferencias en las curvas de supervivencia cuando se estratifica por tipo histológico y grado de diferenciación. Sin embargo persistió la tendencia de forma similar, de modo que la expresión de c-myc por encima del 20 % en las muestras mostró casi actuar como factor de mal pronóstico en cuanto a supervivencia libre de enfermedad (p= 0,055 y 0,064 en ajustes por tipo histológico y por grado de diferenciación, respectivamente).

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,63. IC 95 \% (0,98 - 2,71). p = 0,06$$

La expresión de c-myc mostró una importante tendencia a actuar como factor de mal pronóstico cuando se analizó la supervivencia libre de enfermedad, si bien no llegó a ser estadísticamente significativa por ser el límite inferior del intervalo de confianza al 95 % de 0,98, es decir, algo inferior a 1 (p=0,06).

6. “Conclusiones”

La expresión de c-myc con inmunorreactividad en más del 20 % de las células no fue homogénea por tipo histológico. Se asoció a una mayor expresión en los tumores indiferenciados de células grandes. Si eliminamos los casos con ese tipo histológico, la expresión en epidermoides y adenocarcinomas sí es homogénea.

Como es de esperar la expresión fue mayor en los tumores con una grado de diferenciación bajo o tumores indiferenciados, como hemos dicho.

Encontramos que la expresión de c-myc con inmunorreactividad en más del 20 % de las células se comporta como factor pronóstico de supervivencia global para los pacientes del estudio ($p=0,02$).

La expresión de c-myc actuó como factor pronóstico independiente de peor supervivencia en los pacientes analizados, ajustado por tipo histológico, asociándose a un aumento de 1,8 veces del riesgo a fallecer, con un IC al 95 %: 1,08 a 3,1 ($p=0,028$).

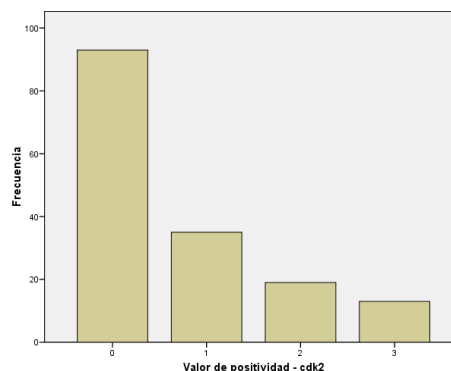
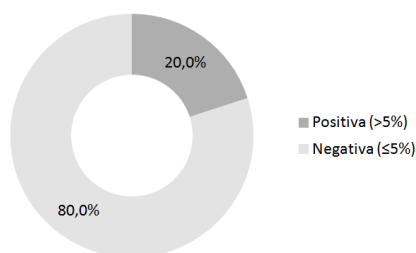
La expresión de c-myc actuó como factor pronóstico independiente de peor supervivencia en los pacientes analizados, ajustado por grado de diferenciación, asociándose a un aumento de 1,8 veces del riesgo a fallecer, con un IC al 95 %: 1,08 a 3 ($p=0,025$).

La expresión de c-myc mostró también comportarse como factor de mal pronóstico independiente, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo, cuando se analizó la supervivencia libre de enfermedad. ($p=0,6$).

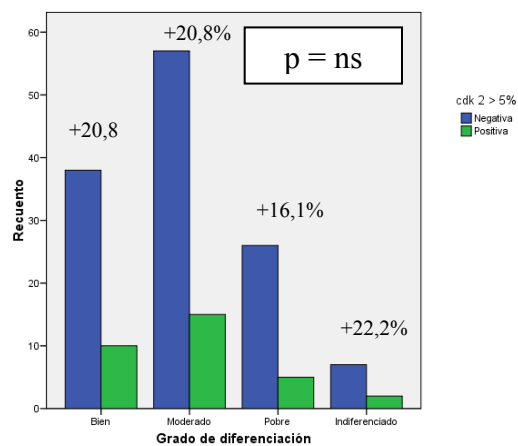
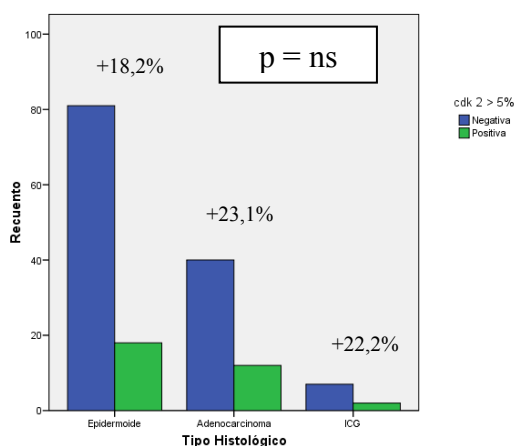
2-6.7. Proteína cdk2

2-6.7.a. Criterio 1: cdk2 positiva si inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



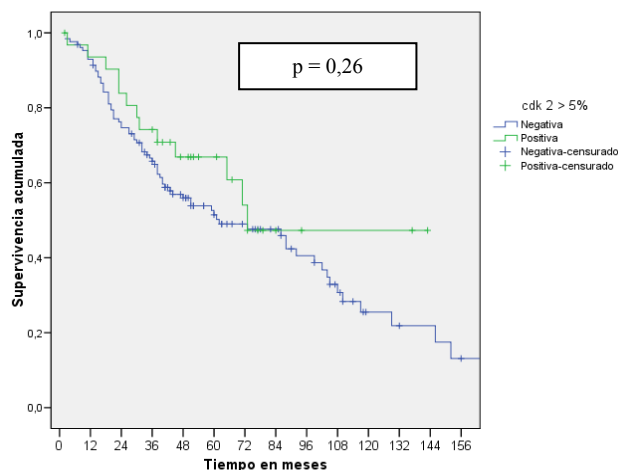
2. Expresión en función del tipo histológico:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

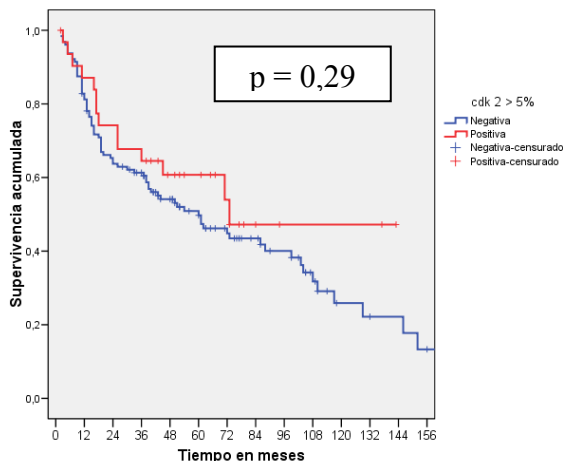
i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 0,72. IC 95 % (0,4 – 1,29). p = 0,27

4. Supervivencia libre de recidiva:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 0,74. IC 95 % (0,42 – 1,31). p = 0,3

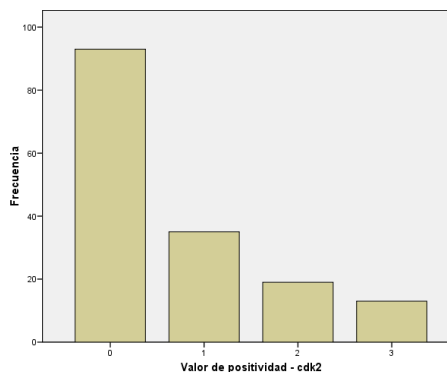
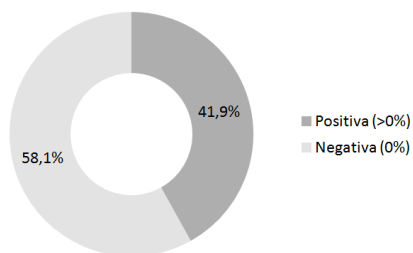
5. Conclusiones:

La proteína cdk2 se expresó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral.

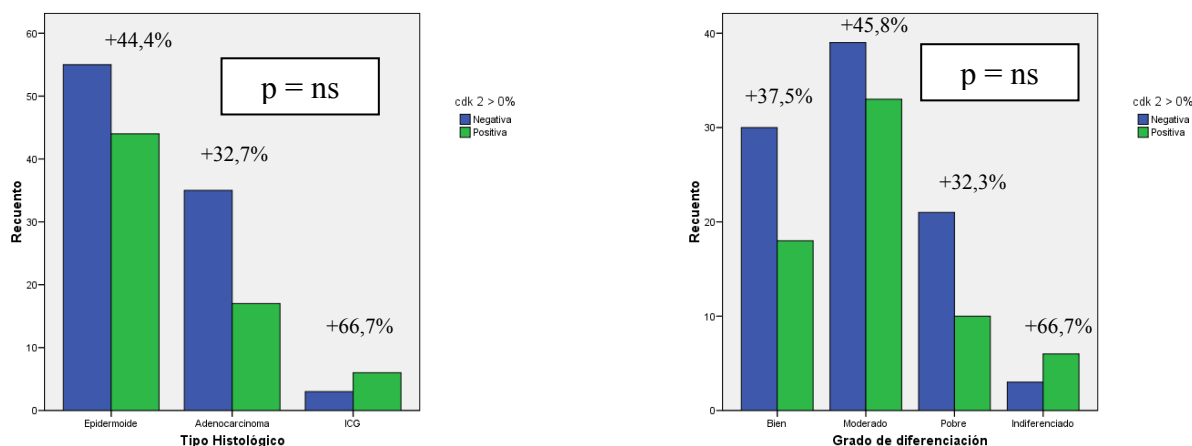
La expresión de proteína cdk2 en más del 5 % de las células no resultó un factor pronóstico en nuestra serie.

2-6.7.b. Criterio 2: cdk2 positiva si cualquier valor de inmunorreactividad

1. Tasa de expresión de la proteína:



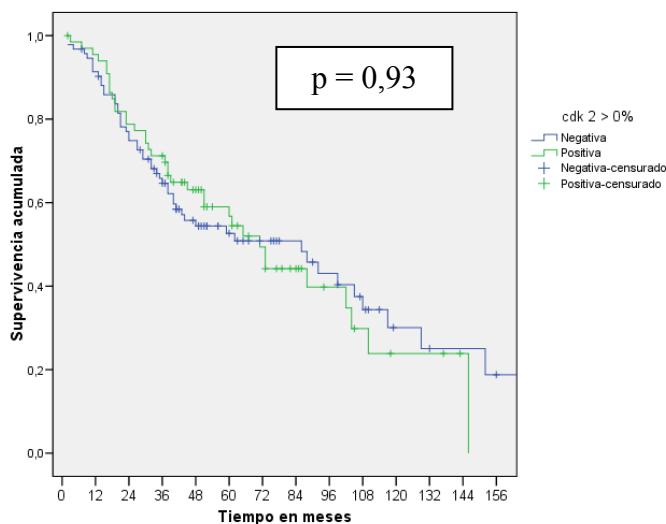
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

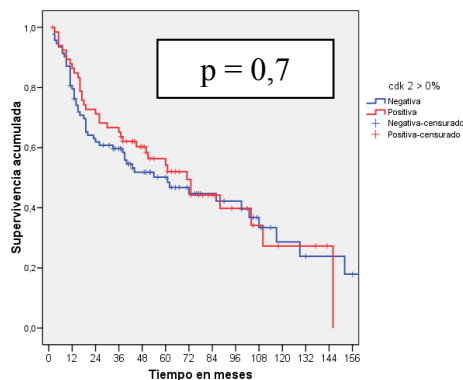
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,02. IC 95 \% (0,67 - 1,56). p = 0,93$$

4. “Supervivencia libre de recidiva”

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 1,09. IC 95 % (0,71 – 1,66). p = 0,7

5. Conclusiones:

La proteína cdk2 se expresó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral.

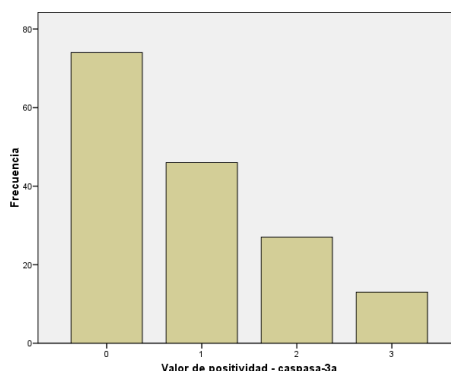
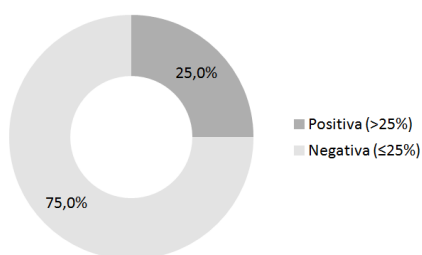
La expresión de proteína cdk2 en cualquier porcentaje de células no resultó un factor pronóstico en nuestra serie.

* * *

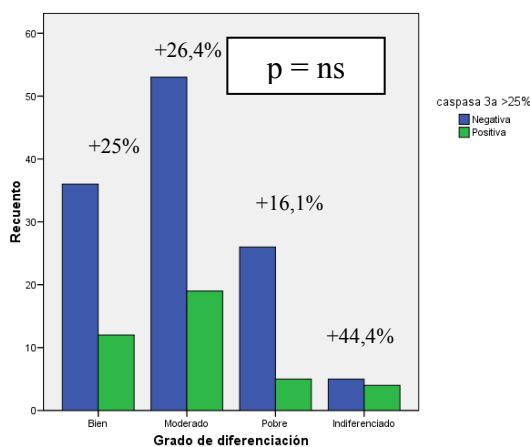
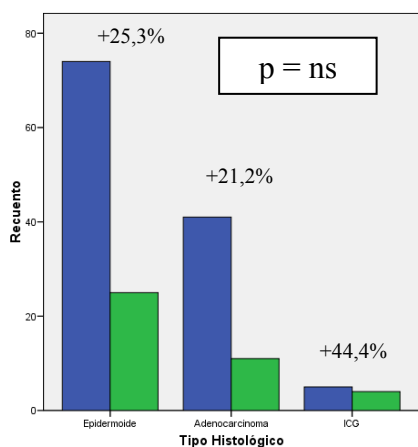
2-6.8. Proteína caspasa 3a

2-6.8.a. Criterio único: caspasa 3a positiva si inmunorreactividad en > 25 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



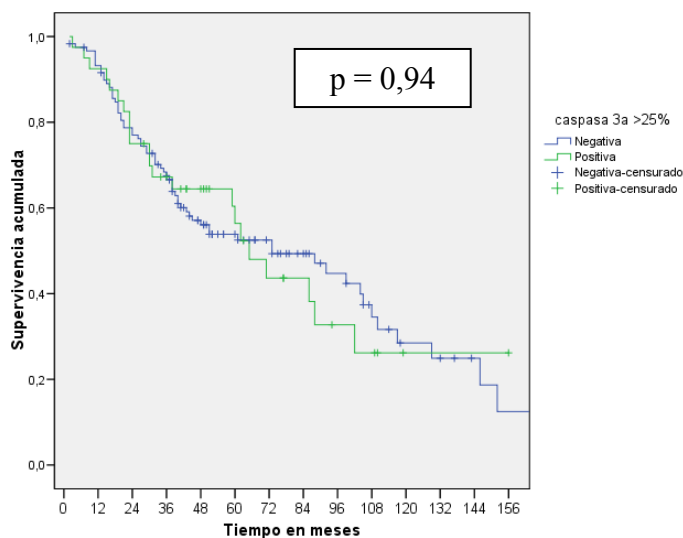
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

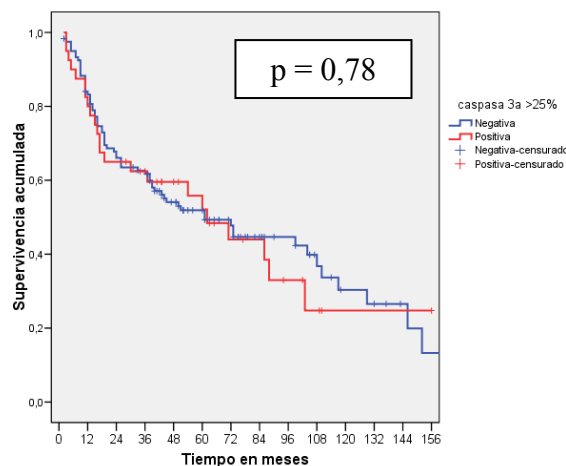
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,02. IC 95 \% (0,69 - 1,65). p = 0,94$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,09. IC 95 \% (0,67 - 1,72). p = 0,79$$

5. Conclusiones:

La proteína caspasa 3a se expresó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral.

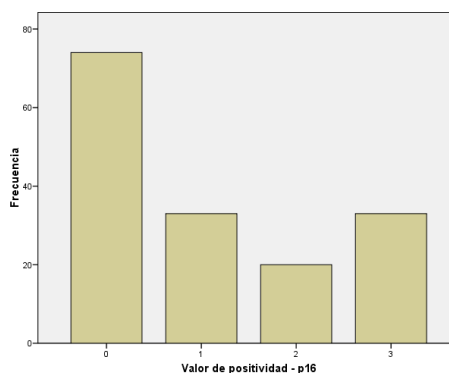
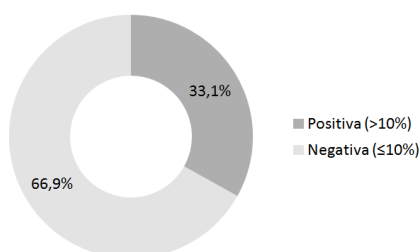
La expresión de caspasa 3a con inmunorreactividad en más del 25 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

* * *

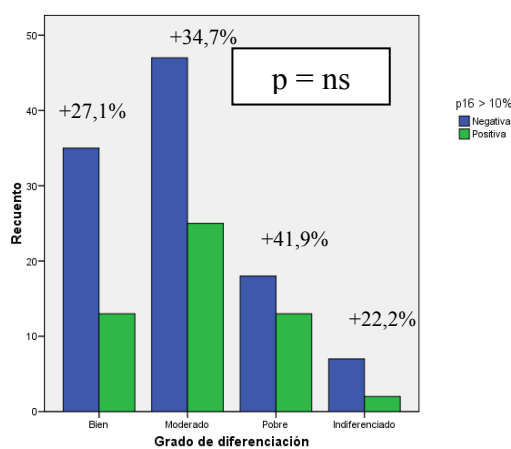
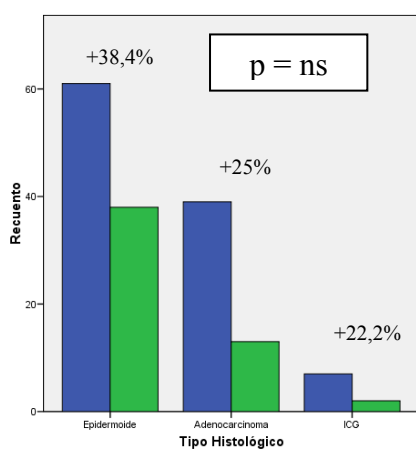
2-6.9. Proteína p16

2-6.9.a. Criterio único: p16 positiva si inmunorreactividad en > 10 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



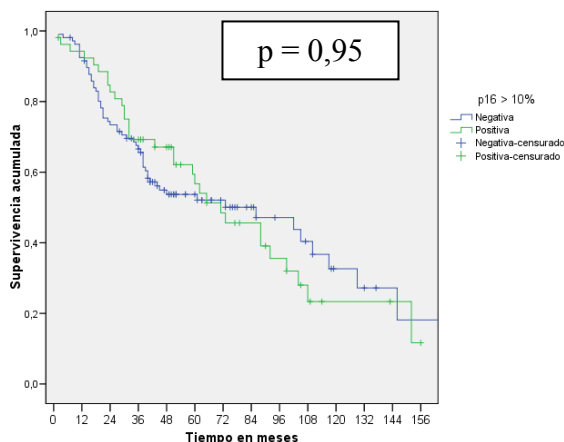
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

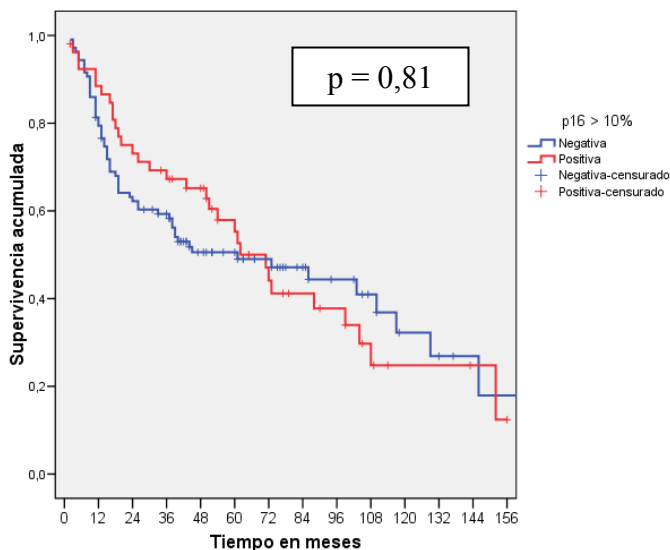
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,01. IC 95 \% (0,66 - 1,57). p = 0,95$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,95. IC 95 \% (0,62 - 1,46). P = 0,81$$

5. “Conclusiones”

La proteína p16 se expresó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral.

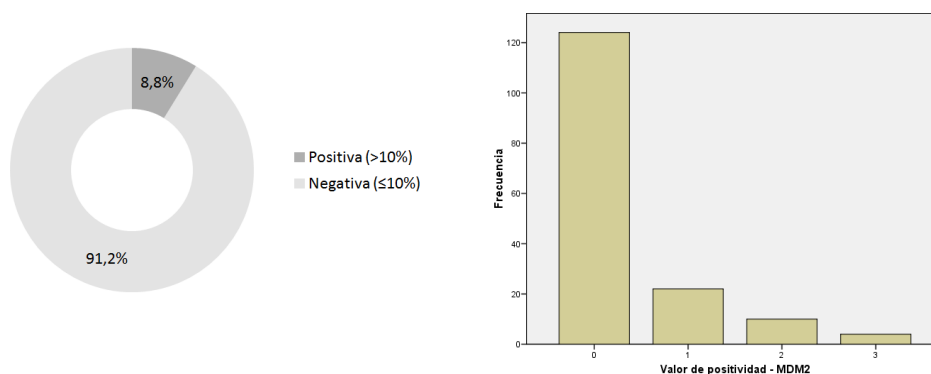
La expresión de p16 con inmunorreactividad en más del 10 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

* * *

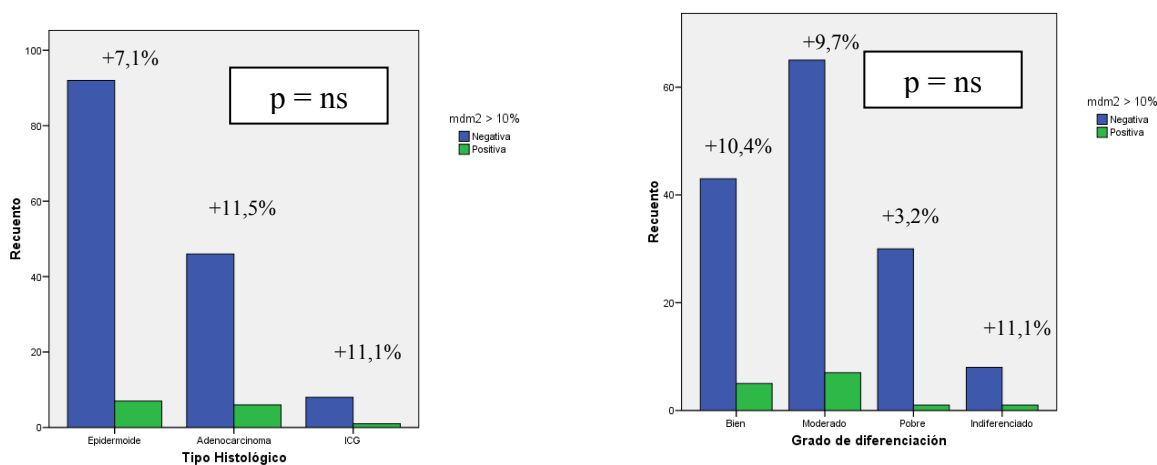
2-6.10. Proteína mdm2

2-6.10.a. Criterio único: mdm2 positiva si inmunorreactividad en > 10 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



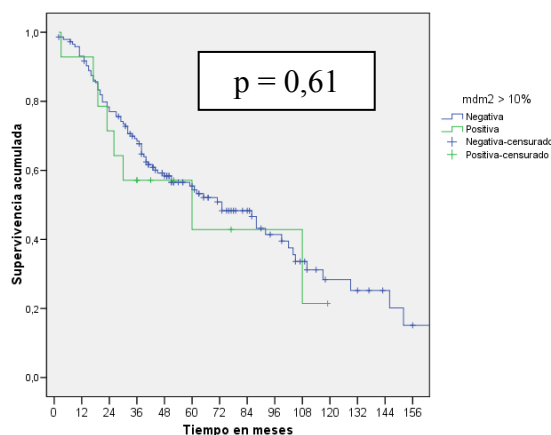
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. “Supervivencia global”

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

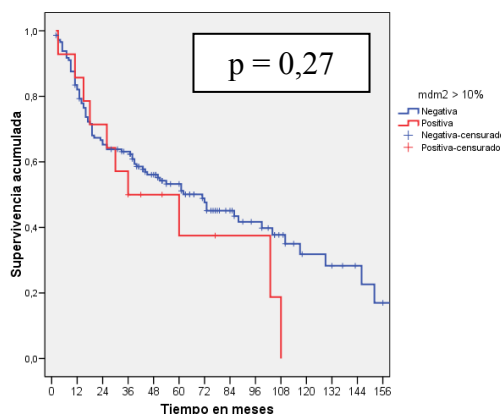
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,21. IC 95 \% (0,58 - 2,5). p = 0,61$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,43. IC 95 \% (0,74 - 2,78). p = 0,29.$$

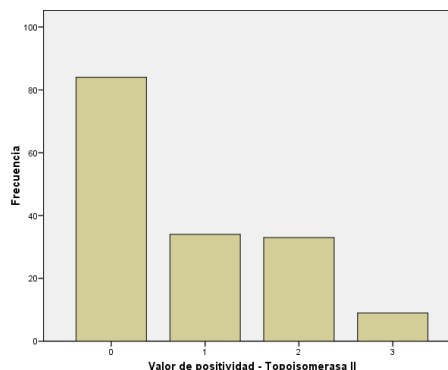
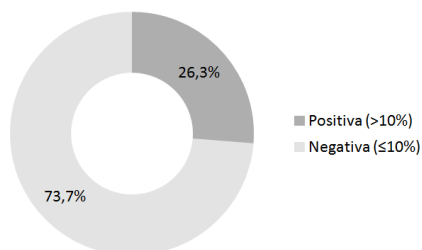
5. Conclusiones:

La proteína mdm2 se expresó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral. La expresión de mdm2 con inmunorreactividad en más del 10 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

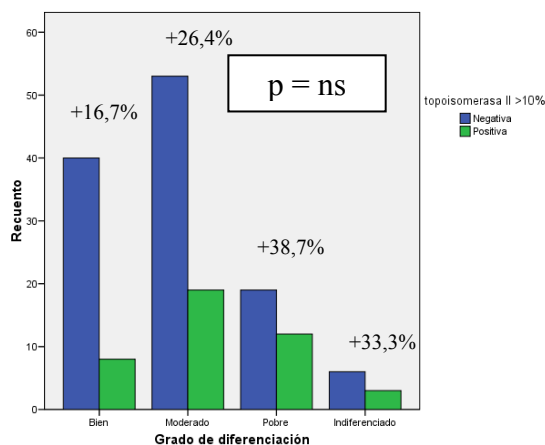
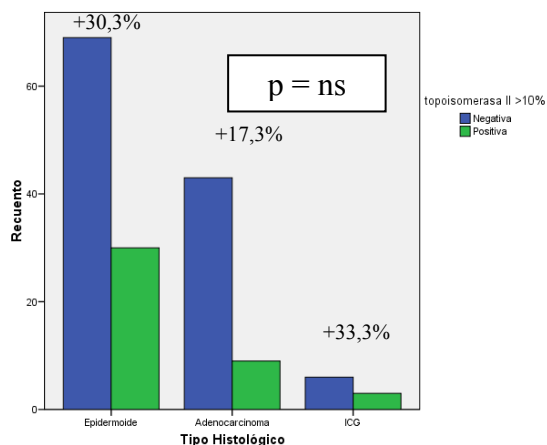
2-6.11. Proteína Topoisomerasa II

2-6.11.a. Criterio único: topoisomerasa positiva si inmunorreactividad en > 10 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



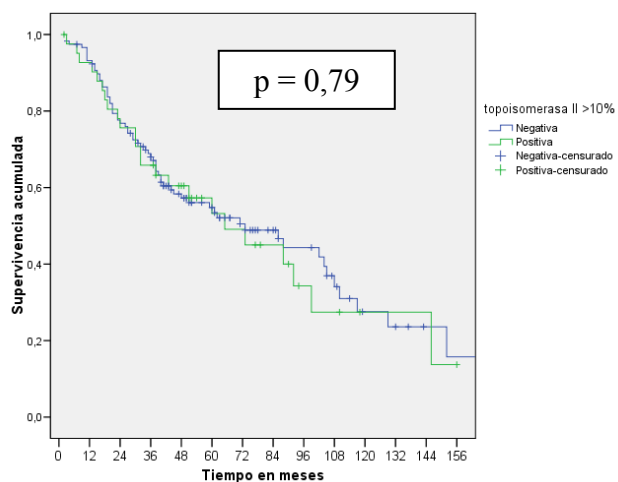
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

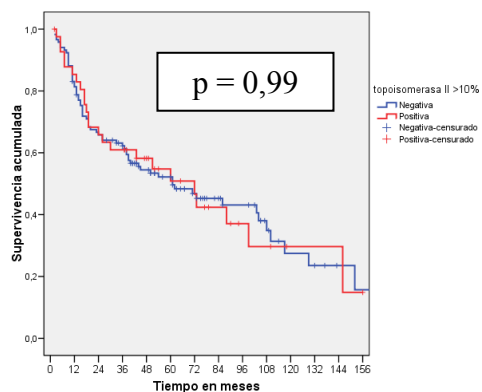
i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 1,07. IC 95 % (0,67 – 1,71). p = 0,79

4. Supervivencia libre de recidiva:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 1. IC 95 % (0,63 – 1,6). p = 0,99

5. Conclusiones:

La proteína Topoisomerasa II se expresó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación tumoral.

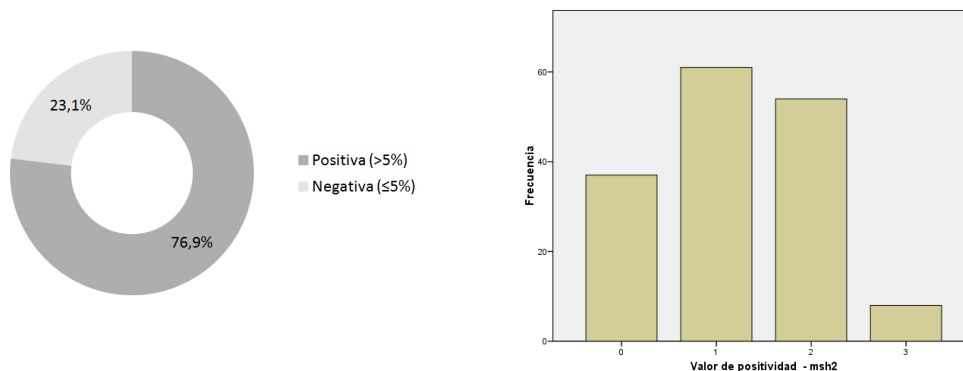
La expresión de Topoisomerasa II con inmunorreactividad en más del 10 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

* * *

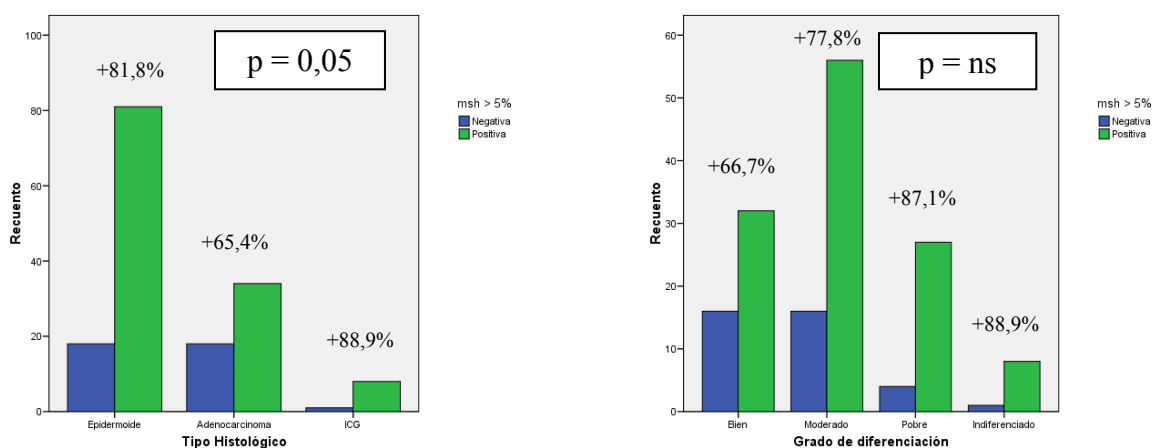
2-6.12. Proteína msh2

2-6.12.a. Criterio único: msh2 positiva si inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



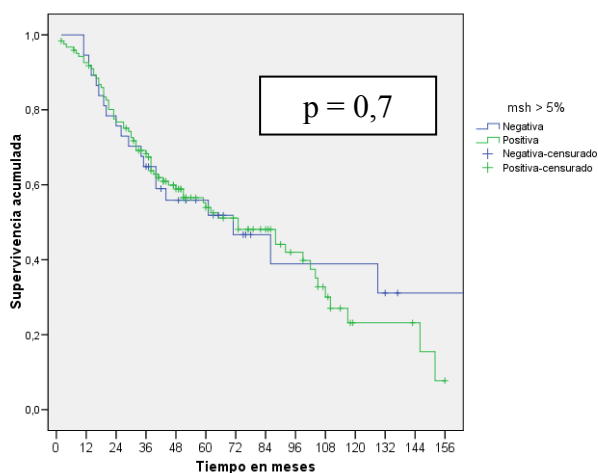
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: No hay diferencias en el estudio univariante ajustando por tipo histológico.

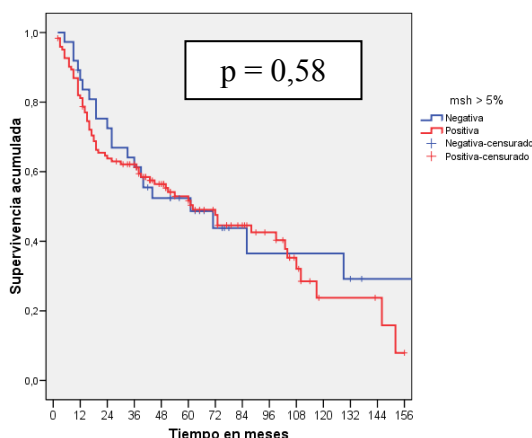
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,1. IC 95 \% (0,67 - 1,83). p = 0,7$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia libre de recidiva por tipo histológico: no hay diferencias significativas.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de cox:

$$HR = 1,15. IC 95 \% (0,7 - 1,86). p = 0,58$$

5. Conclusiones:

La proteína msh2 se expresó con mayor intensidad en los carcinomas escamosos que en los adenocarcinomas ($p=0,05$). No varió la expresión por grado de diferenciación.

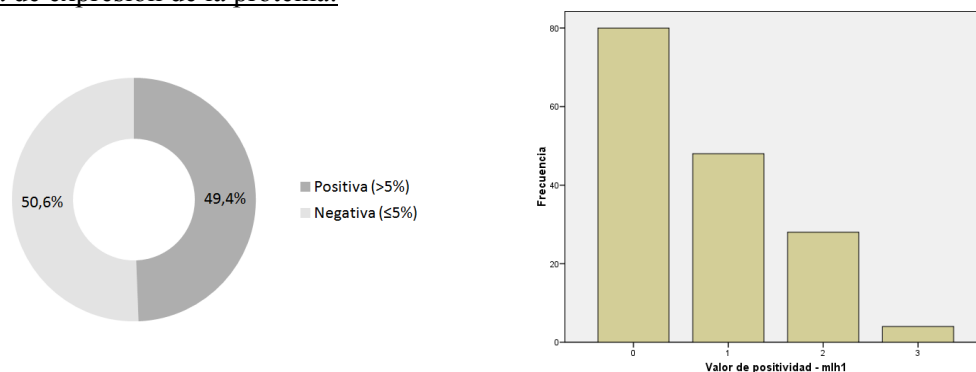
La expresión de msh2 con inmunorreactividad en más del 5 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie, ni de forma conjunta, ni estratificando por tipo histológico.

* * *

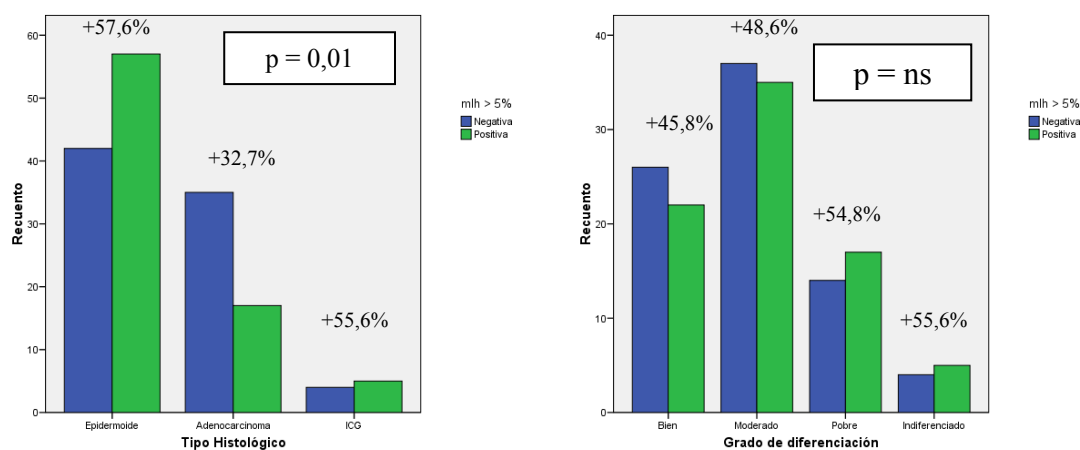
2-6.13. Proteína mlh1

2-6.13.a. Criterio único: mlh1 positiva si inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



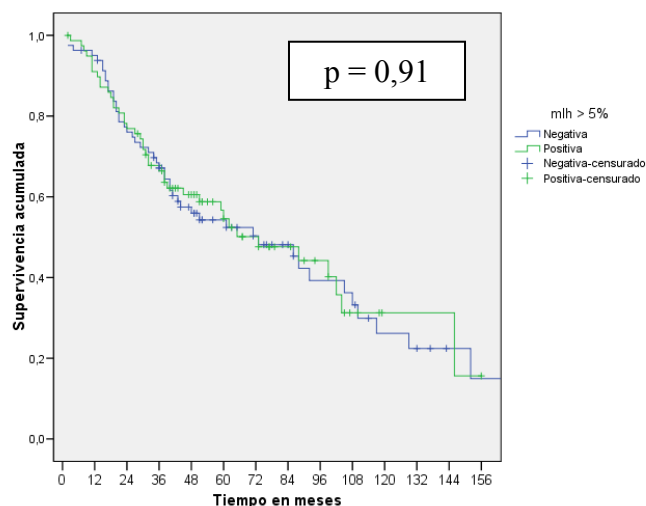
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: sin diferencias significativas.

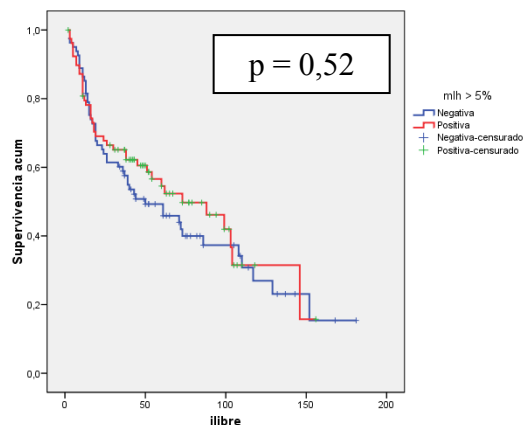
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 0,98. IC 95 % (0,64 – 1,49). p = 0,91

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia libre de recidiva por tipo histológico: sin diferencias significativas.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 0,87. IC 95 % (0,58 – 1,33). p = 0,53

5. Conclusiones:

La proteína mlh1 se expresó con mayor intensidad en los carcinomas escamosos que en los adenocarcinomas (p=0,01). No varió la expresión por grado de diferenciación.

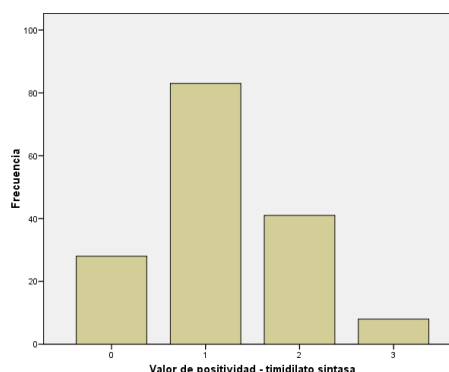
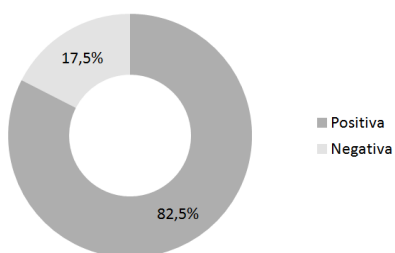
La expresión de mlh1 con inmunorreactividad en más del 5 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie, ni de forma conjunta, ni estratificando por tipo histológico.

* * *

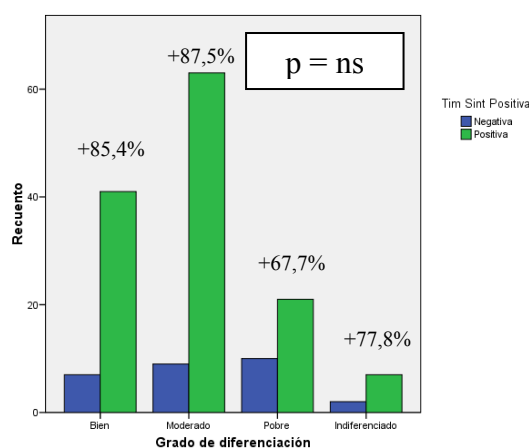
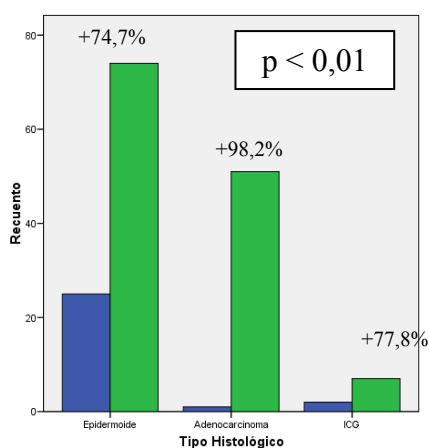
2-6.14. Proteína timidilato sintasa

2-6.14.a. Criterio único: timidilato sintasa positiva para cualquier grado de inmunorreactividad

1. Tasa de expresión de la proteína:



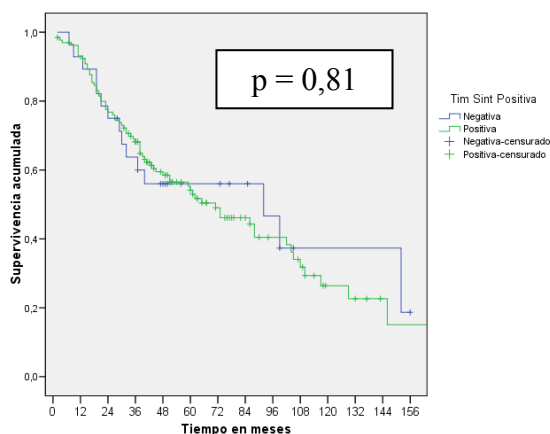
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: no hay diferencias significativas

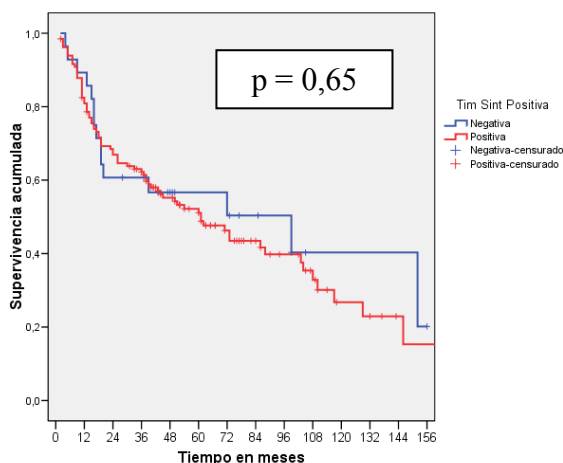
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,07. IC 95 \% (0,61 - 1,88). p = 0,81$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia libre de recidiva por tipo histológico: no hay diferencias significativas.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,14. IC 95 \% (0,65 - 1,99). p = 0,65$$

5. Conclusiones:

La proteína timidilato sintasa se expresó con mayor intensidad en los adenocarcinomas que en los demás tipos histológicos ($p=0,03$). No varió la expresión por grado de diferenciación.

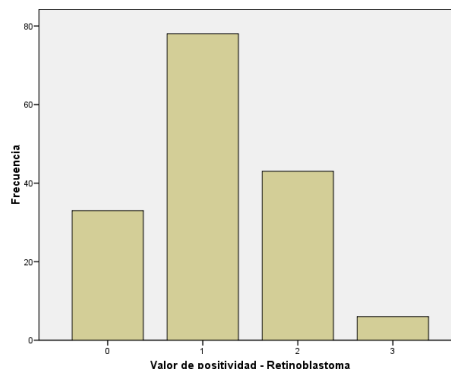
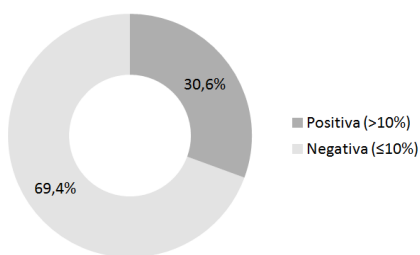
La expresión de timidilato sintasa con cualquier grado de inmunorreactividad no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie, ni de forma conjunta, ni estratificando por tipo histológico.

* * *

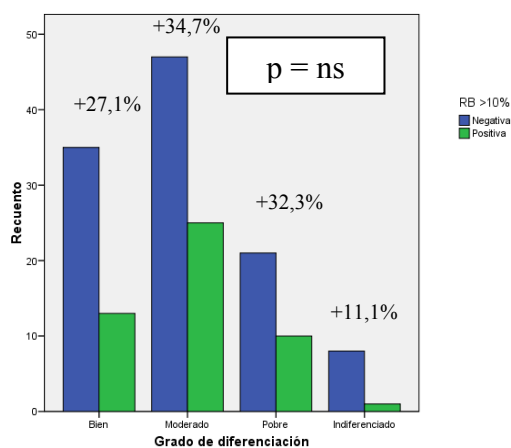
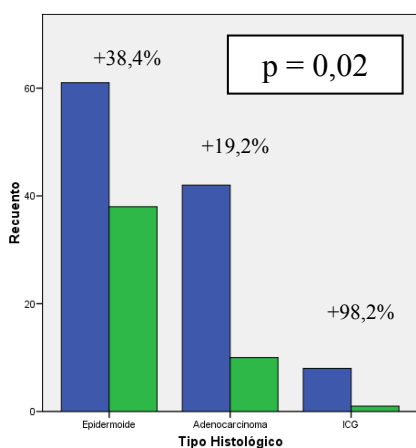
2-6.15. Proteína supresora del retinoblastoma (pRb)

2-6.15.a. Criterio único: pRb positiva si inmunorreactividad en > 10 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



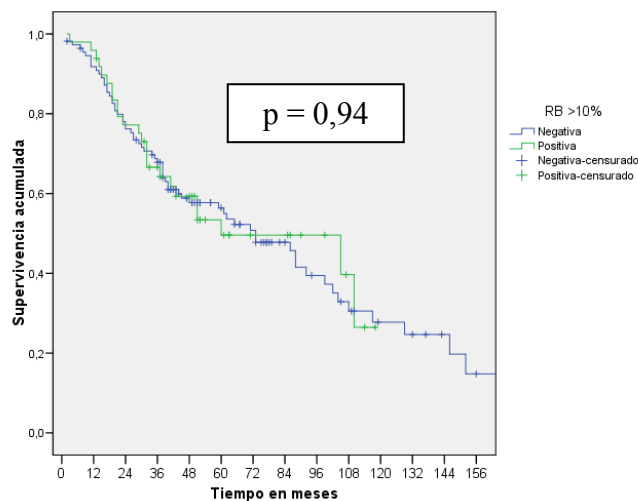
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

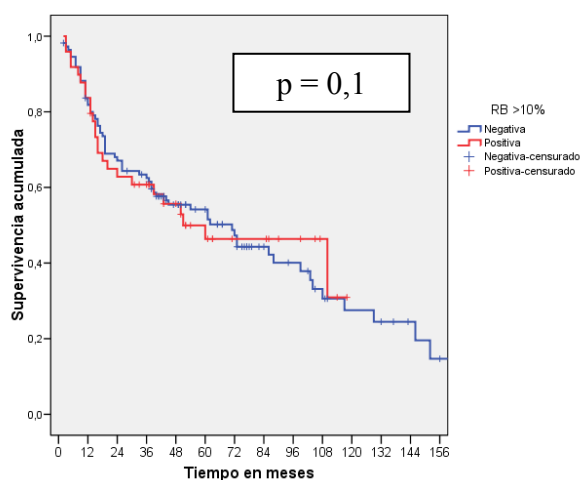
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,98. IC 95 \% (0,61 - 1,58). p = 0,94$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia libre de recidiva por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1. IC 95 \% (0,69 - 1,6). p = 0,1$$

5. Conclusiones:

La proteína del retinoblastoma se expresó con mayor intensidad en los tumores de estirpe escamosa que en los adenocarcinomas que en los demás tipos histológicos ($p=0,02$). No varió la expresión por grado de diferenciación.

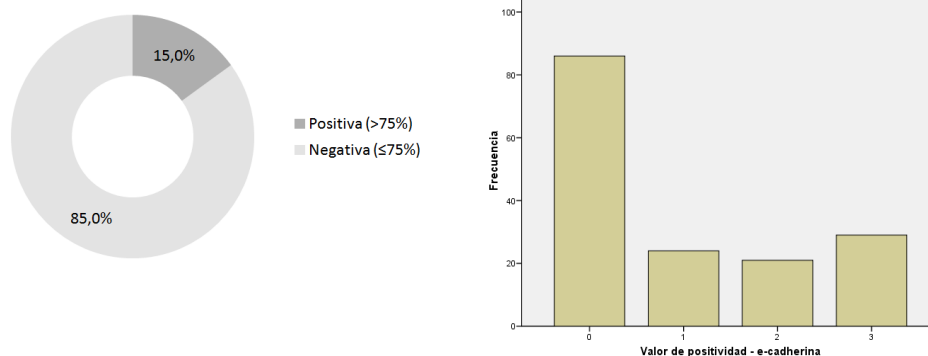
La expresión de la proteína del retinoblastoma con un inmunorreactividad positiva en más del 10 % de las células del tumor no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie, ni de forma conjunta, ni estratificando por tipo histológico.

* * *

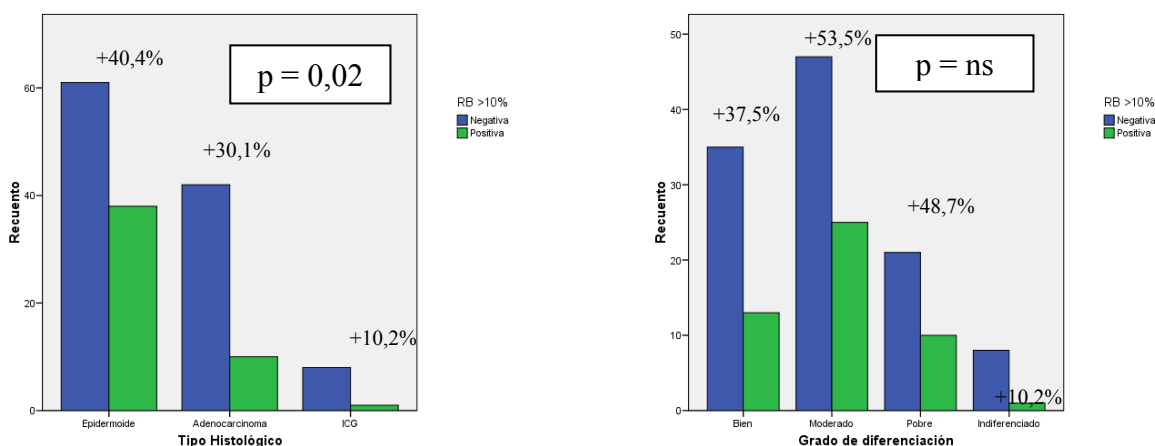
2-6.16. Proteína e-cadherina

2-6.16.a. Criterio único: E-cadherina positiva si inmunorreactividad en > 75 %

1. Tasa de expresión de la proteína:

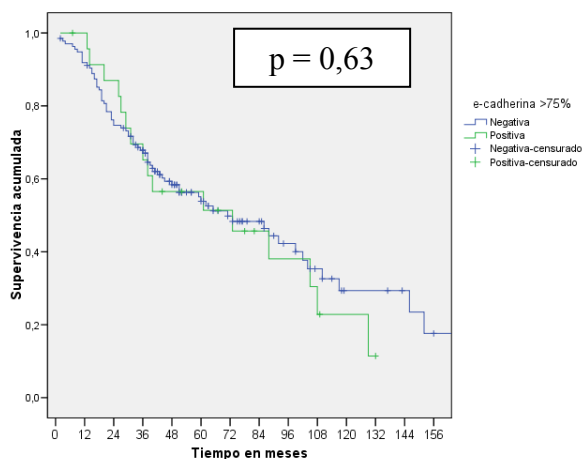


2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

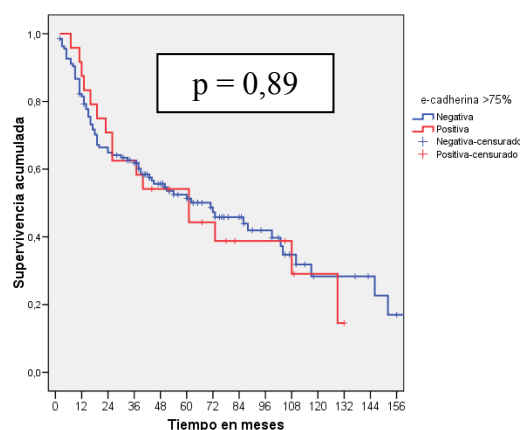
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 1,15. IC 95 % (0,66 – 1,97). p = 0,63

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia libre de recidiva por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 1,07. IC 95 % (0,62 – 1,84). p = 0,81

5. Conclusiones:

La proteína e-cadherina se expresó con mayor intensidad en los tumores de estirpe escamosa que en los adenocarcinomas que en los demás tipos histológicos (p=0,02). No varió la expresión por grado de diferenciación.

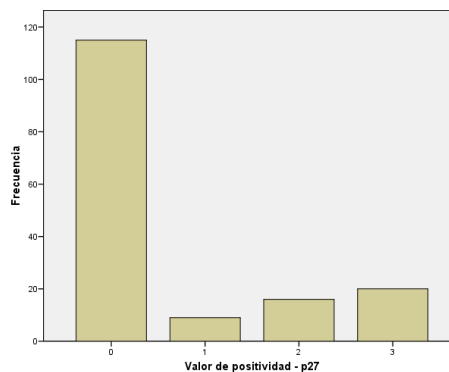
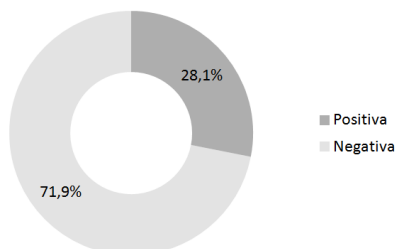
La expresión de e-cadherina con inmunorreactividad positiva en más del 75 % de las células del tumor no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie, ni de forma conjunta, ni estratificando por tipo histológico.

* * *

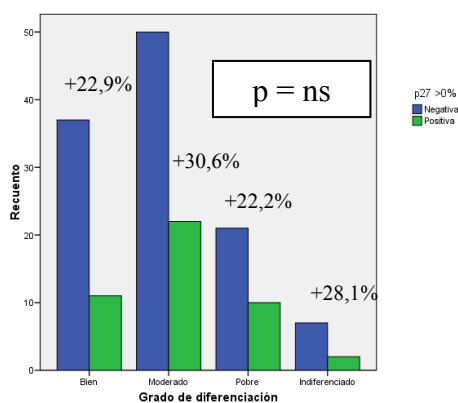
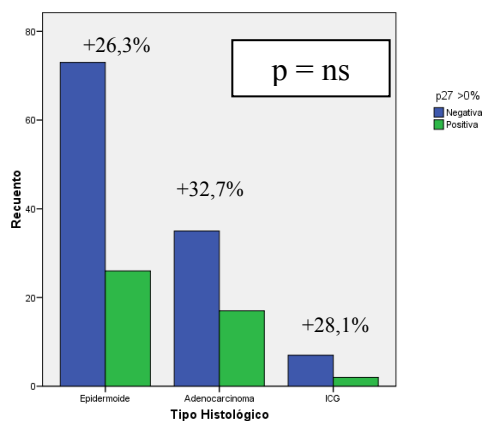
2-6.17. Proteína p27

2-6.17.a. Criterio 1: p27 positiva con cualquier grado de inmunorreactividad

1. Tasa de expresión de la proteína:



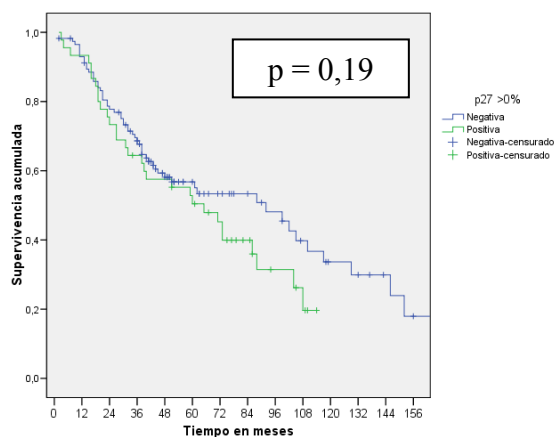
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

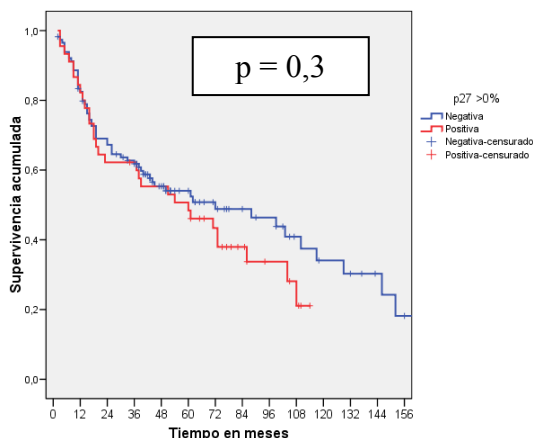
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,34. IC 95 \% (0,86 - 2,1). p = 0,2$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,26. IC 95 \% (0,81 - 1,96). p = 0,31$$

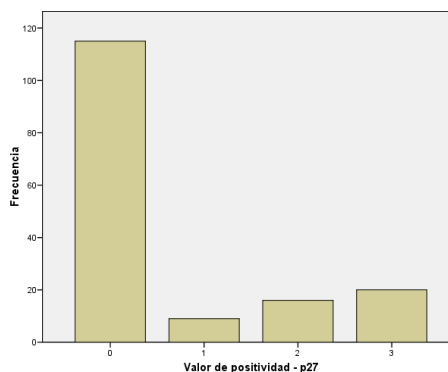
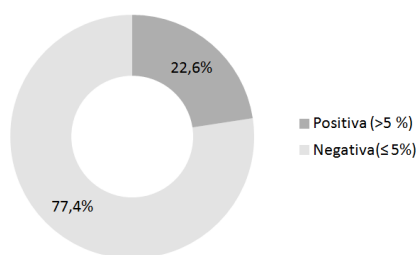
5. Conclusiones:

No hubo diferencias en la expresión de p27 (considerando cualquier grado de expresión) por tipo histológico ni grado de diferenciación.

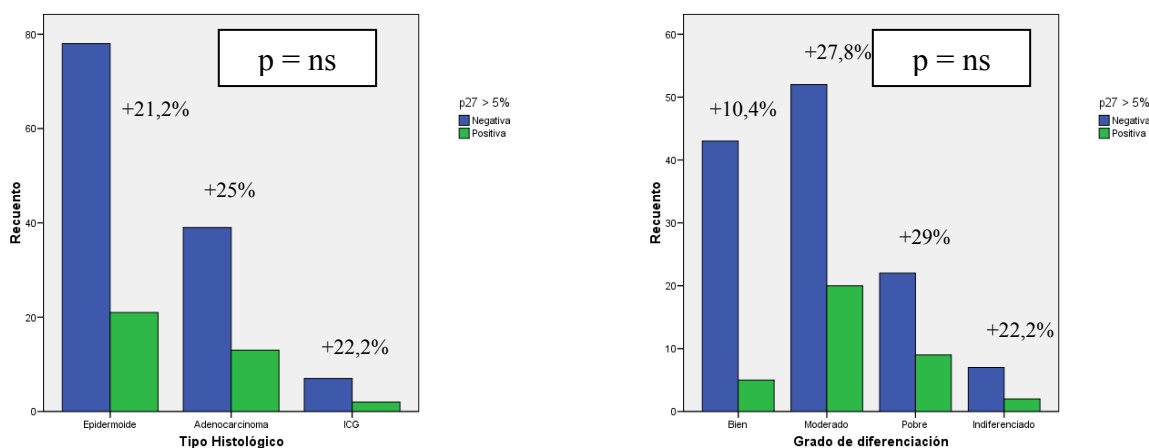
La expresión de p27 con inmunorreactividad en cualquier porcentaje de células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

2-6.17.b. Criterio 2: p27 positiva con inmunorreactividad en > 5 %

1. “Tasa de expresión de la proteína”:



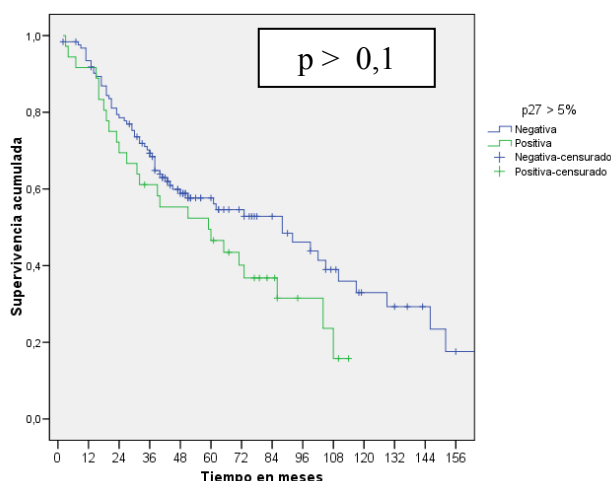
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

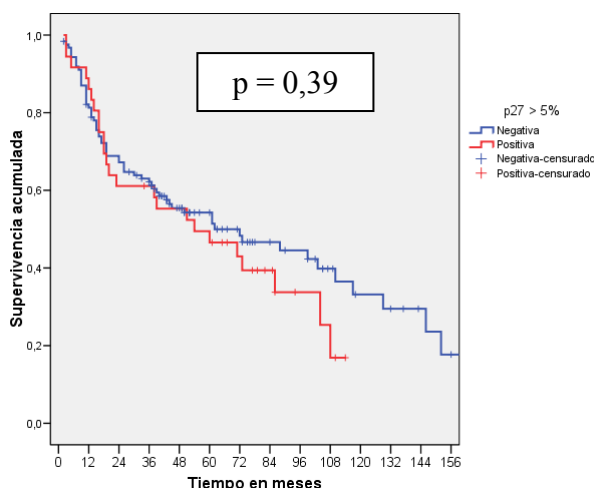
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,49. IC 95 \% (0,93 - 2,38). p > 0,1$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,26. IC\ 95\ \% (0,81 - 1,96). p = 0,31$$

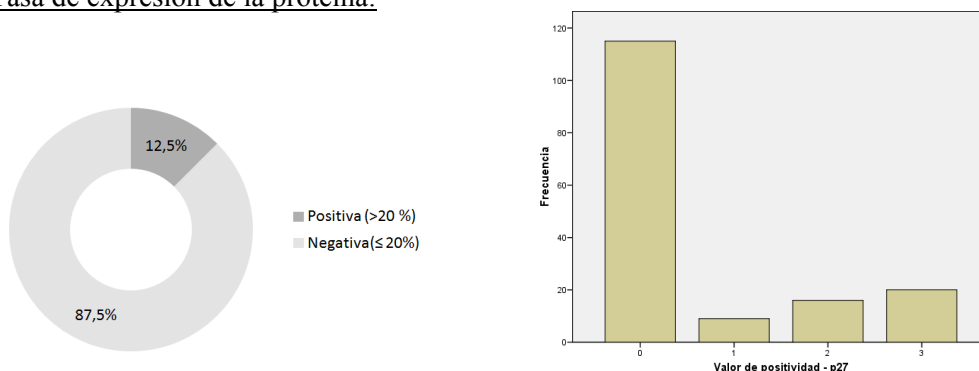
5. Conclusiones:

No hubo diferencias en la expresión de p27 (considerando expresión positiva si inmunorreactividad en más del 5 % de las células) por tipo histológico ni grado de diferenciación.

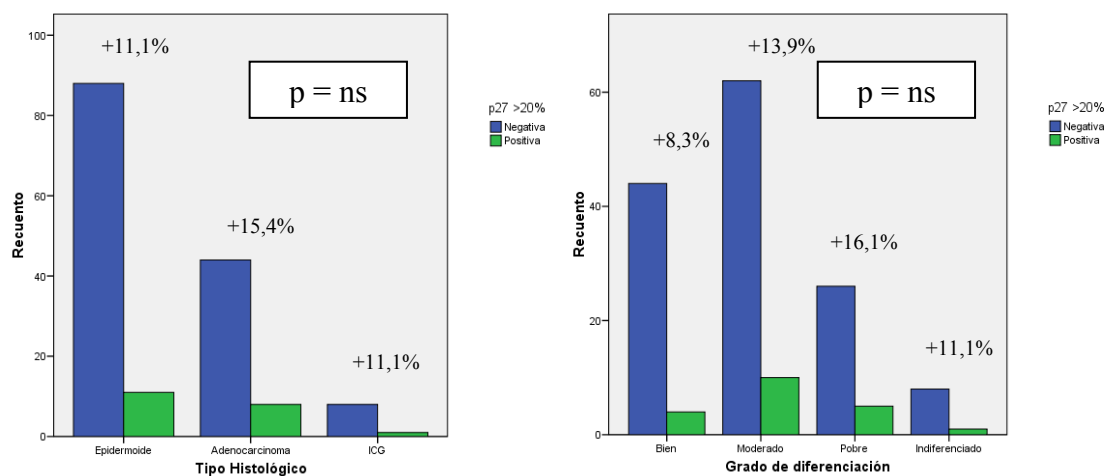
La expresión de p27 con inmunorreactividad positiva en más del 5 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

2-6.17.c. Criterio 3: p27 positiva con inmunorreactividad en > 20 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



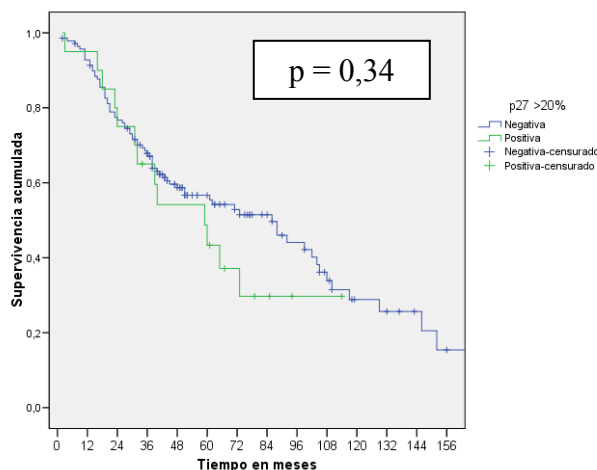
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

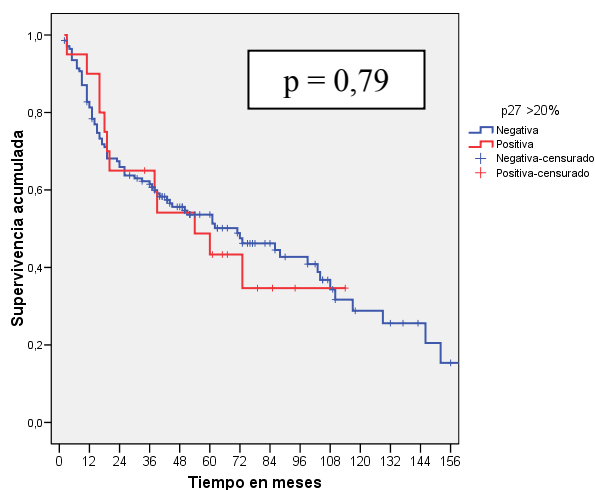
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 1,33. IC 95 % (0,74 – 2,41). p = 0,35

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 1,09. IC 95 \% (0,6 - 2). p = 0,79$$

5. Conclusiones:

No hubo diferencias en la expresión de p27 (considerando expresión positiva si inmunorreactividad en más del 20 % de las células) por tipo histológico ni grado de diferenciación.

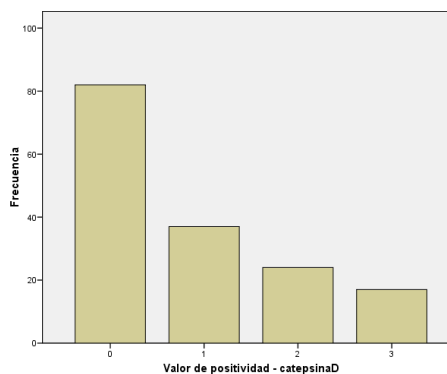
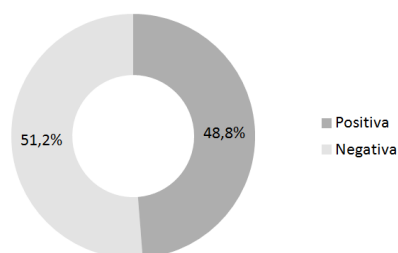
La expresión de p27 con inmunorreactividad positiva en más del 20 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

* * *

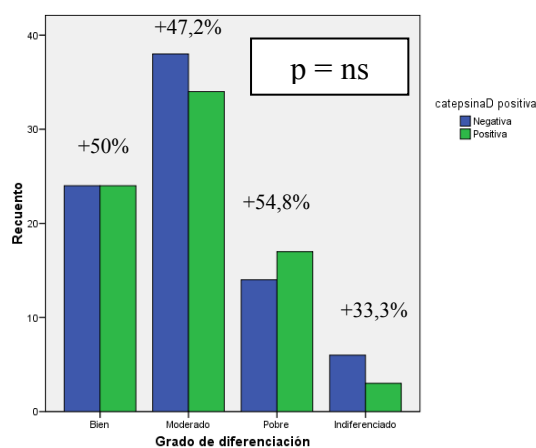
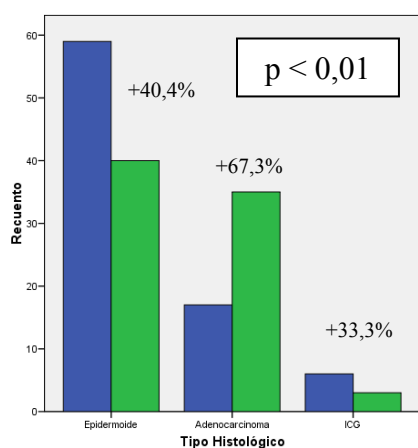
2-6.18. Proteína catepsina D

2-6.18.a. Criterio 1: catepsina D positiva con cualquier grado de inmunorreactividad

1. Tasa de expresión de la proteína:



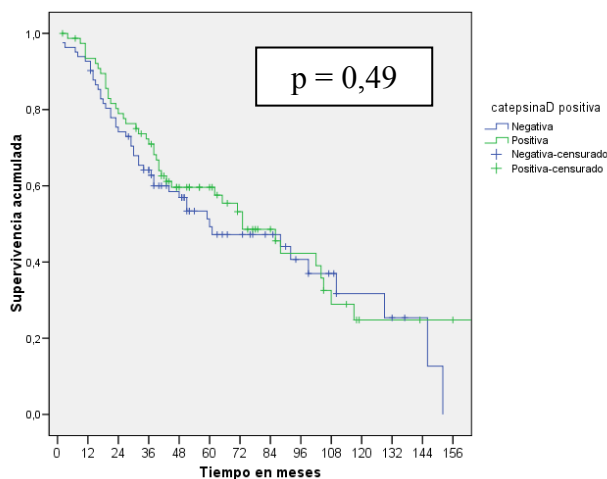
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: no hubo diferencias significativas

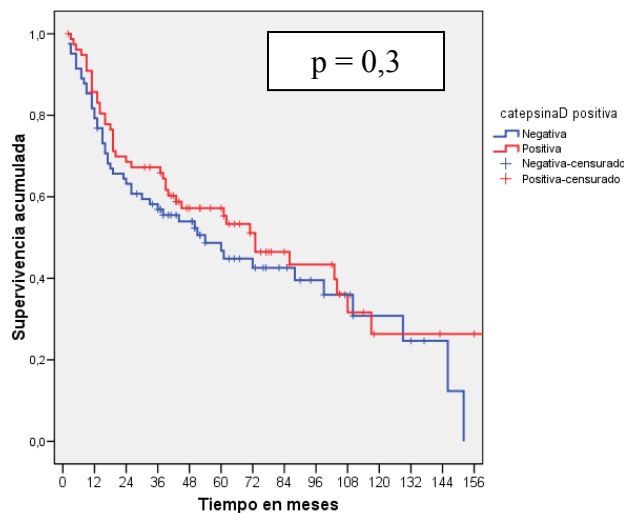
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,88. IC 95 \% (0,56 - 1,3). p = 0,47$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia libre de recidiva por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,81. IC 95 \% (0,53 - 1,22). p = 0,31$$

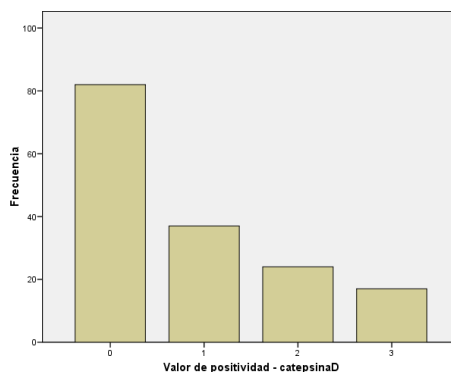
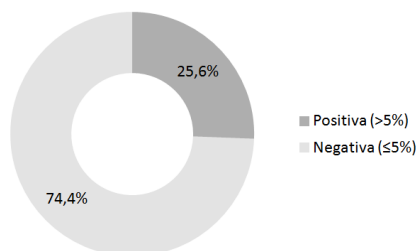
5. Conclusiones:

La proteína catepsina D se expresó con mayor intensidad en los adenocarcinomas que en el resto de tipos histológicos ($p=0,02$). No varió la expresión por grado de diferenciación.

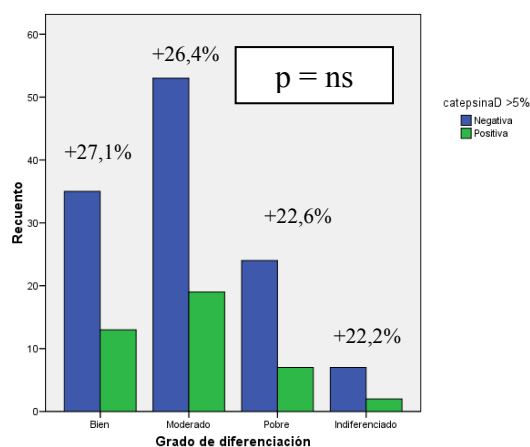
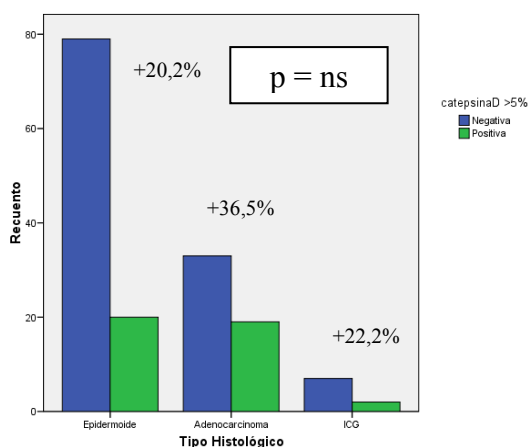
La expresión de catepsina D con inmunorreactividad positiva en cualquier porcentaje de células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie, ni de forma conjunta, ni estratificando por tipo histológico.

2-6.18.b. Criterio 2: catepsina D positiva con inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



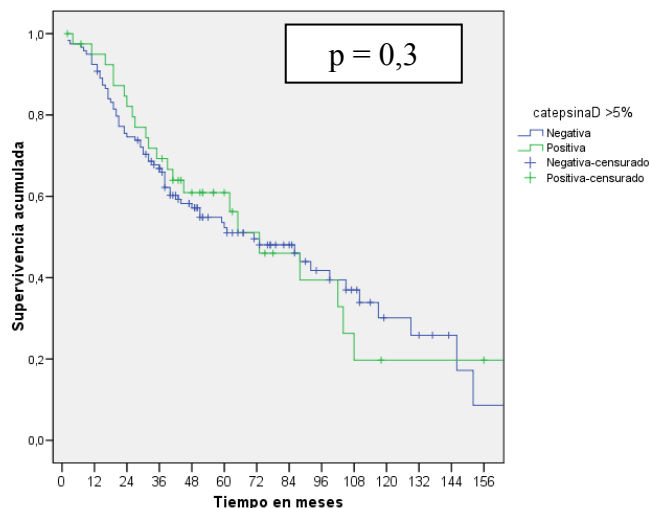
2. Expresión en función del tipo histológico y grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

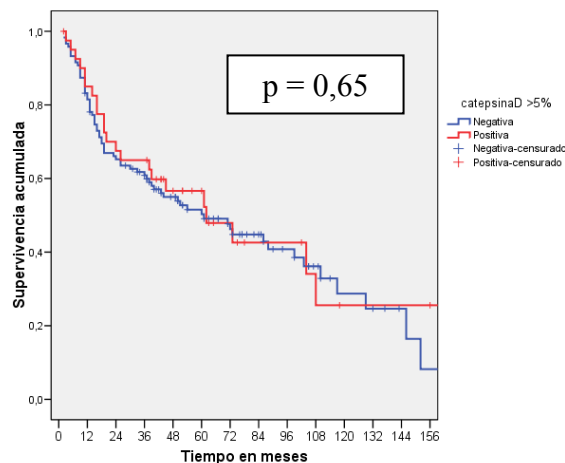
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,94. IC 95 \% (0,58 - 1,52). p = 0,8$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

- i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,89. IC 95 \% (0,55 - 1,45). p = 0,65$$

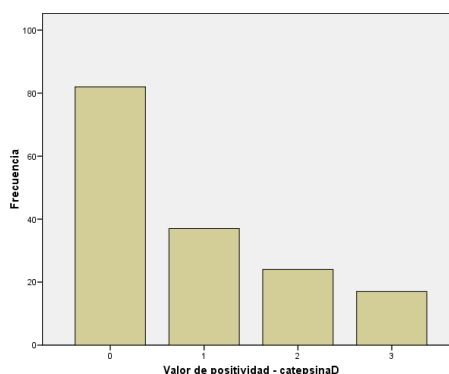
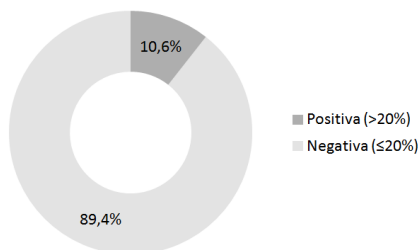
5. Conclusiones:

La expresión de la proteína catepsina D, considerando su expresión positiva con inmunorreactividad en más del 5 % de las células, continuó mostrando una tendencia a expresarse con mayor intensidad en los adenocarcinomas; sin embargo perdió la diferencia estadística con respecto a su expresión en otros tipos histológicos ($p=0,08$). No varió la expresión por grado de diferenciación.

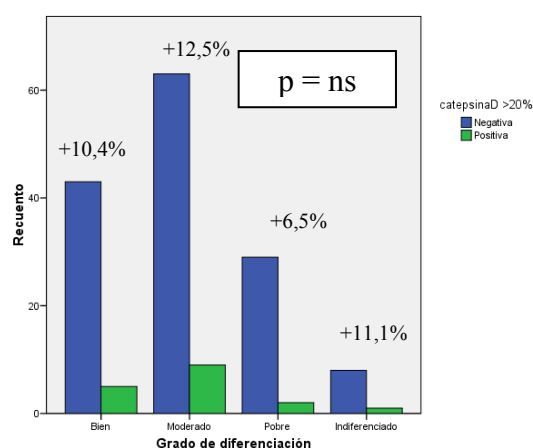
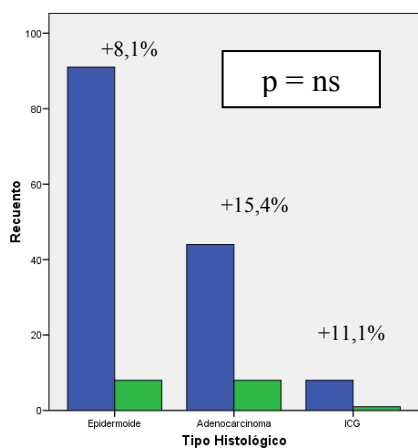
La expresión de catepsina D con inmunorreactividad positiva más del 5 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

2-6.18.c. Criterio 3: catepsina D positiva con inmunorreactividad en > 20 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



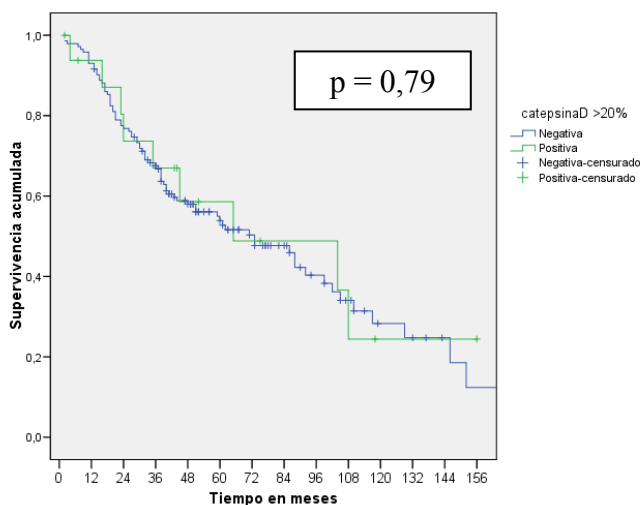
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

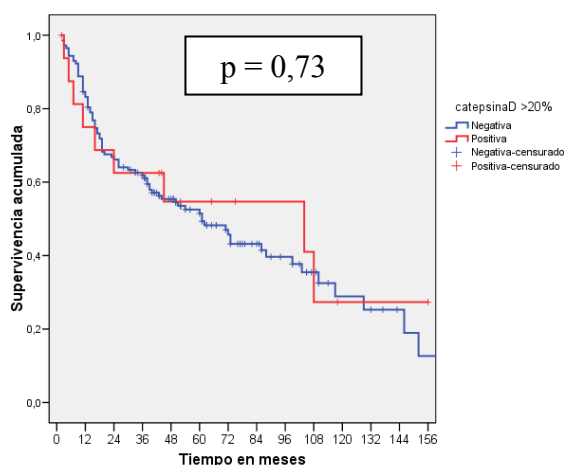
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 0,91. IC 95 % (0,46 – 1,82). p = 0,79

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 0,89. IC 95 % (0,44 – 1,77). p = 0,73

5. Conclusiones:

La expresión de la proteína catepsina D, considerando su expresión positiva con inmunorreactividad en más del 20 % de las células, pasó a distribuirse mucho más homogéneamente con respecto a los distintos tipos histológicos. Tampoco hubo variación en su expresión en función del grado de diferenciación.

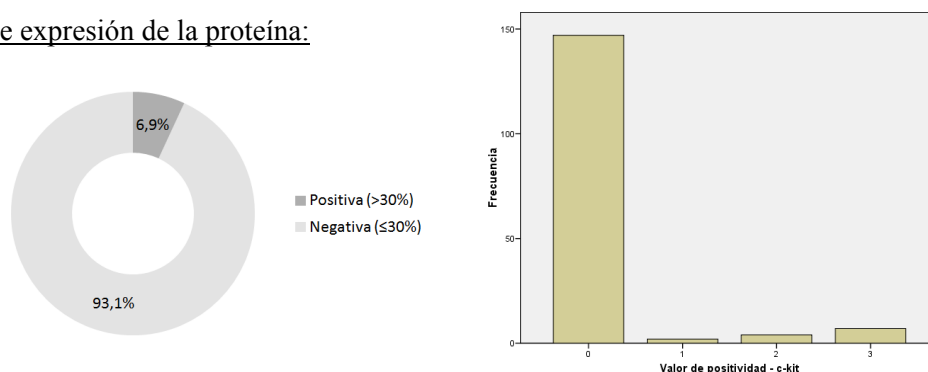
La expresión de catepsina D con inmunorreactividad positiva más del 20 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

* * *

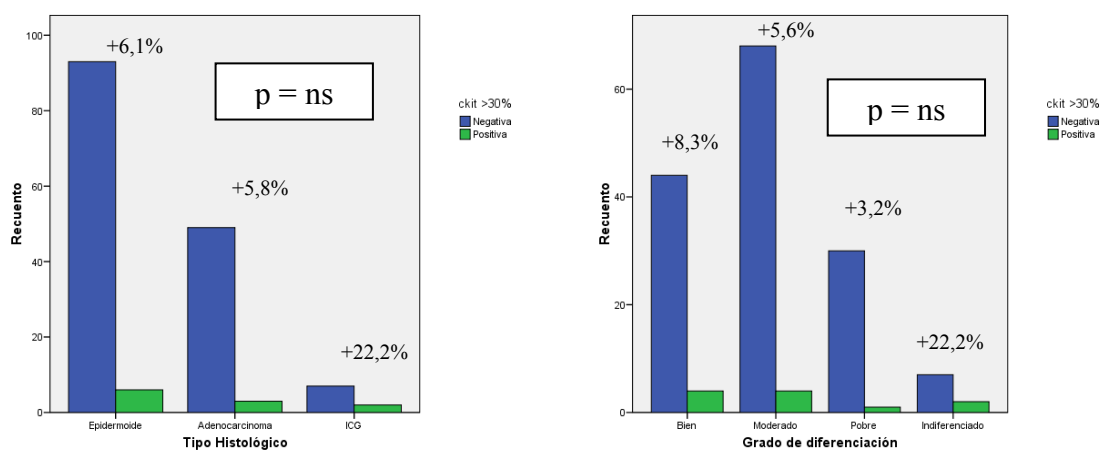
2-6.19. Proteína c-kit

2-6.19.a. Criterio único: c-kit positiva con inmunorreactividad en > 30 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



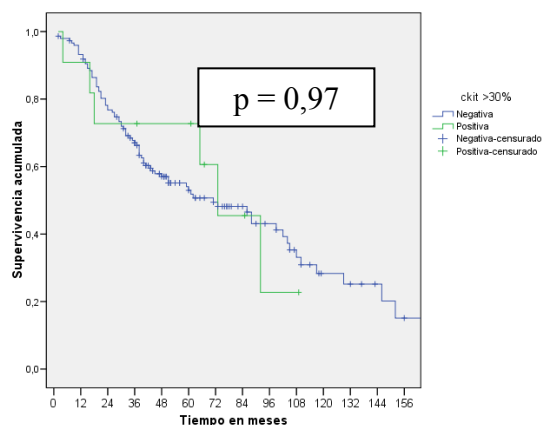
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie

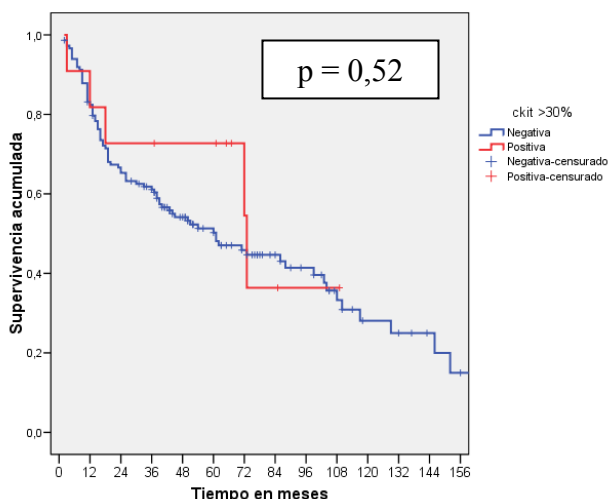


- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 0,98. IC 95 % (0,43 – 2,26). p = 0,97

4. Supervivencia libre de recidiva:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 0,75. IC 95 % (0,3 – 1,85). p = 0,53

5. Conclusiones:

La expresión de la proteína c-kit (considerando más de un 30 % de células inmunorreactivas) se redujo a apenas un 6,9 % de la serie).

La expresión de la proteína c-kit se distribuyó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación.

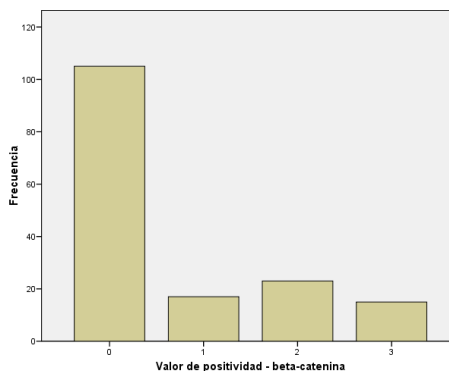
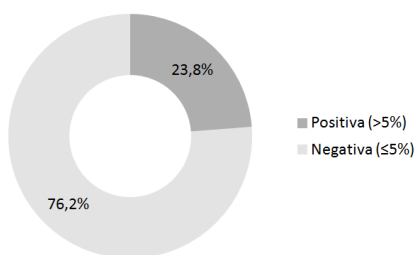
La expresión de c-kit con inmunorreactividad positiva más del 30 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

* * *

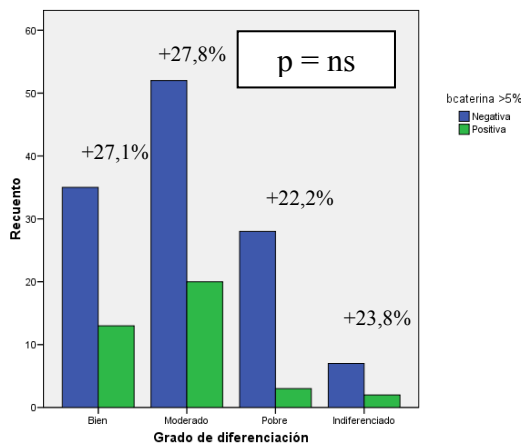
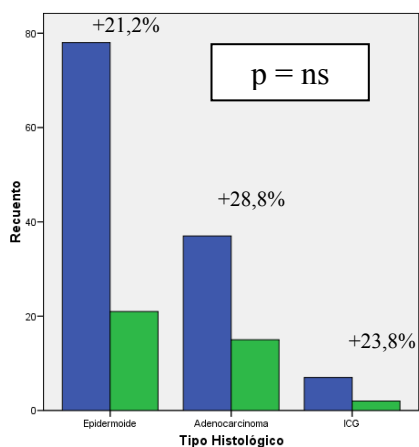
2-6.20. Proteína beta-catenina

2-6.20.a. Criterio único: beta-catenina positiva con inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



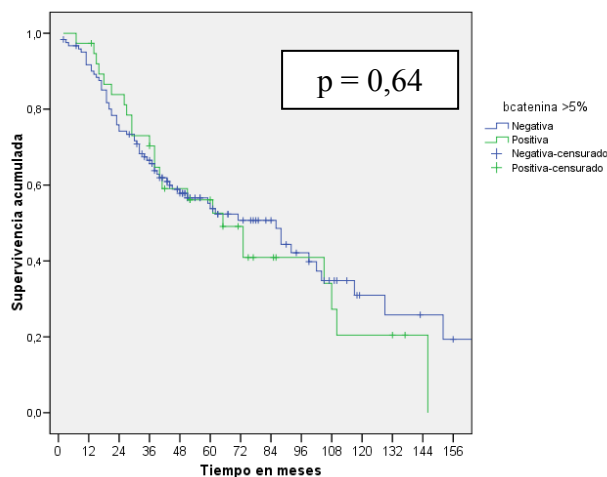
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

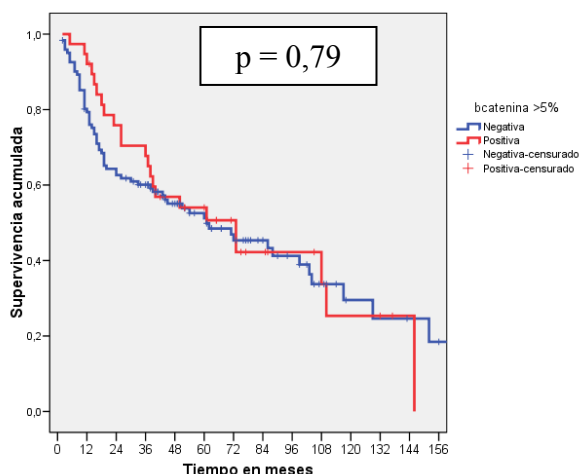
i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 1,12. IC 95 % (0,7 – 1,79). p = 0,65

4. Supervivencia libre de recidiva:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie



- ii. No procede estratificación, ya que no hay diferencias en la expresión ni por tipo histológico ni por grado de diferenciación.
- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:
HR = 0,94. IC 95 % (0,58 – 1,51). p = 0,79

5. Conclusiones:

La expresión de la proteína beta-catenina, considerando más de un 5 % de células inmunorreactivas, se distribuyó de forma homogénea entre los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación.

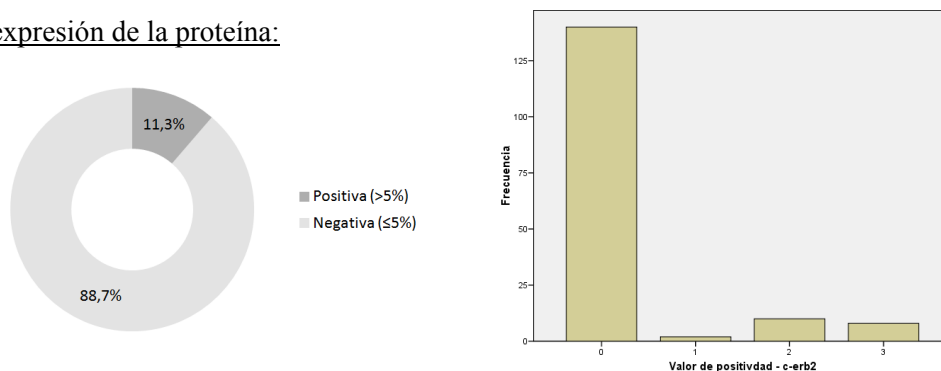
La expresión de beta-catenina con inmunoreactividad positiva más del 5 % de las células no resultó ser un factor pronóstico de supervivencia global ni libre de enfermedad en nuestra serie.

* * *

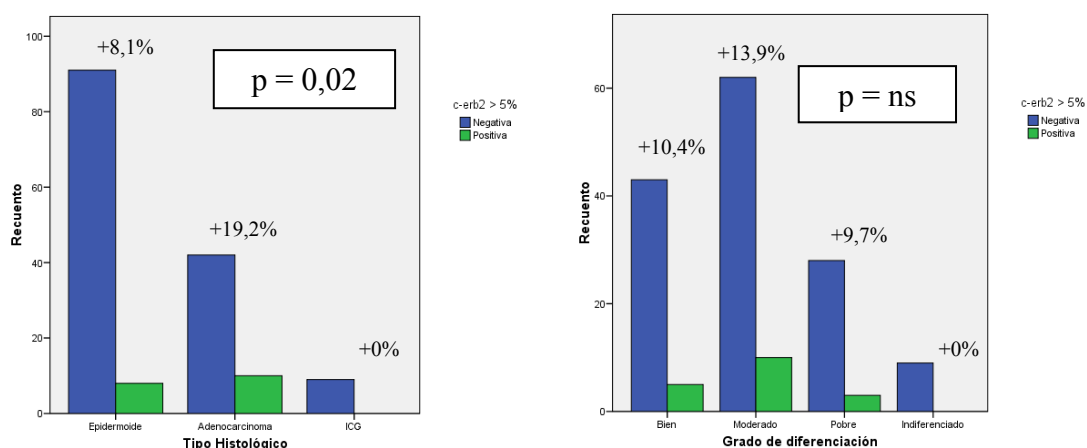
2-6.21. Proteína c-erb2

2-6.21.a. Criterio único: c-erb2 positiva para inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



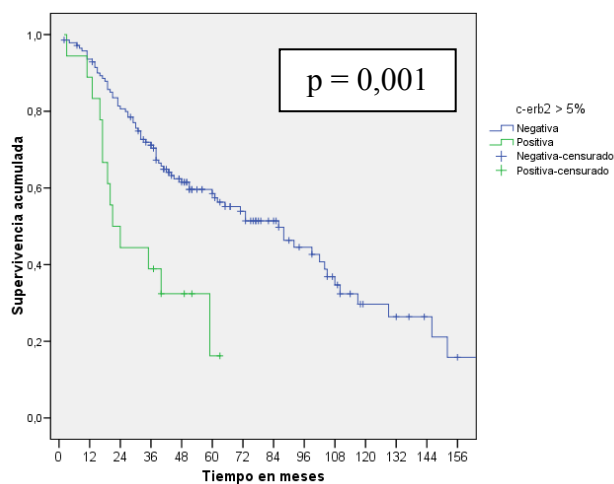
2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

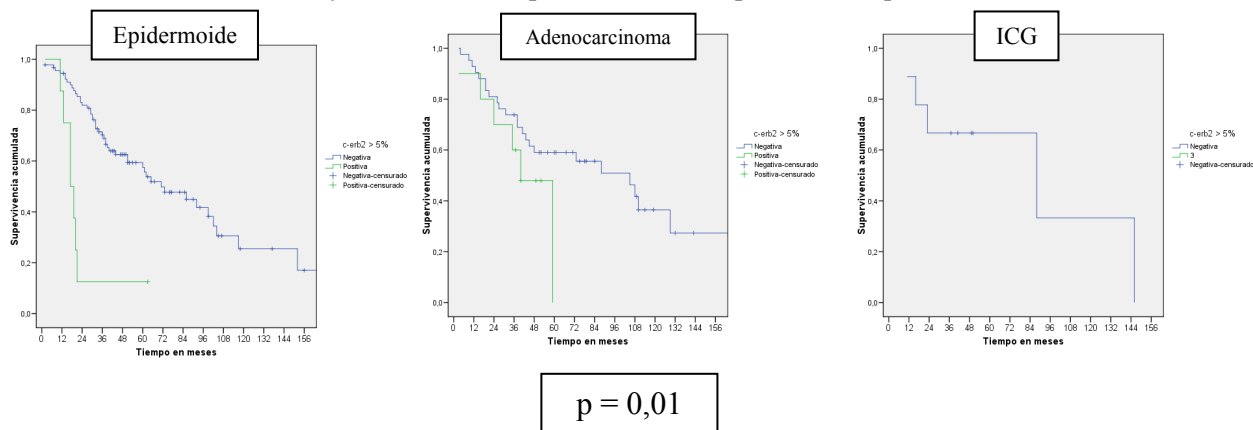
i. Del global de la serie



EXPRESIÓN	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana	IC 95 %
Negativa	93,6 %	71,2 %	58,5 %	86 meses	62 – 110 meses
Positiva	88,9 %	38,9 %	16,2 %	21 meses	13 – 29 meses

SV: Probabilidad estimada de supervivencia

ii. Supervivencia por tipo histológico: se mantuvieron las diferencias significativas, siendo mayor la influencia pronóstica en el epidermoide que en el adenocarcinomas.



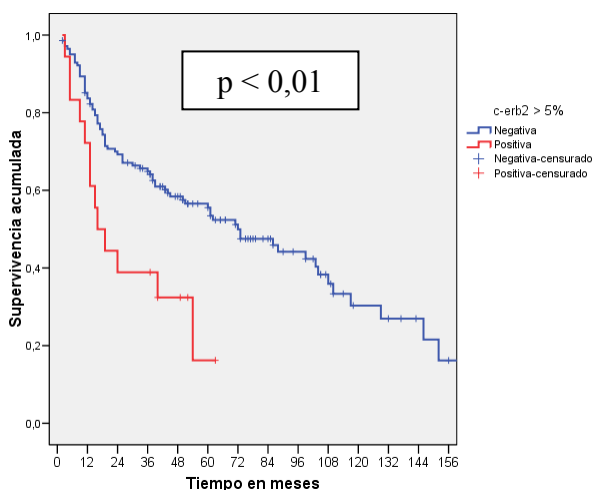
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox (ajustado por tipo histológico):

$$HR = 2,69. IC\ 95\ \% (1,46 - 4,94). p = 0,01$$

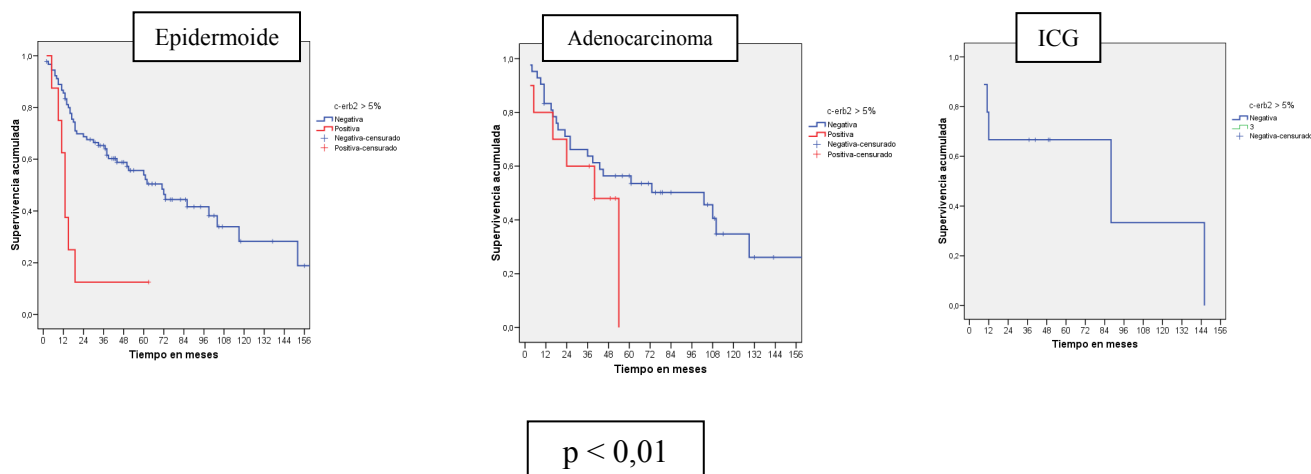
4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



- ii. Supervivencia libre de recidiva por tipo histológico: se mantuvieron las diferencias significativas, siendo mayor la influencia pronóstica en el epidermoide que en el adenocarcinomas.



- b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox ajustado por tipo histológico:
 HR = 2,29. IC 95 % (1,25 – 4,17). $p < 0,01$

5. Conclusiones:

La expresión de la proteína c-erb2, considerando más de un 5 % de células inmunorreactivas, fue mayor en el adenocarcinoma que en el resto de tipos histológicos, siendo esta diferencia estadísticamente ($p=0,02$).

No hubo diferencias en la expresión en función del grado de diferenciación.

La expresión de c-erb2 con inmunorreactividad positiva en más del 5 % de las células del tumor, se asoció a un peor pronóstico en cuanto a supervivencia global, con un Hazard Ratio ajustado por tipo histológico de 2,69 (IC95%: 1,46 a 4,94). Existió una tendencia a un mayor efecto en el peor pronóstico en el carcinoma epidermoide, si bien el número de casos positivos (total de 11,3 %) hizo que no hubiera una clara diferenciación por tipo histológico.

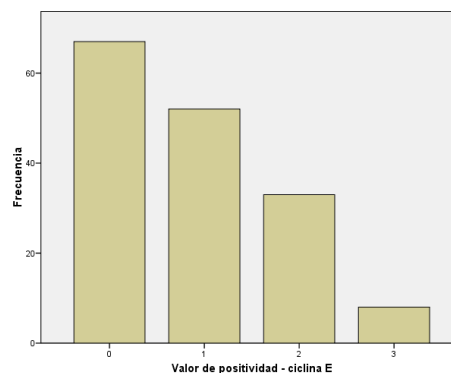
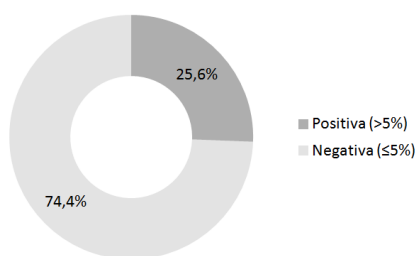
La expresión de c-erb2 con inmunorreactividad positiva en más del 5 % de las células del tumor, se asoció a un peor pronóstico en cuanto a supervivencia libre de enfermedad, con un Hazard Ratio independiente del tipo histológico de 2,29 (IC 95 %: 1,25 – 4,17). $p < 0,01$.

* * *

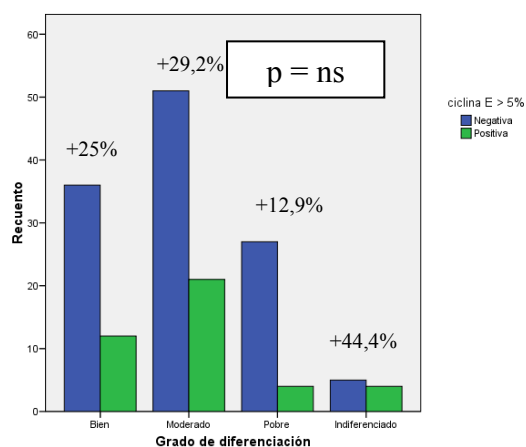
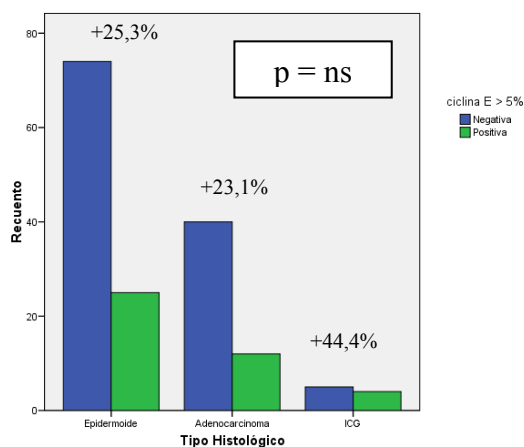
2-6.22. Proteína ciclina-E

2-6.22.a. Criterio único: ciclina-E positiva para inmunorreactividad en > 5 %

1. Tasa de expresión de la proteína:

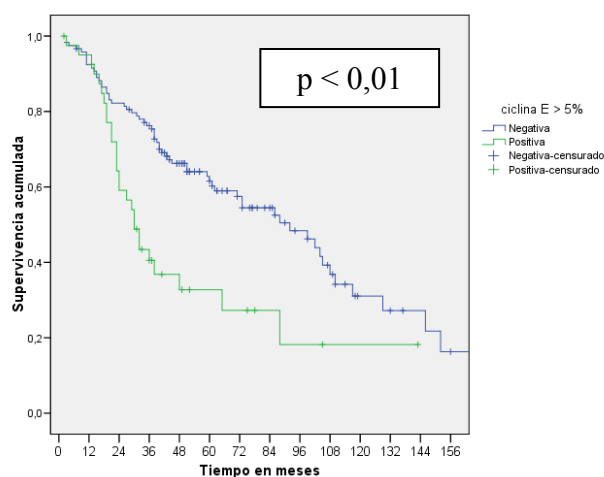


2. Expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

- a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank
 - i. Del global de la serie



EXPRESIÓN	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana	IC 95 %
Negativa	92,4 %	75,4 %	61,5 %	92 meses	67 – 117 meses
Positiva	95 %	40,5 %	32,7 %	43 meses	52 – 94 meses

SV: probabilidad estimada de supervivencia

ii. No procede estratificación

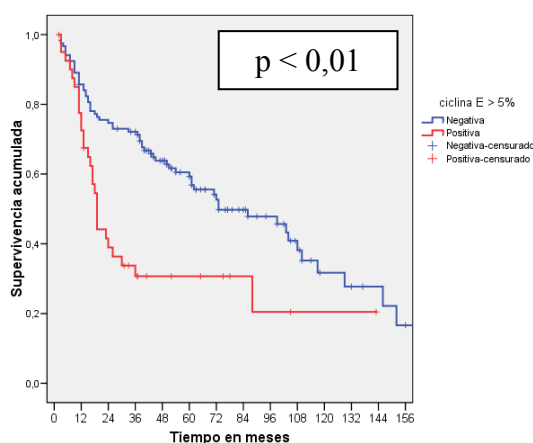
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 2,22. IC 95 % (1,39 – 3,54). p = 0,001

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. No procede estratificación

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

HR = 2,19. IC 95 % (1,39 – 2,46). p < 0,01

5. Conclusiones:

La expresión de la proteína ciclina E, considerando más de un 5 % de células inmunorreactivas, fue homogénea para los distintos tipos histológicos y grados de diferenciación.

La expresión de ciclina E con inmunorreactividad positiva en más del 5 % de las células del tumor, se asoció a un peor pronóstico en cuanto a supervivencia global, con un Hazard Ratio de 2,22 (IC 95 %: 1,39 a 3,54).

La expresión de ciclina E con inmunorreactividad positiva en más del 5 % de las células del tumor, se asoció a un peor pronóstico en cuanto a supervivencia libre de recidiva, con un Hazard Ratio de 2,19 (IC 95 %: 1,39 a 2,46).

6. Expresión de ciclina E en función de otras variables clínicas:

Dados los resultados obtenidos, con un papel significativo de la expresión de esta proteína en la supervivencia, analizamos si su patrón de expresión se relaciona con otras variables clínicas (figuras 61 y 62).

Figura 61: Patrones de expresión de ciclina E en relación a otras variables clínicas. A) Género; b) edad; c) N+ (estadio I o II) y d) clasificación TNM.

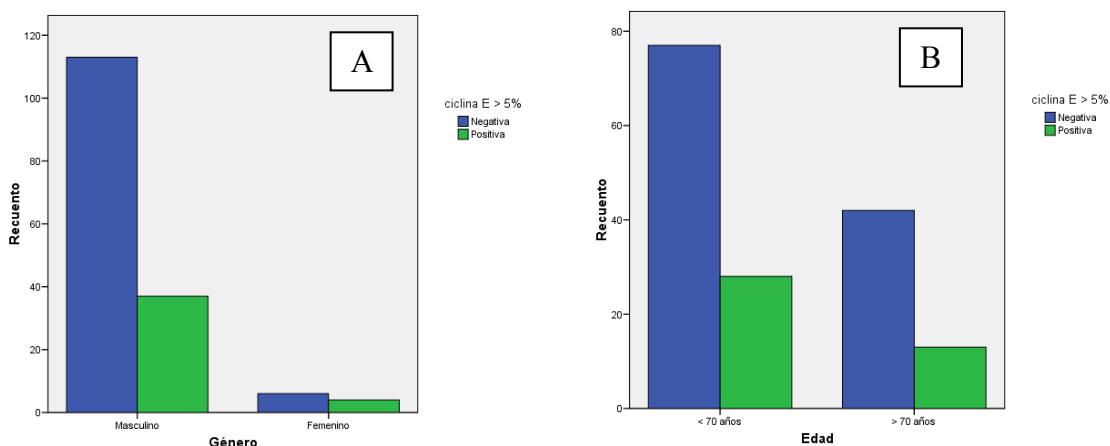
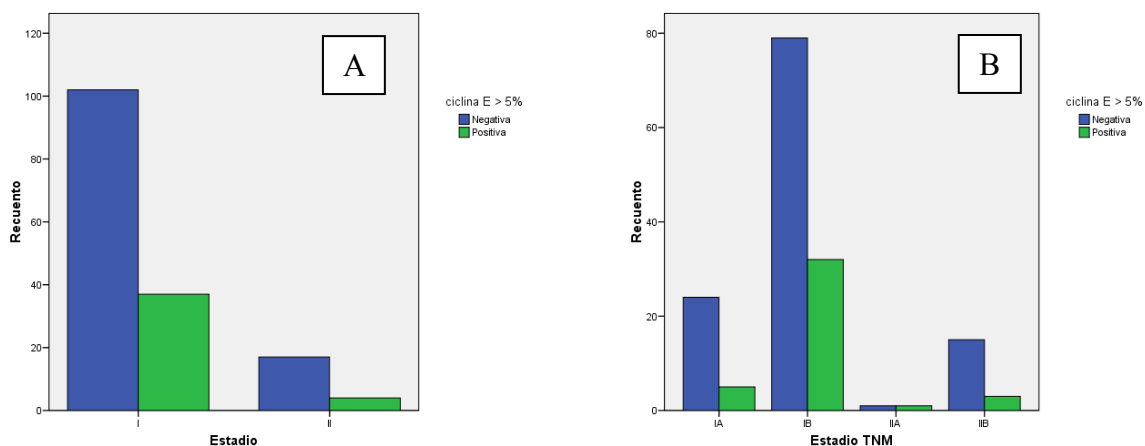


Figura 62: Patrones de expresión de ciclina E en relación a otras variables clínicas. A) N+ (estadio I o II) y b) clasificación TNM.

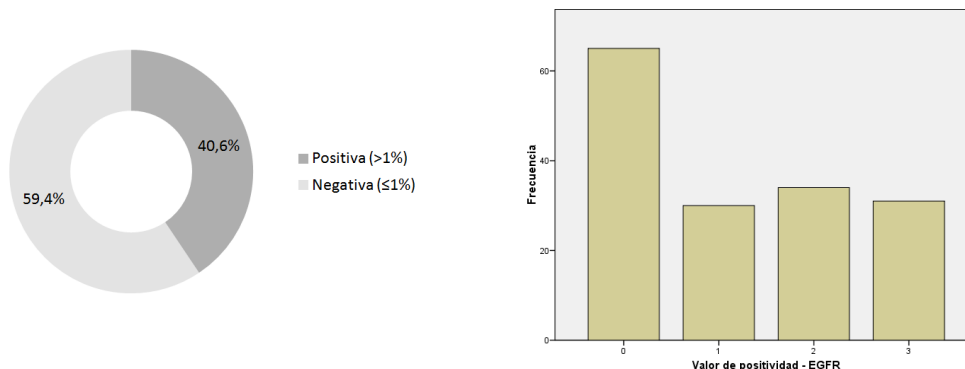


No se encuentran diferencias significativas en el grado de expresión de la ciclina E en función de ninguna de las variables previas.

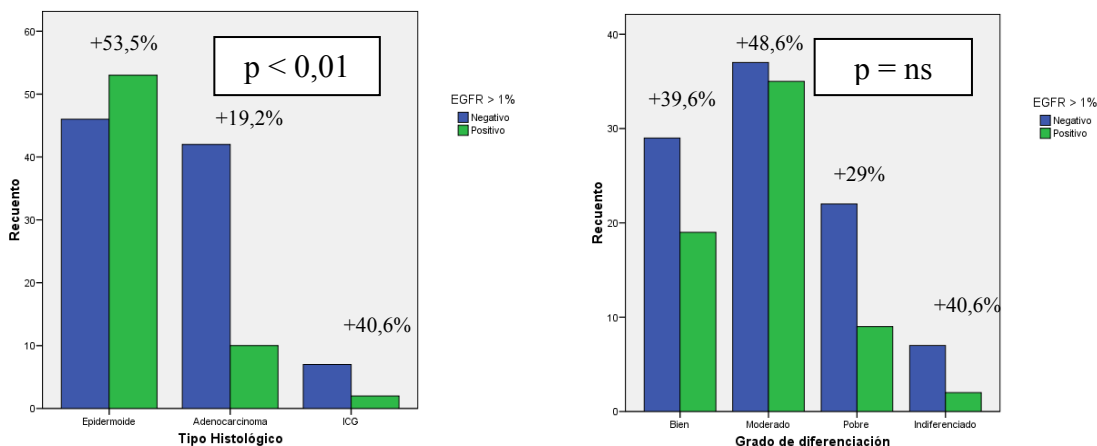
2-6.22. Proteína EGFR

2-6.22.a. Criterio único: EGFR positiva para inmunorreactividad en > 1 %

1. Tasa de expresión de la proteína:



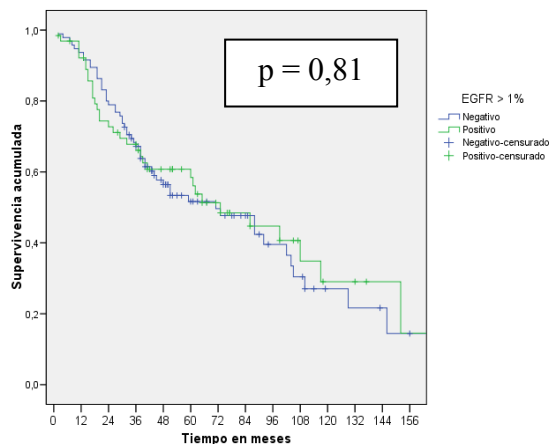
2. Expresión en función del tipo histológico y del grado de diferenciación:



3. Supervivencia global:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

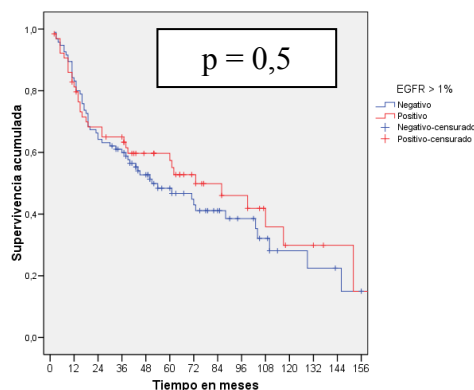
b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,95. IC 95 \% (0,62 - 1,46). p = 0,81$$

4. Supervivencia libre de recidiva:

a. Comparación de curvas de supervivencia estimada mediante test de log-rank

i. Del global de la serie



ii. Supervivencia por tipo histológico: no hubo diferencias significativas.

b. Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox:

$$HR = 0,87. IC 95 \% (0,57 - 1,32). p = 0,5$$

5. Conclusiones:

La expresión del EGFR, considerando más de un 1 % de células inmunorreactivas, fue mayor en los tumores epidermoides que en el resto de subtipos histológicos.

No hubo diferencias en su expresión en función del grado de diferenciación del tumor.

La expresión de EGFR con inmunorreactividad positiva más del 1 % de las células no se asoció a un peor pronóstico ni en cuanto a supervivencia global ni en cuanto a supervivencia libre de enfermedad en nuestra serie.

Tabla resumen del análisis univariante del valor pronóstico de los distintos perfiles de expresión proteica:

Proteína	Positivo (% células)	Tipo histológico	Diferenciación	SV	SLE	Ajuste por tipo histológico
ciclina A	> 5 %	+ Escamoso	NS	NS	NS	NS
p53	> 25 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
cdk1	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
c-myc	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	Indiferenciado	p=0,02	p=0,05	Significativo
cdk2	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 0 %	NS	NS	NS	NS	--
caspasa 3a	> 25 %	NS	NS	NS	NS	--
p16	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
mdm2	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
Topoisom. II	> 10 %	NS	NS	NS	NS	--
msh-2	> 5 %	+ Escamoso	NS	NS	NS	NS
mlh1	> 5 %	+ Escamoso	NS	NS	NS	NS
TS	> 0 %	+ Adenoca	NS	NS	NS	NS
pRb	> 10 %	+ Escamoso	NS	NS	NS	NS
e-cadherina	> 75 %	+ Escamoso	NS	NS	NS	NS
p27	> 0 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	NS	NS	NS	--
catepsina D	> 0 %	+Adenoca	NS	NS	NS	NS
	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
	> 20 %	NS	NS	NS	NS	--
c-kit	> 30 %	NS	NS	NS	NS	--
beta-catenina	> 5 %	NS	NS	NS	NS	--
c-erb2	> 5 %	+ Adenoca	NS	p=0,001 HR 2,69	p<0,01 HR 2,29	Significativo
ciclina E	> 5 %	NS	NS	p<0,01 HR 2,22	p<0,01 HR 2,19	--
EGFR	> 1 %	+ Escamoso	NS	NS	NS	NS

SV: Supervivencia global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

NS: No diferencias significativas

Adenoca: Adenocarcinoma

2-7. ESTUDIO MULTIVARIANTE:

DESARROLLO DE UN MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA CON FINALIDAD PREDICTIVA

Se ha procedido a desarrollar un análisis multivariante con todas las variables clínico-patológicas junto con las variables biomoleculares que han resultado funcionar como factores pronósticos en el estudio univariante, con el fin de valorar si es posible desarrollar un modelo predictivo que pudiera eventualmente ser aplicado en la clínica.

Las variables incluidas han sido las siguientes:

- Género
- Edad
- Tipo histológico
- Grado de diferenciación
- Estadificación del tumor
- Clasificación TNM
- Tipo de resección
- Positividad en la expresión de c-myc (> 20 % de las células)
- Positividad en la expresión de c-erb2 (> 5 % de las células)
- Positividad en la expresión de ciclina-E (> 5 % de las células)

2-7.1. Estudio multivariante para análisis de supervivencia global

Dentro de variables clínicas, el género masculino, la edad por encima de 70 años y el grado de diferenciación del tumor, fueron factores pronósticos independientes en supervivencia global.

Entre las proteínas, la expresión de ciclina E, de c-erb2 y de c-myc fueron las variables que se manifestaron como factores pronósticos independientes para supervivencia global en el estudio multivariante (tabla 47).

Tabla 47: Variables que actuaron como factor pronóstico independiente se supervivencia global en el análisis multivariante.

Variable	Hazard Ratio	IC 95 %	Valor de p
Expresión ciclina E > 5 %	2,50	1,55 – 4,05	< 0,01
Expresión c-erb2 > 5 %	3,57	1,89 – 6,77	< 0,01
Expresión c-myc > 20 %	1,97	1,16 – 3,36	0,01
Género masculino	3,54	1,07 – 11,67	0,04
Edad mayor de 70 años	1,60	1,02 – 2,51	0,04
Grado de diferenciación	2,01	1,09 – 3,70	0,03

Estos datos dan lugar a sendos modelos de regresión logística con finalidad predictiva, para supervivencia global y supervivencia libre de recidiva, que nos permiten estimar el riesgo de mortalidad o recidiva en su caso, para un paciente con unos valores de variables determinados.

A modo de ejemplo, podemos comparar las curvas estimadas de supervivencia global para dos pacientes situados en los extremos de la predicción, es decir:

Paciente 1. Valores menos favorables.

Variable	Valor
Género	Masculino
Edad	> 70 años
Grado de diferenciación	Bajo
c-myc	> 20 %
c-erb2	> 5 %
Ciclina E	> 5 %

Paciente 2. Valores más favorables.

Variable	Valor
Género	Femenino
Edad	< 70 años
Grado de diferenciación	Alto o moderado
c-myc	< 20 %
c-erb2	< 5 %
ciclina E	< 5 %

La figura 62 describe las curvas de supervivencia global estimada para ambos modelos de paciente. Por su parte, la tabla 48 muestra la probabilidad de supervivencia estimada a 1, 3 y 5 años desde la cirugía para un supuesto

paciente con la combinación de variables más y menos favorable.

Figura 62: Curvas de supervivencia global estimada en función de modelos de predicción

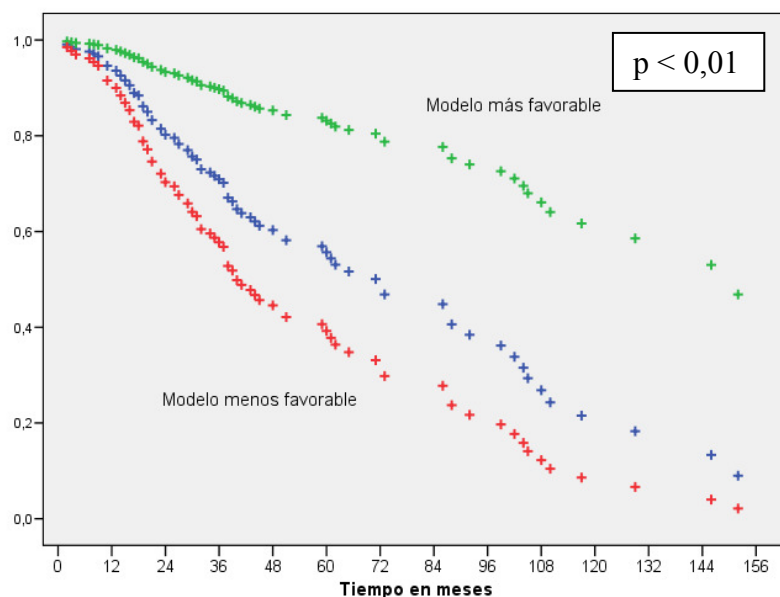


Tabla 48: Probabilidades estimadas de supervivencia global para pacientes con los valores más y menos favorables de las variables incluidos en el modelo pronóstico.

MODELO PREDICTIVO MÁS FAVORABLE			MODELO PREDICTIVO MENOS FAVORABLE		
TIEMPO	Probabilidad de supervivencia estimada	IC 95 %	TIEMPO	Probabilidad de supervivencia estimada	IC 95 %
1 año	98,3 %	99,3 % - 100 %	1 años	91,5 %	90,5 % - 92,6 %
3 años	89,7 %	86,8 % - 92,7 %	3 años	57,7 %	54,8 % - 60,7 %
5 años	83,1 %	79 % - 87,3 %	5 años	39,2 %	35,1 % - 43,4 %

2-7.2. Estudio multivariante para análisis de supervivencia libre de recidiva

La edad mayor de 70 años, el grado de diferenciación del tumor y la expresión positiva de ciclina E (> 5 %), c-erb2 (> 5 %) y c-myc (> 20 %) se manifestaron como factor pronósticos independientes de supervivencia libre de recidiva (tabla R5).

Tabla R5: Variables que actuaron como factor pronóstico independiente de supervivencia libre de recidiva en el análisis multivariante.

Variable	Hazard Ratio	IC 95 %	Valor de p
Expresión ciclina E > 5 %	2,18	1,37 – 3,47	< 0,01
Expresión c-erb2 > 5 %	2,48	1,34 – 4,59	< 0,01
Expresión c-myc > 20 %	1,76	1,04 – 2,99	0,04
Edad mayor de 70 años	1,60	1,02 – 2,51	0,04
Pobre o nula diferenciación	1,83	1,02 – 3,28	0,04

Del mismo modo podemos desarrollar un modelo asociando los factores más y menos favorables, como hemos hecho para la supervivencia global.

Paciente 1. Valores menos favorables.

Variable	Valor
Edad	Mayor de 70 años
Grado de diferenciación	Bajo
c-myc	> 20 %
c-erb2	> 5 %
Ciclina E	> 5 %

Paciente 2. Valores más favorables.

Variable	Valor
Edad	Hasta 70 años
Grado de diferenciación	Alto
c-myc	< 20 %
c-erb2	< 5 %
Ciclina E	< 5 %

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1-1. El carcinoma broncogénico como reto oncológico en el siglo XXI

Ya es el más frecuente en el mundo (261), responsable de casi el 20 % de las muertes por cáncer (casi un millón y medio de personas cada año). Incluso va camino de adelantar en incidencia (en mortalidad ya hace décadas que está por delante) al cáncer de mama. Su impacto social y económico está fuera de toda duda (262, 263). En los últimos tiempos, la ciencia ha dedicado importantes recursos para tratar de disminuir su incidencia y su mortalidad. Lo primero se está empezando a conseguir, aunque solo parcialmente. La actuación sobre el tabaco, factor etiopatogénico más importante del cáncer de pulmón, empieza a dar sus frutos. Sin embargo, el nuevo reto es el incremento de este tumor entre mujeres (264). En términos de prevención, en Europa todavía queda mucho por hacer. Respecto a su mortalidad, en España nos movemos en la media del continente (con datos más o menos extrapolables a nivel mundial), con tasas de supervivencia globales a cinco años de poco más del 12 %, y al año (ajustadas por edad) de en torno al 30 % (265), parámetros éstos que poco se han modificado en las últimas décadas.

Esta perspectiva, a priori tan desmotivadora, presenta dos enfoques positivos:

En primer lugar, la alta incidencia y prevalencia de una enfermedad hace que pequeños avances conlleven una relevancia en términos globales muy alta. Así, la detección de una característica de buen pronóstico que aparezca en tan solo el 5 % de los tumores y sea susceptible de un tratamiento efectivo, supone que el número absoluto de personas que se va a beneficiar es muy grande y por tanto justifique con creces su aplicación.

Por otra parte, estos datos tan negativos están sesgados, pues enfocan la enfermedad de manera global, y no tienen en cuenta la variabilidad clínica y patológica (también epidemiológica) que representa el carcinoma broncogénico.

Si algo hemos aprendido en las últimas dos décadas es que el cáncer de pulmón (como muchos otros tumores) presenta una enorme heterogeneidad. Hablar en términos globales es un error que nos oculta los verdaderos avances que hemos obtenido. Con el tiempo hemos ido desgranando o diseccionando (utilizando así términos quirúrgicos) esta enfermedad.

Primero vimos que el carcinoma broncogénico no microcítico (CBNM) no tenía nada que ver con el carcinoma broncogénico microcítico (CBM). Dentro del primero, vimos que se comportaban de distinta manera el adenocarcinoma que el epidermoide. Supimos que la invasión ganglionar empeoraba el pronóstico, pero también que no es

lo mismo la invasión de un ganglio que de más de uno, de una estación ganglionar que de varias..., como tampoco era igual que el tumor invadiera la cápsula del ganglio o que no lo hiciera. Y la clasificación que hoy por hoy sigue siendo la única validada de forma amplia y que en la clínica es la que orienta la mayoría de nuestras decisiones (TNM) vemos que pronto va a ir quedando atrás, al menos en su concepto clásico.

El punto de inflexión fue ir confirmando lo que como concepto básico en oncología ya sabíamos: que cada tumor en cada paciente tiene unas características biomoleculares que determinan su comportamiento, de modo que ya no solo cada paciente tiene un tumor distinto, sino que en cada momento de la evolución del tumor en su organismo sus características van a ir cambiando. Más aún, un mismo tumor en un momento concreto presenta zonas muy diferentes entre sí, tanto desde el punto de vista morfológico como ultraestructural.

Esta realidad ha cambiado la perspectiva tanto del clínico como del investigador. El reto hoy es desentrañar al máximo las señas de identidad de cada tumor en cada momento, y atacarlo de forma individualizada, con las herramientas de que vamos disponiendo.

Este cambio en la perspectiva del abordaje diagnóstico y terapéutico del cáncer, y de forma especialmente importante en el CBNM, tiene una gran repercusión en el enfoque quirúrgico de esta enfermedad. Un enfoque que todavía muchos cirujanos se resisten a aprehender. Más allá de las grandes aportaciones técnicas que el cirujano oncológico debe ofrecer a estos pacientes, cada vez más está obligado a participar en la toma de decisiones de manejo multidisciplinar en cada caso, y no puede mantenerse ajeno a los aspectos patológicos y biomoleculares que son seña de identidad del tumor que está tratando y que van a condicionar la evolución del paciente de forma tan importante como la destreza técnica que como cirujano despliegue en quirófano.

Esta perspectiva es el punto de partida a la hora de explicar al lector por qué un cirujano desarrolla un proyecto de investigación de las características de este trabajo.

Dentro de los distintos niveles en los cuales podemos establecer clasificaciones biológicas de un tumor, el más aplicable en la clínica, por cuanto es una técnica muy extendida y relativamente sencilla y económica, es el de caracterizar su perfil de expresión proteica. La determinación de alteraciones a nivel de DNA o RNA requiere una tecnología más compleja y costosa. Bien es verdad que la gran relevancia clínica que en el CBNM han demostrado determinadas alteraciones genéticas como las mutaciones del gen del EGFR o la presencia del gen de fusión ALK, con el desarrollo de terapias dirigidas, ha hecho que de forma casi rutinaria se trate de identificar la presencia de dichas alteraciones. Sin embargo, el uso de estas técnicas para identificación de variaciones genéticas cuya trascendencia clínica no sea tan clara, queda hoy limitado al ámbito de la investigación. Por el contrario, la inmunohistoquímica (IHQ) como herramienta de determinación y cuantificación de expresión proteica está generalizada; a menudo sobredimensionada, pues con frecuencia se usa para ratificar lo que desde el punto de vista morfológico un patólogo experto es capaz de determinar. En investigación, el desarrollo de la tecnología de tissue-arrays o matrices de tejido, que ya hemos explicado, permite análisis de un importante número de muestras tumorales en una sola lectura, lo cual facilita la obtención de mucha información sin incrementar demasiado el coste.

Todos estos aspectos fueron los que nos llevaron a trabajar con perfiles de expresión proteica.

1-2. Selección de la serie

La selección de proteínas a estudiar se hizo en base a criterios tanto teóricos como de índole práctica. Buscamos:

- Aquéllas que hubieran presentado en estudios previos perfiles de expresión diferentes en tumores de la misma estirpe, bien en cáncer de pulmón, bien en otro tipo de neoplasias.

- Proteínas que resultaran representativas de pathways o rutas biomoleculares de conocida implicación en la oncogénesis.

- Proteínas que en estudios previos sugiriesen que podían tener algún papel pronóstico, pero que no estuviera definido con claridad el subgrupo de pacientes en quienes su cuantificación podría tener una relevancia clínica y por tanto traslacional.

- Proteínas para cuya identificación y cuantificación por IHQ se disponía en nuestro centro de la metodología necesaria, fundamentalmente los anticuerpos apropiados, bien porque se estaban utilizando para estudios de expresión en otros tumores, bien porque su adquisición era viable desde el punto de vista estratégico y económico.

El papel de los patólogos especializados en oncología torácica fue fundamental a la hora de realizar esta elección.

Una vez seleccionadas las proteínas cuya expresión se quería analizar, resultó fundamental determinar en qué grupo de pacientes y tumores se quería realizar el estudio. La selección de la muestra, conforme a lo que hemos dicho previamente, es fundamental, ya que hay que buscar la mayor homogeneidad posible para evitar sesgos de selección y de confusión.

En el servicio de Cirugía General II – Cirugía Torácica del Hospital Clínico San Carlos se había venido trabajando en estudios de identificación de factores pronósticos biomoleculares en cáncer desde hacía muchos años, con todo tipo de pacientes, tumores y estadios. Línea de trabajo que sigue muy activa en la actualidad.

Parecía lógico en la selección de la muestra, como cirujanos, elegir una población de pacientes quirúrgicos. Y los pacientes quirúrgicos por excelencia en el tratamiento del CBNM son aquellos con tumores en estadios precoces. Tratamos entonces de aprovechar las ventajas que nos brindaba nuestro servicio quirúrgico, a saber:

- Larga tradición en cirugía oncológica por parte de los cirujanos torácicos.
- Homogeneidad entre los mismos a la hora de realizar la técnica quirúrgica.
- Formación y experiencia en el tratamiento y manejo de las muestras de cara a preservar su viabilidad a la

Proteínas analizadas	
ciclina A	c-kit
cdk1	Caspasa 3a
cdk2	catepsina D
ciclina E	msh2
p16	mlh1
p53	e-cadherina
p27	beta-catenina
proteína del gen del retinoblastoma	C-myc
mdm2	topoisomerasa II
EGFR	timidilato sintasa
c-erb2	

Tabla 49: Proteínas analizadas

hora de realizar estudios biomoleculares a partir de ellas.

- Disponibilidad de muestras tumorales en parafina en el biobanco del centro de cara a poder seleccionar pacientes retrospectivamente.

- Funcionamiento de un programa de seguimiento llevado a cabo de forma prospectiva por los propios cirujanos que garantizaba la vigilancia protocolizada de la evolución de los pacientes. Este seguimiento estaba por encima del 95 % y en la mayoría de los casos se prolongaba hasta los diez años (266), hecho este poco frecuente en la mayoría de servicios quirúrgicos. Este protocolo incluía revisiones cada tres meses los dos primeros años, para después continuar con TC semestrales hasta los cinco años y desde ese momento con periodicidad anual al menos hasta los diez o, en su caso, hasta el fallecimiento o pérdida del paciente.

La cirugía continúa siendo la única herramienta potencialmente curativa en el CBNM. Su papel principal queda reservado a los estadios precoces (I y II). Sin embargo cada vez va ampliando sus límites y en la actualidad juega un papel importante (aunque todavía controvertido en muchos aspectos y con fronteras difusas) en los estadios avanzados, bien localmente (estadios T4) (267), regionalmente (afectación ganglionar mediastínica N2) (268) e incluso a distancia (cirugía de las metástasis del carcinoma broncogénico) (269).

Pero nuestro objetivo era centrarnos en pacientes con CBNM en estadios precoces en quienes se realizaba una resección completa, conforme a los criterios que hemos definido en la sección de material y métodos (tabla 16). Aun entre estos pacientes, el riesgo de recidiva asciende al 10 – 15 % anualmente (150). ¿Por qué tumores de las mismas características clínicas y patológicas (mismo estadio, misma cirugía, mismo tipo histológico) recidivan en unos pacientes y no en otros? Aún a día de hoy, cuando se analizan los factores que pueden estar implicados en las recidivas de estadios precoces tratados con intención curativa, la mayoría de las revisiones se centran en factores clásicos (152, 154), como son:

Factores quirúrgicos: El tipo de resección (lobectomía, segmentectomía, resección atípica), el estadio, la afectación ganglionar, el borde de resección, el tipo de linfadenectomía, etc.

Factores patológicos: La invasión linfovascular, el tipo histológico, el número de estaciones ganglionares afectadas.

Factores del paciente: La diabetes mellitus, el índice de masa corporal, el tabaco, el género, etc.

Y sin embargo son factores muy vagos que hoy por hoy no tienen el peso suficiente como para basar en ellos nuestros programas de seguimiento. Incluso muchos autores dejan en el aire la siguiente pregunta: ¿Existe un subgrupo de pacientes cuyo mayor riesgo de recidiva justifique hoy por hoy un seguimiento más intensivo? Según hemos visto al hablar de lo que distintas guías clínicas internacionales establecen como recomendado para este seguimiento, en general se realiza de igual manera para todos los pacientes.

Nos parecía pues fundamental intentar investigar las características biomoleculares de tumores completamente reseados en estadios precoces en pacientes que por lo demás constituían una muestra homogénea en cuanto a factores pronósticos clásicos.

Esta premisa nos llevó a definir los criterios de inclusión y exclusión que vemos en la tabla 50.

Tabla 50: Criterios de inclusión y exclusión en el estudio

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
CBNM estadios I y II	Tumores T3
Resección completa (R0)	Antecedente oncológico de cualquier tipo
Disección ganglionar sistemática del mediastino	Mortalidad postoperatoria
Muestra de tumor suficiente y apropiada	Fístulas de muñón bronquial en neumonectomía
	Tipo histológico diferente a escamoso, adenocarcinoma o indiferenciado de células grandes

Estos criterios merecen ciertas consideraciones, que brevemente pasamos a desarrollar:

Estadios I y II. Fuimos bastante estrictos en la selección de la muestra. Incluimos solo pacientes en estadios precoces IA, IB, IIA y IIB. Descartamos los tumores T3, que parecen tener otras peculiaridades que pueden influir en su pronóstico (270). En muchos de ellos se utilizan tratamientos adyuvantes, fundamentalmente de radioterapia (afectación de pared torácica) con o sin quimioterapia asociada (tumores del inlet torácico que provocan un síndrome de Pancoast-Tobías). Por eso se decidió no incluirlos en el estudio. Se descartaron también aquellos pacientes con algún tipo de antecedente oncológico, cuyo tratamiento y pronóstico podían condicionar su evolución.

Resección completa. En todos los pacientes se había hecho una resección R0. Este concepto ha sido durante mucho tiempo controvertido. Es en 2005 cuando el “Comité de Resección Completa” que se crea en 2001 en el seno de la *International Association for The Study of Lung Cancer (IASLC)*, establece los requisitos que un procedimiento quirúrgico debe cumplir para hablar de resección completa (88) y que son los que utilizamos en nuestro estudio (tabla 51A).

Disección ganglionar mediastínica. Se excluyeron también los casos en que no se había hecho una disección completa sistemática del mediastino. Una vez más, estamos ante un concepto que incluso entre cirujanos a veces se utiliza de forma ambigua. Lo que para un cirujano es una disección sistemática del mediastino, para otro puede constituir un muestreo o incluso una biopsia. La terminología ya la hemos expuesto en la introducción. Como cirujanos, hemos valorado siempre el papel de la linfadenectomía mediastínica en la correcta estadificación quirúrgica de los pacientes con cáncer de pulmón (271), existiendo homogeneidad por parte de los cirujanos que han intervenido a todos los pacientes de la serie a la hora de definir el tipo de disección mediastínica realizada.

Se comprobó que en todos los casos se cumplía con los criterios de consenso sobre linfadenectomía establecidos por la SEPAR (224) y por la ESTS (67), que ya hemos descrito previamente (tabla 51B). Estas dos condiciones dotan a la muestra de una homogeneidad en términos quirúrgicos que creemos fundamental para este tipo de estudios.

Tabla 51:

A. Requisitos mínimos para definir una resección como completa. Rami-Porta et al. (88)

Confirmación microscópica de márgenes libres de tumor
Dissección ganglionar sistemática del mediastino
No invasión extracapsular de las adenopatías con infiltración tumoral
Confirmación de que la adenopatía reseccionada más distal no presenta infiltración tumoral

Extirpación de todos los ganglios en todas las estaciones ganglionares del pulmón y del mediastino del lado operado, a ser posible en bloque con la grasa circundante, de tal forma que no quede constancia visual ni palpatoria de ganglios en ese hemitórax.
El espécimen de linfadenectomía hiliomediastínica contendrá al menos seis adenopatías
Es obligatorio el estudio anatomopatológico de todas las estaciones N1 (lobares, interlobares e hiliares) sea cual sea la localización del tumor
Dependiendo de la localización tumoral se deberán incluir necesariamente: Tumores derechos: regiones 2R, 4R y 7. Tumor en LSI: regiones 3, 5 y 7 Tumor en LII: regiones 7, 8 y 9
Se estudiará histológicamente todo el ganglio. Varios fragmentos de una misma región se considerarán como único ganglio salvo que el cirujano especifique lo contrario. Se debe especificar si hay afectación extracapsular, y en los ganglios hiliares indicar si la infiltración es directa por el tumor

B. Criterios de consenso para la estadificación ganglionar mediastínica intraoperatoria.

En todos los casos se disponía de muestra parafinada de tumor en cantidad suficiente para la realización de la matriz de tejido y la correcta lectura de la misma. Se descartaron los casos en que no era así.

Exclusión de la mortalidad postoperatoria. Se excluyeron también los pacientes que habían fallecido en el postoperatorio en relación a la intervención quirúrgica. Se consideraron como tales los decesos acaecidos en los primeros treinta días de la intervención quirúrgica.

Exclusión de pacientes con fistula del muñón bronquial tras neumonectomía. Se excluyeron los casos de fistulas de muñón bronquial en el postoperatorio (fueran precoces o tardías) que hubiesen requerido un tratamiento quirúrgico agresivo. Esto se reduce al fin y al cabo a fistulas de neumonectomías que fueran tratadas con una plastia y una toracostomía abierta. Es un criterio de exclusión discutible, y está fundamentado en dos aspectos:

- La alta mortalidad que teóricamente conlleva una fistula de muñón bronquial en neumonectomía, que asciende según las series hasta el 50 % (272).
- Las peculiaridades de los pacientes que conviven con una toracostomía abierta y que obliga a un tratamiento local intensivo durante años, lo cual podría condicionar tanto el seguimiento en sí como los propios hallazgos en las pruebas de imagen, pudiendo sesgar la información meramente relativa a su enfermedad oncológica, que en estos pacientes pasa, de algún modo, a un segundo plano.

De nuevo se trata de un criterio arbitrario, pero que en ningún caso creemos que reste homogeneidad a la serie, sino en todo caso, al contrario, aun a riesgo de ver disminuido el tamaño muestral.

Exclusión de tumores con subtipos histológicos poco frecuentes. Como hemos visto en la introducción, existe una miscelánea de subtipos histológicos de CBNM que parece que podrían tener un comportamiento diferente a los más habituales, y que por su menor frecuencia no pueden ser comparados adecuadamente con el adenocarcinoma, el escamoso o el indiferenciado de células grandes. Por ejemplo, el carcinoma adenoescamoso, ha demostrado en una revisión reciente, un comportamiento más agresivo que empeora el pronóstico en términos de supervivencia (273). En este estudio no hemos incluido otros subtipos histológicos diferentes a los tres más habituales. De hecho, la variabilidad que poco a poco van demostrando los tumores, incluso dentro de un mismo tipo histológico, hace muy probable que todos los estudios de este tipo presenten sesgos de asociación difíciles de controlar. En condiciones ideales, este tipo de estudios debería realizarse de forma diferenciada para adenocarcinomas y escamosos, si bien el tamaño muestral disminuiría, lo cual redundaría en una menor validez del estudio. Nosotros, en la línea con la mayoría de estudios de este tipo, incluimos los tres tipos histológicos más frecuentes del CBNM, incluyendo en el análisis estadístico esta variable como posible factor de confusión para mantener el tamaño muestral adecuado sin sesgar los resultados que hemos obtenido. Así, los análisis de supervivencia se hicieron en todos los casos ajustando la variable “tipo histológico”.

Con estas premisas la serie resultante estaba compuesta por 160 pacientes intervenidos con intención curativa por CBNM en estadios I y II.

2. DESCRIPCIÓN DE LA SERIE

2-1. Datos basales y demográficos

Las características demográficas son las propias de las series quirúrgicas de este tipo de estudios. Un 93,7 % fueron hombres. Este dato es característico de la época en que se seleccionan los pacientes. En los últimos años estamos asistiendo a un cambio epidemiológico en la presentación del carcinoma broncogénico, con una proporción de mujeres cada vez mayor. Además se están identificando diferencias en los tumores en función del género (con un mejor pronóstico en los tumores que se desarrollan en mujeres), por lo que en estudios con un porcentaje más equilibrado entre masculino y femenino es obligatorio diferenciar los hallazgos entre ambos sexos. Un 16,9% eran no fumadores. El resto eran fumadores activos o habían dejado de fumar más de seis semanas antes de la cirugía. La media de edad de 65,8 años (mediana de 67 años) es habitual para este tipo de series. Destaca el rango, que osciló entre 46 y 87 años. Un 34,4 % de pacientes tenían 70 años o más en el momento de la intervención quirúrgica. La gran mayoría llegaron a la cirugía en una buena situación clínica: un 44,4 % totalmente asintomáticos y casi el 95 % con un índice de Karnofsky de 90 o 100. Ahora bien, hasta un 85 % presentaban alguna comorbilidad, sobre todo EPOC, algún antecedente cardiovascular, o hipertrofia benigna prostática. Se ha considerado cualquier antecedente médico como comorbilidad, lo cual ayuda a explicar este porcentaje. En todos los casos sus patologías de base estaban bien tratadas en el momento de la intervención, siendo este un dato relativamente subjetivo.

2-2. Pruebas diagnósticas

Fueron las habituales en el algoritmo de enfoque diagnóstico del carcinoma broncogénico. Un 86,3 % tenían citología de esputo (sensibilidad del 29,7 %) y un 86,2 % broncoscopia. El cepillado bronquial presentó una sensibilidad del 54,6 %, que ascendió al 85,9 % para la biopsia bronquial (aunque ésta se realizó sobre lesiones visibles endoscópicamente o sobre alguna zona sospechosa). La sensibilidad de la PAAF transtorácica con control por TC fue del 88,2 %, lo cual es un valor realmente significativo. Hay que llamar aquí la atención sobre el hecho de que los especialistas en radiodiagnóstico que realizaron todas esas punciones fueron siempre los mismos y estaban especializados en patología del tórax. Una vez más se pone de manifiesto que la creación de equipos de trabajo especializados, homogéneos y estables en el tiempo, influye en la optimización de los resultados.

2-3. Estadificación preoperatoria

Se hizo siguiendo los protocolos habituales. Sí hay que destacar que es una época en que la tomografía por emisión de positrones (PET) no está aún instaurada en el hospital y todavía no se incluye en las vías clínicas de estudio de extensión de un carcinoma broncogénico. Por ello se sigue el esquema clásico de estadificación con TC toracoabdominal. La presencia de adenopatías mediastínicas con un eje corto mayor de 1 cm es considerada como sospechosa y requiere confirmación histológica previa a un abordaje quirúrgico con intención curativa para intentar descartar la afectación ganglionar mediastínica N2. En ese momento esta confirmación se hacía directamente por mediastinoscopia, ya que todavía no estaban implementadas otras técnicas invasivas no quirúrgicas que después se han incluido en los protocolos de estadificación del CBNM (ecoendoscopia, ecobroncoscopia). Llama la atención en este sentido que solo se hicieron cinco mediastinoscopias. La explicación puede ser el alto valor predictivo negativo de la TC, ya que en los casos con adenopatías clínicamente sospechosas, las mediastinoscopias confirmaron ese hecho y los pacientes no se incluyeron en el estudio. Sin embargo, no hemos analizado aquí los datos de los pacientes que no fueron intervenidos, por lo que no podemos establecer rendimientos diagnósticos de las pruebas de imagen ni de la propia mediastinoscopia. Solo se incluyen los N0 clínicos que fueron además N0 ó N1 patológicos, y no así los N2 incidentales, es decir, los casos con afectación ganglionar mediastínica detectada incidentalmente en quirófano o en el estudio patológico.

El análisis de estos aspectos queda no obstante fuera de los objetivos de este estudio, que parte de una serie quirúrgica homogénea con unas características determinadas.

2-4. Valoración funcional respiratoria

Del mismo modo que en lo referente al estudio de extensión, las pruebas funcionales respiratorias se reducían en la mayor parte de los casos a una espirometría con medida de volúmenes y capacidades, con el único dato relevante del VEMS. Todavía no se había desarrollado el algoritmo de valoración funcional respiratoria definido en 2009 por la Sociedad Europea de Cirugía Torácica (ESTS) y la Sociedad Europea de Respiratorio (ERS) y que actualmente se sigue en la mayoría de los centros (74). Los criterios de inoperabilidad hasta la estandarización

llevada a cabo por este algoritmo eran un VEMS predicho postoperatorio por debajo del 30 % o inferior a 800 cc en términos absolutos. Actualmente se es más exhaustivo con la valoración funcional cardiopulmonar, aunque tampoco entraremos en ello. En nuestra serie, la media en porcentaje del VEMS fue del 72,7 %.

2-5. Localización anatómica del tumor

Predominaron los del lado izquierdo, aunque con poca diferencia (53 %). Sí fue mayor la afectación de lóbulos superiores (30,6 % tanto para el lóbulo superior derecho como para el lóbulo superior izquierdo). Este dato coincide con la forma de presentación topográfica habitual del carcinoma broncogénico (274).

2-6. Clasificación histológica y grado de diferenciación

El primer elemento que podría romper la homogeneidad de la serie, como hemos dicho anteriormente, es el tipo histológico de los tumores. La mayoría de los CBNM son adenocarcinomas o escamosos, dejando los más dudosos en el grupo de los indiferenciados de células grandes. Podemos decir que el escamoso y el adenocarcinoma son tumores distintos. De hecho se han descrito diferentes mecanismos patogénicos para ambos:

Adenocarcinoma. Se ha descrito como lesión preneoplásica precursora de este tipo histológico la Hiperplasia Adenomatosa Atípica (HAA). Y es que comparten alteraciones moleculares. Así, hasta en un 39 % de las HAA aparece mutación en el codón 12 de KRAS (275). Pero también es frecuente la sobreexpresión de ciclina D1, p53, survivina y HER2/neu. A nivel epigenético aparecen pérdidas de heterocigosidad en 3p, 9p, 9q y 17q y p. Todos estos cambios son frecuentes en los adenocarcinomas. Algunos modelos de oncogénesis desarrollados en ratones han puesto de manifiesto la evolución desde una HAA (o varios focos de dicha entidad patológica) hasta el desarrollo de un adenocarcinoma de pulmón (276). Esta vía oncogénica se ha descrito predominantemente en fumadores. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito un conjunto de adenocarcinomas de aparición predominantemente en mujeres no fumadoras en los que destaca la presencia de mutaciones en el receptor tirosín-quinasa del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Sin embargo aún no está claro cómo entronca con el mecanismo descrito para fumadores, o si estamos ante un tipo de tumor completamente diferente, como parece demostrar su comportamiento, respuesta a inhibidores de dicho receptor y pronóstico.

Escamoso. Se ha descrito una cascada de alteraciones biomoleculares que van sucediendo desde la célula epitelial normal hasta que se convierte en un carcinoma invasivo. Aquí se han visto alteraciones epigenéticas como pérdidas de heterocigosidad, metilación de genes, desregulación de la telomerasa, etc. También aparecen casos de sobreexpresión de EGFR, así como patrones de alteración en la neovascularización del tumor (angiogénesis) y otras alteraciones.

En nuestra serie el 61,2 % fueron epidermoides, un 32,6 % adenocarcinomas y el 5,7 % restante indiferenciados de células grandes. Esta distribución está cambiando en la actualidad, y hoy son ya más frecuentes los adenocarcinomas. Parece que este hecho está en relación con la disminución del hábito tabáquico. Sin embargo, la distribución de nuestra serie en cuanto a tipo histológico ha sido superponible a grandes series quirúrgicas de tumores en estadios precoces como la del protocolo NATCH, ensayo clínico randomizado en fase III desarrollado

por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) a lo largo de la primera década de 2000, en que los pacientes con tumores en estadios I y II eran randomizados a cirugía, bien sola, bien con quimioterapia neoadyuvante o adyuvante, dando lugar así a tres ramas bien equilibradas. El período de inclusión de pacientes (2000 y 2007), ligeramente posterior al nuestro, así como el número de casos (N = 624), lo convierten en un estudio interesante para tomarlo como referencia. Eso sí, solo en cuanto a parámetros descriptivos, ya que los objetivos de ese estudio en nada se parecen al nuestro (277). La distribución por tipo histológico en dicho ensayo clínico fue un 50,9 % carcinomas escamosos, un 31,8 % adenocarcinomas, un 10,7 % indiferenciados de células grandes y un 6,6 % una miscelánea de otros tipos de tumores. Insistimos aquí también en el razonamiento previo acerca de esa miscelánea de subtipos histológicos menos frecuentes que presenta el CBNM. En algunos casos han demostrado comportamientos biológicos y pronósticos diferentes al resto.

Respecto al grado de diferenciación, en la mayoría era moderado o bueno (75 %). La hipótesis de que la expresión proteica y las alteraciones biomoleculares puedan variar en función de este parámetro no está clara. Sin embargo, para intentar evitar de nuevo sesgos de confusión, hemos analizado en todos los casos si la expresión de las diferentes proteínas variaba en función del tipo histológico y del grado de diferenciación, estratificando los datos en función de estas dos variables. Como hemos visto y después analizaremos, no aparecieron diferencias llamativas en este sentido.

2-6. Tipo de cirugía

En todos los casos la cirugía se realizó con intención curativa, es decir, con criterios oncológicos, como ya hemos definido al hablar de la selección de la muestra. Se realizaron 95 lobectomías (59,4 %), 31 resecciones segmentarias (19,4 %), 6 bilobectomías (3,4 %) y 28 neumonectomías (17,5 %). Esta distribución nos lleva a hacer dos reflexiones:

Proporción de neumonectomías.

Se puede pensar que el porcentaje de neumonectomías es alto (17,4 %), teniendo en cuenta que se trata de tumores en estadios precoces. Sin embargo, es superponible a la mayoría de series de este tipo. E incluso está por debajo de series como la del protocolo NATCH, que presenta un 23,1 % de neumonectomías, o el registro de carcinoma broncogénico de la SEPAR, con un 28,5 % de neumonectomías en estadios I y II (278).

Papel de la resección atípica como posible factor de confusión a la hora de establecer el pronóstico.

Durante más de una década, el único estudio que comparaba la resección segmentaria con la lobectomía en estadios precoces, fue el ensayo clínico randomizado del Lung Cancer Study Group (LCSG) de 1995, que incluía a 247 pacientes con CBNM en estadio T1N0. Si bien la diferencia encontrada en términos de supervivencia global no alcanzó significación estadística, sí encontró una mayor tasa de recidivas en pacientes con resecciones sublobares (91). Un metaanálisis realizado en 2005 por Nakamura concluía que no hay diferencias entre resección sublobar y lobectomía en estadio I (92). En este ensayo nos basamos a la hora de incluir pacientes con resecciones menores en nuestro estudio.

¿Cuál es la evidencia científica en el momento actual a este respecto?

A falta de conocer los resultados de los ensayos clínicos fase III que actualmente están en marcha (CALGB 140503 y el japonés JCOG0802), la mayor parte de la información procede de estudios observacionales. Sí parece importante la distinción entre tumores en estadio IA y IB. Y dentro del IA, los menores de 2 cm (T1a según la última clasificación). Son esos casos los que están incluidos en dichos ensayos clínicos en marcha, y donde a priori parece asumible la resección segmentaria como una alternativa oncológica equiparable a la lobectomía. La evidencia actual considera válida la resección sublobar en pacientes con tumores periféricos de no más de 2 cm de diámetro, que están circunscritos a un segmento anatómico y en quienes la estadificación ganglionar mediastínica preoperatoria no sugiere la presencia de enfermedad ganglionar hilar ni mediastínica (grado de recomendación 1B) (93). Sin embargo, la mayoría de estos estudios analizan la resección segmentaria intencionada, es decir, en pacientes en quienes a priori la lobectomía no está contraindicada por su función pulmonar, su edad u otros condicionantes. También en nuestra serie, para los pacientes en quienes se realizó una resección sublobar, fueron las características clínicas de los mismos las que indicaron ese tipo de cirugía.

3. SUPERVIVENCIA Y FACTORES PRONÓSTICOS

3-1. Supervivencia del global de la serie

Encontramos una supervivencia global estimada (SG) por el método de Kaplan y Meier a uno, tres y cinco años desde el momento de la resección pulmonar de 93,1 %, 67,4 % y 54,4 % respectivamente. Por su parte la supervivencia estimada libre de recidiva (SLR) a uno, tres y cinco años fue 83,7 %, 61,9 % y 51,9 % respectivamente.

Para una serie quirúrgica como esta, los valores están en consonancia con la literatura. También las medianas de 73 meses y 61 meses para SG y SLR respectivamente son superponibles a series similares.

La citada serie del estudio NATCH presenta una supervivencia a 5 años en la rama de cirugía del 44 %, con SLR del 34,1 %, los cuales son valores por debajo de los de otras series (277).

Probablemente la serie más grande y sin duda representativa a la hora de comparar nuestros resultados sea la utilizada por el grupo de trabajo de la IASLC (Lung Cancer Staging Project) desarrollado para la elaboración de la séptima edición de la clasificación TNM de 2009 de la que ya hemos hablado. Toman como referencia una serie de pacientes desde 1990 hasta 2000 (49), que incluye 67.725 casos de CBNM en todos los estadios y tratados de distintas maneras. Los resultados en términos de supervivencia global a cinco años en función del estadio quirúrgico-patológico (utilizando la sexta edición de la clasificación TNM, de 2002) son: IA: 73 %, IB: 54 %, IIA: 48 %, IIB: 38 %. Cuando utilizan la séptima edición de dicha clasificación los valores cambian a: IA: 73 %, IB: 58 %, IIA: 46 %, IIB: 36 %. En nuestra serie hemos utilizado la sexta edición (que no ofrecía cambios con respecto a la quinta, de 1997 en lo referente a las características de nuestra) por el hecho de que los pacientes fueron intervenidos estando vigente dicha clasificación antigua.

La supervivencia global a cinco años en función de la estadificación TNM de nuestra serie fue del 60,9 %, 55,3 %, 50 % y 43,2 % para los estadios IA, IB, IIA y IIB respectivamente, con lo que a excepción de los pacientes IA,

en los cuales es llamativamente menor, en los demás casos son valores prácticamente superponibles a esta gran serie del Lung Cancer Staging Project. Teniendo en cuenta que el 62,5 % de los pacientes de nuestra serie presentaban un tumor en estadio IB, nos parece que es bastante representativa como serie quirúrgica para estadios precoces.

Nos corresponde hablar ahora de la supervivencia libre de enfermedad (SLE). Todos los análisis de supervivencia de nuestro estudio los hemos hecho por duplicado, considerado como “endpoint” u “objetivo” tanto la supervivencia global como la supervivencia libre de enfermedad. Desde el punto de vista estadístico son conceptos bastante distintos y que requieren una reflexión, basada en la interesante revisión que Pilz ha publicado recientemente (279). Al analizar la supervivencia global, como ya anticipamos en la introducción, se incluye como evento terminal únicamente el fallecimiento del paciente. Son datos censurados la pérdida del paciente en el seguimiento y el permanecer vivo al cierre del estudio. En la supervivencia libre de enfermedad, que se considera un “surrogate endpoint”, que podemos traducir como “objetivo alternativo”, el evento terminal es la muerte del paciente o la progresión de la enfermedad. Son censuradas las pérdidas y el permanecer vivo y sin enfermedad al cierre del estudio.

En la mayoría de estudios que buscan analizar el efecto de un tratamiento oncológico el objetivo principal es la supervivencia global. De hecho, para la aprobación de fármacos para uso antineoplásico, la Food and Drug Administration (FDA), de forma especial en el CBNM, ha utilizado prácticamente siempre ese endpoint.

La SLE no es el único objetivo alternativo, aunque sí el más frecuente. Es un objetivo que se alcanza antes a lo largo del seguimiento, por lo que permite extraer conclusiones más precoces y hacer medidas más fáciles. Sin embargo, está supeditado a más factores de confusión que la supervivencia global. Sobre todo, a la determinación del momento de la recidiva o a la duda sobre si se trata de una recidiva o un segundo tumor (a veces imposibles de diferenciar, sobre todo en estadios precoces). Además, no está demostrado desde el punto de vista estadístico en este tipo de estudios que se correlacione bien con la supervivencia global, y se asume que para que esto sea así el tamaño muestral debe ser muy grande (279).

En un caso más extremo, hay estudios que analizan la SLE, pero incluyendo solo como evento terminal la recidiva, de modo que el paciente que fallece sin enfermedad por otra causa se considera perdido. En este caso el número de perdidos sería tan alto que invalidaría el estudio salvo que contásemos con un enorme tamaño muestral. Además, nos encontraríamos con probabilidades de supervivencia menores que probabilidades de recidiva, lo cual sería de muy difícil interpretación.

En resumen, hoy por hoy el objetivo estándar en este tipo de estudios es el análisis de la supervivencia global. Sin embargo, y dado que disponíamos de los datos en nuestra base, hemos incluido el análisis de la SLE en la práctica totalidad de las variables analizadas.

En nuestra serie la probabilidad de estar vivo y sin recidiva a uno, tres y cinco años de la cirugía fue del 83,7 %, 61,9 % y 51,9 %, lo cual no está lejos de los valores de supervivencia global. Esto nos da idea de que la mayoría de pacientes que están vivos a cinco años, lo están sin recidiva. No hemos analizado aquí qué ocurrió con los pacientes que recidivaron, ni hemos hecho distinción entre el tipo de recidiva (local, a distancia, segundo tu-

mor, etc.) a la hora de hacer los estudios de supervivencia.

3-2. Patrón de mortalidad y recurrencias

Vemos que en el 39,8 % de los 88 fallecidos durante el seguimiento, la causa no estuvo relacionada directamente con su enfermedad neoplásica. Es un dato típico de series quirúrgicas (280). Sin embargo, en los estudios de supervivencia de este tipo no suele hacerse distinción en función de dicha causa de muerte. Es cierto que existe el concepto *muerte específica por la enfermedad*, pero a la hora de comparar el efecto que sobre la supervivencia tiene un factor biológico de un tumor, como es el objetivo principal de nuestro estudio, si asumimos que la probabilidad de fallecer por causas ajenas al objeto del estudio es aleatoria y no está relacionada con esas variables biomoleculares que queremos analizar, como es nuestro caso, solo se debe considerar como evento terminal el fallecimiento, independientemente de la causa.

El patrón de mortalidad y recidiva en pacientes con CBNM reseado es bastante homogéneo en la mayoría de las series. Durante los dos primeros años tienen lugar el 80 % de las recidivas. En alguna gran serie reciente (como la publicada a principios de 2013 del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de Nueva York con más de 1200 pacientes), el pico de incidencia de recidivas se desplaza hacia la derecha, siendo importante hasta los cuatro años (281). Las gráficas de densidad de mortalidad y recidiva permiten visualizar la forma de agruparse los eventos en nuestra serie (figuras 43 a 46). Vemos que lo hacen entre el segundo y el cuarto años, para después alcanzar una meseta más o menos estable a lo largo de todo el seguimiento por encima de cinco años. A partir de esos cinco años los datos son mucho más difíciles de interpretar, ya que la influencia del tumor sobre la mortalidad va desapareciendo, y a la larga las curvas de supervivencia tienden a unos valores comunes donde ya es complejo extraer conclusiones sin riesgo de sesgos.

Al estratificar la recidiva en función del tipo, es decir, diferenciando recidiva loco-regional, metástasis pulmonar o metástasis a distancia, vemos cómo las primeras aparecen dentro de los tres primeros años, y después son una rareza. Las metástasis, aunque más frecuentes en los primeros 36 meses, siguen apareciendo también en forma de meseta durante todo el seguimiento.

En la gráfica que analiza el tipo de recidiva y llega hasta los diez años de seguimiento vemos cómo a partir del quinto año solo aparecen metástasis pulmonares. Muy probablemente no son tales, y corresponden a segundos tumores pulmonares. No se ha incluido en el estudio la valoración de las características morfológicas y biomoleculares de las recidivas, por lo que no podemos saber si se trata del mismo tumor o de un segundo primario pulmonar.

Del mismo modo decidimos estratificar la mortalidad por causa, en función de los valores descritos anteriormente. Vemos también que la mortalidad derivada del propio tumor acontece durante los primeros años, mientras que pasados aproximadamente 36 meses, deja paso a mortalidad por otras causas. Sí destaca un pequeño pico de mortalidad por causas ajenas al tumor durante los primeros 12 meses, lo cual tiene sentido, ya que se trata de tumores en estadios precoces, siendo raro por tanto que aparezca una progresión fatal tan pronto. Sí hubiésemos añadido la mortalidad postoperatoria este tipo habría sido probablemente más acusado. Es posible que la cirugía condicione mortalidad, no solo entre los 30 y los 90 días (que aquí excluimos) (282), sino también durante todo el

primer año más allá de los 90 días que hemos establecido aleatoriamente como muerte postoperatoria (283).

Finalmente añadimos dos gráficas que trataban de buscar la influencia que la edad avanzada (en este caso, como hemos dicho, con un punto de corte arbitrario en 70 años) podía tener en la causa de muerte. Encontramos que las curvas que presentan mortalidad por el tumor y por otras causas son similares independientemente del grupo etario, por lo que parece que las muertes por causas ajenas al tumor están suficientemente balanceadas como para pensar que se distribuyen aleatoriamente entre los pacientes y por tanto no restan validez a un estudio que en sí mismo no discrimina a la hora de establecer la variable *mortalidad* entre la provocada por el tumor y la producida por otra causa.

3-3. Supervivencia en función de posibles factores pronósticos demográficos y del tumor

Una vez hecha una evaluación que podemos llamar global de la supervivencia de nuestra serie, comenzamos a intentar identificar factores que pueden condicionar dicha supervivencia e identificar subgrupos de pacientes con una evolución diferente.

Insistimos en el punto de partida de este análisis. Lo explica bien Enriqueta Felip en una reciente revisión: la administración de tratamiento adyuvante en pacientes con CBNM reseado aumenta la supervivencia a los cinco años entre un 4 % y un 15 % (284). Sin embargo, no está exenta de toxicidad, la mayoría de pacientes no se beneficiarán de ella, y no debemos olvidar que estamos hablando de pacientes recientemente sometidos a una importante intervención quirúrgica que puede condicionar la tolerabilidad del tratamiento adyuvante. Por tanto, continúa siendo de vital importancia la búsqueda de factores pronósticos que identifiquen qué pacientes se beneficiarán del tratamiento, no solo porque tengan más riesgo de recidiva, sino también porque su tumor tenga unas características biomoleculares que le confieran una mayor capacidad de respuesta a determinados fármacos. Hoy en día se trabaja a nivel de estudio de DNA. Sin embargo si las series son homogéneas, los análisis de factores demográficos, quirúrgicos o histológicos continúan siendo muy relevantes.

3-3.1. Supervivencia en función de factores demográficos

3-3.1.a. Género

El cáncer de pulmón ha sido durante décadas una enfermedad predominantemente asociada al género masculino. El motivo principal lo encontramos en la mayor prevalencia de fumadores en hombres que en mujeres.

Es cierto que en los últimos años estamos asistiendo a un cambio desde el punto de vista epidemiológico y social en cuanto al hábito tabáquico. En la Consulta Nacional de Salud 2011/2012 un 27,8 % de los varones y 20,2 % de las mujeres se declaran fumadores activos. Asimismo, un 26,7 % de hombres y un 12,7 % de mujeres adicional dicen haber sido fumadores (285). La tendencia por tanto es a equipararse.

Sin embargo, las características de los tumores desarrollados en mujeres parecen ser diferentes a los de aque-

llos que se presentan en varones. Asimismo existe un grupo de adenocarcinomas típicos de mujeres no fumadoras que presentan peculiaridades que hacen que en los últimos años se hayan estudiado de forma específica. Son adenocarcinomas, habitualmente con patrón de crecimiento lepidico, con una incidencia de mutaciones en el gen del EGFR por encima de la media, y que por tanto les hace susceptibles de ser tratados con fármacos individualizados como son los inhibidores de la tirosín quinasa. En grandes series el género se comporta como factor pronóstico independiente (286), sobre todos en estadios precoces (especialmente en estadio I). A la espera de contrastar estos datos tratando de evitar sesgos de confusión, sí parece obligado analizar esta variable en los estudios que hacen referencia al pronóstico del CBNM. En nuestra serie se aprecia una tendencia a un mejor pronóstico entre mujeres (66,7 % vs 53,4 %). Sin embargo la diferencia no fue significativa. Hay que tener en cuenta que solo un 6 % de los pacientes de nuestra serie fueron mujeres. Se trata de una serie relativamente antigua en la que probablemente aún no están reflejados los cambios epidemiológicos que se han producido en los últimos años y que hemos comentado. La serie de validación de la séptima edición del TNM presenta el género como variable pronóstica independiente (287). Una serie reciente de más de cuatro mil pacientes británicos mostró al género femenino como variable independiente de buen pronóstico pero solo en adenocarcinomas reseados en estadio I (288).

Por tanto, actualmente la hipótesis de trabajo es que el género no es en sí mismo un factor pronóstico. Se ha visto, eso sí, que las características de los tumores que aparecen en mujeres son más favorables: adenocarcinomas, mejor grado de diferenciación, menor índice mitótico (Ki-67), e incluso estadios más precoces (289).

3-3.1.b. Edad

El estudio de la edad como factor de riesgo en estudios de supervivencia es complejo, ya que se trata de una variable continua que requiere análisis estadísticos muy elaborados si queremos evitar sesgos, o bien establecer puntos de corte que realmente son aleatorios si no llevan detrás todo ese proceso estadístico.

Con el tiempo la perspectiva del cirujano a la hora de considerar a un paciente como “de edad avanzada” o “añoso” también ha ido cambiando. El riesgo quirúrgico no está determinado únicamente por la edad. En ningún caso es contraindicación por sí sola para una intervención quirúrgica de resección pulmonar. Los puntos de corte han ido cambiando también. Durante mucho tiempo se establecía el punto de corte en 70 años a la hora de analizar la edad como posible factor de riesgo para el tratamiento del carcinoma broncogénico. Sin embargo, en las series de los últimos años que introducen esta variable de estudio, el punto de corte habitualmente se establece en 75 o incluso 80 años (290).

Para estudios de supervivencia en estadios precoces, establecer el punto de corte en edades muy avanzadas nos lleva a sesgos de confusión. El seguimiento a cinco y diez años de pacientes por encima de 80 años de edad (es decir, en torno a la esperanza de vida media en nuestro entorno sociosanitario) analizando como “endpoint” la supervivencia global, va a determinar un elevado número de fallecidos por causas ajenas al cáncer de pulmón. Como hemos visto que en la mayoría de estudios no se establece una diferenciación entre causas de muerte nos parece un punto de corte excesivo. Nosotros lo establecimos en 70 años, lo que daba lugar a dos grupos de tamaño aceptable para establecer comparaciones: un 34 % de los pacientes estaban por encima de esa edad.

Encontramos una tendencia a peor supervivencia entre paciente mayores, que no fue significativa al hablar de supervivencia global, pero sí al analizar la supervivencia libre de enfermedad.

En este caso la ausencia de significación nos parece importante. Si observamos las curvas de supervivencia global en función de la edad, vemos que comienzan a separarse en torno a los 4 años (figura 49, apartado 2-3.2.). Y esta separación aumenta con la edad, como es lógico (hemos representado una gráfica con un seguimiento por encima de 10 años).

Luego, a modo más bien de curiosidad, analizamos cómo se comportaban las curvas de mortalidad en pacientes fallecidos por su tumor en comparación con otras causas, entre pacientes con más o menos de 70 años. En este caso vimos que no había diferencias. Estas gráficas son de difícil interpretación desde el punto de vista estadístico, pero nos dieron una idea de que los decesos ya fueran por tumor o por otra causa ocurrían siguiendo más o menos el mismo patrón en menores de 70 años que en mayores de esa edad.

Entre las grandes series, en algunas la edad no actúa como factor pronóstico (291). Sin embargo, nos parece interesante la distinción que hace Goodgame (153) a la hora de analizar esta variable. En una serie quirúrgica de 715 pacientes en estadio I completamente reseados, encuentra una supervivencia global a cinco años del 52 %, que asciende al 67 % para menores de 70 años ($p < 0,0001$). Sin embargo, analiza la probabilidad de recidivas y en este sentido no encuentra diferencias, lo cual nos hace pensar que la forma en la que edad influye sobre la supervivencia puede no estar en relación directa con la enfermedad y ser por tanto un dato con sesgos (153). En la gran serie de validación de la séptima edición del TNM la edad se comportó como factor pronóstico independiente (287)

3-3.2. Supervivencia en función de factores derivados del tumor

3-3.2.a. Tipo histológico

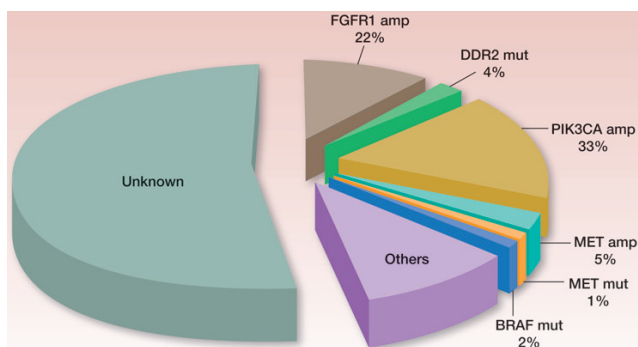
Hemos comentado ya que el tipo histológico, fundamentalmente adenocarcinoma y escamoso, determina tumores con diferencias que van mucho más allá de la morfología. Cada vez más se aprecia que su epidemiología, su comportamiento, su respuesta al tratamiento, etc., son diferentes.

En los últimos años el entusiasmo que ha despertado tanto en la comunidad científica como entre los clínicos el hallazgo de alteraciones biomoleculares en adenocarcinomas que han permitido el diseño de ciertos fármacos dirigidos contra dianas terapéuticas, como los inhibidores de la tirosín quinasa o el crizotinib, han llevado a centrar los esfuerzos en este tipo histológico. Hoy por hoy, el carcinoma escamoso presenta menos posibilidades de control más allá de las opciones quirúrgicas de una resección completa.

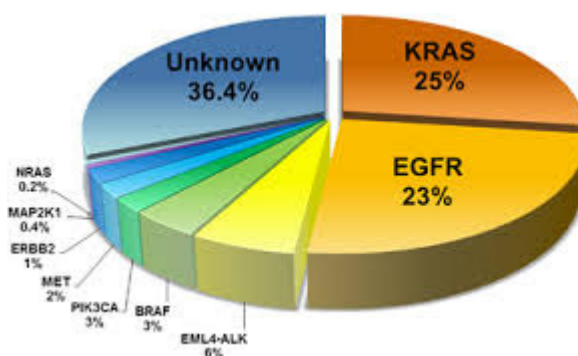
Es cierto que se han identificado alteraciones biomoleculares en los carcinomas escamosos que difieren en su mayoría de las encontradas en los adenocarcinomas (figura 63).

Figura 63. Frecuencia de alteraciones genéticas encontradas en CBNM susceptibles de dar lugar a terapias dirigidas.

A. Carcinomas escamosos. Tomada de (292). Mut: mutación. Amp: amplificación.



B. Adenocarcinomas. Tomada de (293).



En nuestra serie no hubo diferencias en la supervivencia global ni libre de enfermedad en función del tipo histológico. El 62 % de los tumores fueron epidermoides. La supervivencia a cinco años fue del 58,4 % para los escamosos y del 54,1 % para los adenocarcinomas. Hubo muy pocos indiferenciados, por lo que su análisis es muy limitado.

Esta homogeneidad en el pronóstico en función del tipo histológico nos vino relativamente bien porque de este modo esta variable no se comportó como factor de confusión a la hora de analizar la expresión de las distintas proteínas. Aun así en todos los casos, como hemos visto, analizamos la expresión en función del tipo histológico y si era diferente incluimos el estudio de supervivencia por separado en los escamosos y los adenocarcinomas.

Una de las mayores series que comparan la evolución en pacientes con tumores en estadio precoz completamente resecaados analizando la influencia del tipo histológico es japonesa. Maeda y colaboradores examinan una serie de 1.870 pacientes en estadios I y II completamente resecaados de las décadas de los 90 y 2000 (294). Vieron que los escamosos rara vez se operaban en estadio IA, a diferencia de los adenocarcinomas, es decir, su tamaño al diagnóstico era mayor. Y dentro de ese estadio IA la supervivencia al año fue significativamente mayor entre los adenocarcinomas. Sin embargo, en estadio II la supervivencia libre de enfermedad fue mayor en los escamosos que en los adenocarcinomas, con unas diferencias importantes. En nuestro estudio no encontramos esas diferen-

cias tan llamativas por estadios y los pacientes se comportaron de forma más o menos homogénea independientemente del tipo histológico. Pese a ello, en series con un tamaño muestral grande nos parece obligado intentar hacer los estudios de biología molecular de forma diferenciada entre epidermoides y adenocarcinomas, ya que cada vez tenemos más claro que son tumores diferentes (295). En nuestro caso, como en la mayoría de series que analizan perfiles de expresión proteica, el limitado tamaño muestral condicionado por el elevado número de muestras a estudiar, no permitió hacer esta distinción. En cualquier caso, la tecnología de matrices de tejido se puede aplicar a gran escala, lo que posibilitaría extraer conclusión de peso en este aspecto.

3-3.2.b. Grado de diferenciación

El grado de diferenciación sí presentó diferencias en cuanto a pronóstico en nuestra serie. Se trata, como ya dijimos, de un parámetro bastante dependiente del observador, por cuanto la estratificación que establece la AJCC es estructural (226). En nuestro caso, la uniformidad en los dos patólogos que analizaron todas las muestras garantiza la homogeneidad de criterios. Un 75 % de nuestras muestras tenían un grado de diferenciación bueno o moderado. La supervivencia a cinco años para pacientes con tumores bien diferenciados fue del 64,3 %. Un 53,3 % para los moderadamente diferenciados y un 40,4 % para los pobremente diferenciados. Solo un 6 % fueron indiferenciados, y aunque éstos presentaron mayor supervivencia su escaso número convierte a este resultado en poco valorable. Al comparar las curvas con el test de log rank se encuentra que las diferencias están justo en el límite de la significación estadística ($p = 0,05$). Haciendo un estudio de riesgos proporcionales de Cox para los cuatro posibles valores de la variable “grado de diferenciación” encontramos que el pronóstico empeora conforme disminuye ésta, con un Hazard Ratio de 2,01. Lo mismo ocurre aplicando este test estadístico al intervalo libre de enfermedad, con un Hazard Ratio de 1,83. Este modelo de Cox parece manifestar que el mayor empeoramiento en el pronóstico se produce cuando el tumor pasa de ser moderadamente diferenciado a pobremente diferenciado, por lo que agrupamos los bien y moderadamente diferenciados por un lado, dejando aparte los pobremente diferenciados y los indiferenciados. Nos resultan dos curvas de supervivencia separadas, pero con diferencias no significativas ($p = 0,09$). La supervivencia a cinco años para el grupo mejor diferenciado fue de 57,7 %, mayor que el 45,1 % del grupo de peor diferenciación. En supervivencia libre de enfermedad las tasas fueron del 55,1 % y el 42,1 % respectivamente. Tampoco las diferencias encontradas fueron significativas.

Como conclusión de estos análisis estadísticos podemos decir que la variable, estudiada en su conjunto se comporta como factor pronóstico, de modo que a peor diferenciación, peor evolución del paciente. Sin embargo, no es posible establecer un punto de corte claro que establezca dos grupos pronósticos basados en los valores de esta variable. Si a este hecho le añadimos ese aspecto subjetivo que puede tener la adjudicación de un grado u otro a la hora de analizar las muestras, sobre todo si no disponemos de uniformidad en el observador, encontramos difícil de interpretar esta variable.

A la hora de analizar la expresión de nuestras proteínas, al igual que hicimos con el tipo histológico, las correlacionamos con el grado de diferenciación para ver si encontrábamos diferencias en la expresión de cada una de ellas, y en su caso estratificamos las curvas de supervivencia para eliminar esta variable como posible factor de

confusión. En la literatura no hemos encontrado estudios que se centren en el análisis del grado de diferenciación del CBNM y su posible influencia en el pronóstico.

3-3.2.c. Estadio y clasificación TNM

Ya hemos hablado de ello. La supervivencia global a cinco años en función de la estadificación TNM de nuestra serie fue del 60,9 %, 55,3 %, 50 % y 43,2 % para los estadios IA, IB, IIA y IIB respectivamente, parámetros más o menos superponibles a la serie del Lung Cancer Staging Project, cuyos resultados utilizando la sexta edición de la clasificación TNM son IA: 73 %, IB: 54 %, IIA: 48 %, IIB: 38 % (49)

En nuestra serie el estadio y el TNM no funcionaron como factores pronósticos independientes. Probablemente influyó el hecho de que el 62,5 % de los casos fueran estadio IB, y solo 20 pacientes tenían tumores en estadio II (19,4 %). Habría que ampliar el tamaño muestral para encontrar las diferencias que justifican la propia clasificación TNM y que están validadas en la literatura mundial. También nos llama la atención la tasa de supervivencia a cinco años para los casos en estadio IA, que es del 60,9 %, cuando en las grandes series supera el 70 %. Entre los 36 y los 48 meses se produce en nuestra serie una caída importante en la curva tanto de supervivencia global como libre de enfermedad. Sin embargo, los pacientes en estadio IA que no habían fallecido permanecieron vivos y sin recidiva durante muchos años, a diferencia de los estadios IB, cuya curva mantiene una pendiente bastante homogénea en el tiempo, más allá de los primeros cinco años de seguimiento. Esto justifica pensar que en el estadio IA, transcurridos los primeros cuatro años, los pacientes podrían considerarse curados.

De nuevo nos favorece en el estudio de nuestra serie tener la mayoría de pacientes agrupados en grupos pronósticos similares, de modo que se eviten sesgos dentro de lo posible.

Sí es cierto que, aunque como hemos visto las resecciones no anatómicas no han demostrado influir negativamente en el pronóstico de los pacientes, al menos conceptualmente conllevan una peor estadificación de las regiones ganglionares N1, lo cual podría plantear la hipótesis de que existan pacientes que hemos clasificado como IA y que fueran realmente estadio II. Esto podría justificar un peor pronóstico de estos pacientes IA (con tumores muy pequeños periféricos), que aun no siendo significativo, sí nos llama la atención.

3-3.3. Supervivencia en función de factores derivados del procedimiento quirúrgico

3-3.3.a. Tipo de resección

Como cirujanos somos conscientes de que la resección quirúrgica estándar indicada en el CBNM es la lobectomía. La hipótesis de partida es que resecciones menores pueden ser menos completas desde el punto de vista oncológico aunque cumplan los requisitos que hemos descrito de resección completa. Y por otra parte sabemos que la neumonectomía conlleva unos riesgos intra y postoperatorios que hacen que intentemos evitarla siempre que sea posible.

La serie quirúrgica deseada por un cirujano es aquella que incluya solo lobectomías en pacientes con tumores en el mismo estadio. Sin embargo, obtener una serie así con un tamaño muestral suficiente en un único centro es

bastante complejo.

Ya hemos hablado de las resecciones segmentarias y de las neumonectomías al discutir las características de nuestra serie. Al hacer el estudio de supervivencia tratamos de encontrar diferencias que pudieran convertir estas variables en sesgos de asociación o de confusión. Por eso se hicieron tantas comparaciones.

En primer lugar, comparando los distintos tipos de resección, encontrando diferencias en la supervivencia sobre todo a los cinco años. Reproducimos la tabla de resultados.

Tipo de cirugía	SV a 1 año	SV a 3 años	SV a 5 años	Mediana
Segmentaria	93,3 %	63,3 %	44,4 %	45 meses
Lobectomía	93,6 %	71,2 %	59,1 %	99 meses
Bilobectomía	100 %	66,7 %	66,7 %	No alcanzada
Neumonectomía	89,3 %	55,7 %	47,4 %	73 meses

SV: supervivencia

Vemos que al año no hay diferencias llamativas, como tampoco las hay a los tres años. Es a los cinco años cuando encontramos un empeoramiento importante en la tasa de supervivencia de pacientes sometidos a resecciones segmentarias y a neumonectomías. Las diferencias halladas en función del tipo de resección resultaron significativas con el test de Tarone-Ware ($p < 0,05$).

La interpretación respecto a las resecciones menores que una lobectomía, puede ser que dado que se hacen por las características clínicas del paciente, las cuales no permiten hacer una lobectomía, estamos seleccionando a un grupo de pacientes con mayor comorbilidad y por tanto con mayor riesgo de presentar otras enfermedades que puedan condicionar su supervivencia o influir de alguna manera en la evolución de su tumor, más allá del riesgo que una resección menor pueda suponer desde el punto de vista oncológico. No tenemos una serie suficientemente grande como para analizar la causa de muerte de cada paciente fallecido con resección segmentaria y ver la influencia que la podía haber tenido.

En cuanto al peor pronóstico en pacientes sometidos a neumonectomía, y dado que hemos eliminado del estudio los pacientes que fallecieron en los primeros 90 días tras la cirugía y los pacientes con fistulas de muñón bronquial que fueron tratados de forma agresiva, hemos de interpretar que, o bien las características de los tumores que obligaron a hacer la neumonectomía (localización central, tamaño) convertían a estos tumores en más susceptibles de recaer, o bien que las causas de fallecimiento de los pacientes neumonectomizados estaban relacionadas con las complicaciones tardías inherentes a la propia resección, como puede ser el síndrome post-neumonectomía.

Para tratar de analizar de forma individualizada los subgrupos de pacientes con cirugías que podemos llamar “de riesgo de empeorar la supervivencia”, hicimos dos análisis de subgrupos:

Primero comparamos los pacientes sometidos a resección segmentaria con todos los demás. Aunque las curvas de supervivencia comienzan a divergir a partir de los tres años de seguimiento, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. A largo plazo, probablemente esta vez sí debido a las características clínicas de estos pa-

cientos, que los hace más delicados, las diferencias se hacen más importantes, si bien ya pasados 8 ó 10 años las probabilidades de que la causa de muerte sea el tumor son mínimas. En cualquier caso, el estudio de las curvas no dio diferencias significativas estadísticamente, ni en supervivencia global ni libre de enfermedad.

A continuación comparamos los pacientes neumonectomizados con todos los demás. Aquí las curvas presentaron una menor divergencia, si bien la tendencia fue a una peor supervivencia en el caso de las neumonectomías, más acusada en los primeros años de seguimiento (a diferencia de lo que ocurría con las resecciones sublobares). Pensamos que el peor pronóstico encontrado en estos pacientes podía estar en relación en esos primeros años más con la mortalidad inherente al paciente neumonectomizado por complicaciones a medio plazo que a factores oncológicos. Máxime pensando que la radicalidad oncológica de la neumonectomía parece fuera de toda duda (por márgenes, linfadenectomía, etc.).

Estratificamos pues por causa de muerte, y en efecto, comprobamos que la mortalidad aumentada en la curva de neumonectomía, aunque no significativa estadísticamente, no estaba en relación a un peor pronóstico del tumor en esos paciente, sino a fallecimientos por otras causas.

Con este resultado hicimos el mismo análisis para las resecciones segmentarias, para ver si las muertes eran por el tumor o por otra causa, y así corroborar nuestra hipótesis de unas líneas más arriba. ¿Ocurrió lo mismo? Pues aunque sin significación estadística, sí ocurrió lo mismo, ya que las curvas de supervivencia discurren invertidas, es decir, en caso de muerte por el tumor, los fallecimientos fueron mayores entre pacientes sometidos como mínimo a lobectomía, mientras que en la gráfica de muertes por otra causa, el peor pronóstico correspondió a las resecciones segmentarias (figuras 59 y 60, apartado 2-5.1.).

Estas reflexiones podrían llevar a confirmar o descartar nuestras hipótesis quirúrgicas que planteábamos al principio, con una serie de mayor tamaño muestral.

En resumen, ¿qué papel desempeña el tipo de resección a la hora de analizar factores pronósticos biomoleculares en pacientes intervenidos por CBNM en estadios precoces? Porque no debemos olvidar que el objetivo principal es ver la influencia que los distintos perfiles de expresión proteica tiene en el pronóstico de nuestros pacientes. El objetivo del análisis de factores demográficos y quirúrgicos es intentar descartarlos como factores de confusión, identificándolos primero, y ajustando los resultados en caso de poder sesgarnos el estudio biomolecular, que es nuestro principal foco en este proyecto.

3-4. Supervivencia en función de posibles factores pronósticos biomoleculares

El objetivo principal de nuestro estudio es intentar identificar perfiles de expresión proteica que puedan definir subgrupos de pacientes con diferente pronóstico subsidiarios de actuar de forma especial sobre ellos, bien con la administración de tratamiento complementario, bien con un seguimiento más exhaustivo que incluya pruebas adicionales o un aumento de la frecuencia de las habituales.

Hasta ahora hemos visto que la edad por encima de 70 años, el grado de diferenciación y el tipo de resección actuaron como factores pronósticos al hablar de supervivencia libre de enfermedad, supervivencia global o ambas,

respectivamente.

Pasamos entonces a hacer el estudio univariante para la expresión de las 21 proteínas analizadas.

3-4.1. Consideraciones sobre la metodología de tissue-arrays utilizada

Ya hemos comentado las ventajas que la metodología de los tissue-arrays o matrices de tejido aporta para estudios de este tipo, en que para un número determinado de muestras tumorales queremos analizar patrones de expresión de diferentes proteínas. La construcción del tissue-array se hizo en el laboratorio del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos. Todos los pacientes fueron operados en dicho centro, por lo que el protocolo de obtención, manipulación y almacenaje de las muestras fue homogéneo. Algunos pacientes fueron seleccionados retrospectivamente y otros lo fueron prospectivamente. Sin embargo la base de datos tanto a nivel clínico, como anatomopatológico, se hace en ambos servicios de forma prospectiva, de modo que todos los datos de que se disponía se habían ido obteniendo a tiempo real.

La elaboración y manipulación del tissue-array se llevó a cabo por los técnicos especializados del centro. La metodología se resume en el Anexo II. Se hizo conforme a las recomendaciones habituales que han validado esta tecnología en la literatura científica (296).

Por su parte la lectura de los mismos fue llevada a cabo por dos patólogos independientes, siguiendo los mismos criterios. De cada muestra en parafina se obtuvieron dos cortes para efectuar la lectura a dos niveles del cilindro y promediar el grado de expresión de la manera en que hemos explicado en la sección correspondiente de Material y Métodos. En cáncer de mama (y se considera una validación extrapolable a otros tumores) se ha comprobado que los resultados de la lectura de dos secciones del cilindro de la muestra es comparable a la lectura de la totalidad de dicha muestra en más del 95 % de los casos analizados. Esto minimiza de algún modo la posible falta de representatividad que una muestra tumoral puede presentar, ya que, como hemos dicho, el tejido tumoral presenta variabilidad entre unas zonas y otras (297).

El método de evaluación de la expresión las proteínas fue semicuantitativo. Esto hace referencia a que se analizó en cada muestra el porcentaje de células en que aparecía sobreexpresada la proteína, es decir, en la que se detectaba la inmunofluorescencia del anticuerpo marcado. No se tuvo en consideración la intensidad, que es más subjetivo, sino el porcentaje de células positivas. Evidentemente se trata de una evaluación con cierto grado de subjetividad. ¿A partir de qué porcentaje de células positivas consideramos que la proteína está sobreexpresada en esa muestra? En nuestro caso recurrimos a dos criterios, como hemos comentado al describir la técnica:

- La revisión de la literatura al respecto
- Una distribución de los valores de la proteína que permitiese realizar estudios estadísticos. Si un punto de corte para considerar positiva una proteína daba lugar a dos grupos, de los cuales uno era muy pequeño, este punto de corte no era apto para hacer análisis con cierto grado de soporte estadístico. De nuevo se trata de ajustes con cierta subjetividad.

La inmunorreactividad para la valoración de expresión de una proteína suele dar lugar a una variable cuantitativa discreta con cuatro o cinco categorías. En nuestro caso convertimos esta variable en cuantitativa discreta di-

cotómica, es decir, reducida a dos categorías: “positiva” o “negativa”. La distribución de casos entre estos dos grupos es la que se intentó que fuera lo más balanceada posible.

En la sección de material y métodos hemos detallado el modo de evaluación de la expresión de cada una de las proteínas analizadas, con referencias bibliográficas que justifican el modo en que se han establecido las categorías de cada una de las variables.

La inmunohistoquímica es una técnica no exenta de limitaciones. La más importante la establece la frecuente falta de validación de los anticuerpos que se utilizan. No hay guías clínicas o recomendaciones sobre cómo debe realizarse esta validación. Habitualmente, para comprobar la especificidad que presenta la unión de un anticuerpo a su supuesto antígeno, se utiliza la técnica de western blot o inmunoblot, que realiza una separación de proteínas por electroforesis, para después transferirlas a una membrana absorbente donde se apliquen los anticuerpos que se desean validar. En algunos casos esos anticuerpos pueden unirse a más de una proteína, con lo que su especificidad para estudios como el nuestro quedaría en entredicho (298). En una eventual implementación de un estudio de este tipo de cara a su potencial aplicación en la clínica nos parece obligada una validación de todos los anticuerpos utilizados para los análisis inmunohistoquímicos.

3-4.2. Resultado obtenido en el estudio de la expresión de cada proteína como posible factor pronóstico.

A la hora de realizar la discusión, hemos agrupado las proteínas analizadas en función de los respectivos pathways a los que pertenecen, para darle más coherencia al análisis. En la introducción realizamos un pequeño resumen de cada una de estas vías susceptibles de participar en la oncogénesis. Remitimos al lector a repasar brevemente los aspectos allí comentados.

3-4.2.a. Ciclo Celular

Vimos en la introducción la importancia de las distintas fases por las que pasa una célula de forma cíclica desde su origen hasta su reproducción. Los dos eventos más importantes que ocurren en cada uno de estos ciclos que transcurren en la vida de una célula son la replicación de todo el material genético que le es específico y la división celular. La génesis de dos copias exactas de una célula está sometida a agresiones externas y a errores internos que deben ser subsanados para que dicha célula no pierda sus características y su control. Las alteraciones en el correcto transcurrir de las fases del ciclo celular pueden dar lugar a una pérdida de control reproductivo, una de las vías oncogénicas más estudiada. En este ciclo, la acción de las enzimas que participan en la replicación del material genético es fundamental.

Al respecto del papel actual de los genes supresores tumorales y las proteínas que actúan sobre el ciclo celular, resulta muy instructiva la revisión que publican Alfonso Baldi y sus colaboradores del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Nápoles (299). No entraremos aquí en detalle sobre la revisión que realiza, pero su lectura permite hacerse una idea del conocimiento que tenemos actualmente sobre el ciclo celular y su relación

con el desarrollo de tumores, así como su potencial como discriminador pronóstico y como fuente para el estudio y validación de terapias dirigidas.

Las proteínas más importantes implicadas en la regulación del ciclo celular son las ciclinas y sus respectivas quinasas, que forman complejos que a su vez catalizan la acción de proteínas como la del gen del retinoblastoma (pRB). Grupos de proteínas como las INK4 o las p21, p27 y p52 interactúan sobre dichos complejos.

Proteína Ciclina A

En algunos estudios la disminución de su expresión ha actuado como factor de buen pronóstico en pacientes con CBNM (181, 182). En un estudio ya antiguo de Volm, la sobreexpresión de ciclina A se asoció a un peor pronóstico, con un riesgo relativo HR = 1,9. Además se correlacionó con la afectación tumoral ganglionar. Más de dos terceras partes de la serie eran pacientes en estadio III.

El complejo que forma la Ciclina A con cdk2 ha mostrado mediar la apoptosis producida por fármacos como el pemetrexed, lo cual da mucha información a la hora de valorar mecanismos de respuesta a fármaco y en su caso también posibles mecanismos de resistencia (300).

Asimismo se ha detectado un polimorfismo en el promotor del gen de la ciclina A que aumenta el riesgo de carcinoma broncogénico entre otros (301).

La única serie que encontramos en la literatura que analiza de forma específica la ciclina A en una serie de pacientes reseados es la de Kosacka. Encuentra que la ciclina se expresa más en epidermoides que en adenocarcinomas. Sin embargo su expresión no se comporta como factor de riesgo (302).

En nuestra serie, la expresión de ciclina A en más del 5 % de las células de una muestras fue considerada como positiva, y con este criterio, un 56,3 % de los tumores presentaban sobreexpresión. Coincidiendo con Kosacka, la expresión fue mayor en epidermoides que en adenocarcinomas ($p=0,02$). Sin embargo, tampoco en nuestro caso se comportó como factor pronóstico (HR = 1,06; $p = 0,78$).

Tampoco estratificando por tipo histológico hubo diferencias significativas, si bien la tendencia en tumores epidermoides fue a un peor pronóstico en casos de expresión negativa, mientras que en los adenocarcinomas, la sobreexpresión fue lo que mostró una menor tasa de supervivencia. Probablemente una serie mayor podría dar información más clara a este respecto.

Y de nuevo no se encontraron diferencias en cuanto a la supervivencia libre de recidiva en función de la expresión de ciclina A ($p = 0,76$). Las tendencias en función del tipo histológico fueron similares a las descritas para la supervivencia global, aunque sin diferencias significativas.

No hubo diferencias en la expresión de ciclina A en función del grado de diferenciación del tumor.

Proteína p53

Es una de las proteínas más estudiadas del ciclo celular. Parece que su función es primordial en la correcta sucesión de fases del mismo. Se trata de un gen supresor tumoral, que se codifica en el brazo corto del cromosoma 17. Su función es bloquear el ciclo celular e inducir la muerte celular programada o apoptosis cuando se producen

errores o alteraciones en el DNA de las células que podrían hacerla escapar del control normal y convertirla de algún modo en tumoral. Esta detención tiene lugar en el punto de control G1/S (figura 5). La proteína p53 favorece la transcripción de inhibidores de CDKs, sobre todo p21. Al inhibir los complejos CDK/ciclina, se bloquea la fosforilación de pRb y con ello se interrumpe el ciclo celular.

En resumen, p53 bloquea el ciclo celular. Su sobreexpresión puede resultar letal para la célula, que al no poder dividirse, entra en apoptosis. En células sanas la concentración de p53 es muy baja.

Las mutaciones en el gen de esta proteína han sido descritas desde hace casi veinte años en el CBNM, y aparecen hasta en la mitad de los mismos, con una importante repercusión en la replicación celular. En los últimos años la investigación de esta proteína ha estado más orientada a analizar estas mutaciones que a la expresión propiamente dicha de la misma en el núcleo celular. Se espera que estas mutaciones permitan encontrar dianas terapéuticas, así como entender mejor los fenómenos de quimiorresistencia asociados a esta proteína.

Desde el punto de vista de la significación pronóstica que la expresión de p53 puede tener en pacientes con CBNM, los resultados son controvertidos. Un metaanálisis antiguo encuentra que es un factor importante de mal pronóstico en adenocarcinomas resecaos (303). Sin embargo, y también en estadios precoces, Dworakowska no encuentra diferencias en la supervivencia (304). Tampoco la serie reciente del European Early Lung Cancer (EUELC) biobank relaciona la expresión de p53 medida por IHQ con el pronóstico (305). Landreneau encuentra que el pronóstico en pacientes con expresión de p53 es peor, sobre todo cuando sea asociada a expresión de HER-2/neu que después nosotros analizamos (306). Y por el contrario, Lee describe una menor supervivencia entre pacientes con menor expresión de p53, especialmente en adenocarcinomas. Bien es verdad que dos tercios de su serie son pacientes en estadio III (307).

En nuestra serie, y dada la importancia de esta proteína, establecimos dos criterios de positividad:

Criterio 1. Positiva con inmunorreactividad en más del 25 % de las células. Con este criterio el 41,9 % de las muestras presentaban expresión de p53. No había diferencias en función del tipo histológico ni del grado de diferenciación. Las curvas de supervivencia, tanto global como libre de enfermedad, eran prácticamente superponibles.

Criterio 2. Positiva con inmunorreactividad en más del 10 % de las células. Con este segundo criterio, un 54,4% de las muestras eran positivas. Tampoco hubo diferencias por tipo histológico y grado de diferenciación. De nuevo las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad fueron parejas.

Proteína cdk1

Hace tan solo un año, el departamento de Biología Tumoral del Hospital Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute de Tampa, en el estado norteamericano de Florida, publicaba el hallazgo de una firma génica desarrollada con la expresión de una batería de cinco genes en líneas celulares de CBNM capaces de definir un patrón pronóstico. Se trata de genes implicados en la condensación y traslocación cromosómica (TOP2A, AURKB, BRRNA, CDK1 y FUS). La sobreexpresión de los cuatro primeros unida a la disminución en la misma del gen FUS, configuraba un subgrupo de pacientes con adenocarcinomas de peor pronóstico (183). Cuando hici-

mos la selección de proteínas para nuestro estudio, los cuatro genes restantes de la citada publicación aún no se habían relacionado desde el punto de vista pronóstico con el CBNM. La expresión de esta proteína, y de forma específica su presencia en el citoplasma de la célula tumoral, se ha relacionado también en los últimos años con fenómenos de quimio-resistencia (184).

En nuestro estudio se utilizó como criterio de positividad la inmunorreactividad en más del 5 % de las células. Así, el 24,4 % de las muestras fueron positivas. No hubo diferencias en función del tipo histológico ni el grado de diferenciación. Y la expresión de *cdk1* no se asoció a cambios en el pronóstico, ni como supervivencia global ni libre de enfermedad ($p = 0,92$ y $p = 0,77$, respectivamente).

Proteína *cdk2*

Es otra quinasa dependiente de ciclina, en este caso ligando de la ciclina E en una unión regulada por los inhibidores *p27* y *p21*. Se ha descrito que la expresión de *cdk2* es mayor en tumores de estirpe distinta al adenocarcinoma. Para Dobashi, en su serie de 190 casos de CBNM, el comportamiento de *cdk2* depende de la ciclina a la cual se una.

Cdk2 es el ligando natural tanto de la ciclina A, que ya hemos analizado, como de la ciclina E. Dobashi encuentra que la unión a ciclina A le confiere una gran capacidad catalítica, de modo que el complejo *cdk2/ciclina A* dispara de alguna manera el punto crítico del ciclo celular que ocurre entre las fases G1 y S, de modo que favorece la replicación de la célula, su posible escape a otros mecanismos de control y por ende un mayor potencial explicativo del tumor. Sin embargo, la unión a ciclina E da lugar a un complejo *cdk2/ciclina E* que el autor considera como formas inactivas de la enzima, asociadas por tanto a células en fase de senescencia y por tanto a tumores de menor potencial de replicación y mejor pronóstico (240).

Desde el punto de vista farmacológico, un estudio reciente en líneas celulares de CBNM ha encontrado que el complejo que forman ciclina A y *cdk2* media el potencial inductor de apoptosis y muerte celular del pemetrexed (300).

Comparado con un análisis tan en profundidad, parece que la simple determinación por inmunohistoquímica de proteínas tan complejas en su funcionamiento puede resultar bastante imprecisa. Sin embargo, hemos de insistir en que uno de los objetivos de este estudio es proporcionar un método de valoración pronóstica de nuestros pacientes que sea sencillo, reproducible y de fácil validación y aplicación en la clínica, más allá de profundizar en el complejo entramado en que todas estas proteínas se imbrican.

En nuestra serie la determinación de la expresión de *cdk2* no resultó pronóstica. Tampoco encontramos diferencias en la expresión en función del tipo histológico y el grado de diferenciación.

No hemos estudiado de forma específica el papel que la expresión aumentada del complejo *cdk2/ciclina A* o *cdk2/ciclina E* puede desempeñar. Para Volm, la combinación *cdk2* y ciclina A en su estudio de análisis inmunohistoquímico, ofreció el mayor potencial pronóstico de entre las ocho variables que investigó, dos clínicas (afectación ganglionar y estadio) y seis proteicas (ciclina D1, *cdk4*, *pRb* y *E2F1*, además de las dos citadas) (182).

Dada la contundencia que estudios tan serios como el de Volm ofrecía, analizamos el papel que *cdk2* podía te-

ner en nuestra serie considerando como positivo cualquier grado de inmunorreactividad, es decir, que con la aparición de la proteína expresada en una única célula del corte del tumor examinado, se considerase positiva su expresión. De este modo, el 41,9 % de los tumores presentaron algún grado de expresión de cdk2. Aún así no hubo ningún hallazgo estadístico que pudiera confirmar lo descrito por el estudio que hemos comentado.

Definitivamente, en nuestra serie cdk2 no actuaba como factor pronóstico.

Proteína ciclina E

Ya hemos visto que se trata de una proteína tremendamente relacionada con las anteriores, especialmente con ciclina A y con cdk2.

El complejo cdk2/ciclina E, que para Dobashi representa la forma inactiva de la quinasa, y por tanto, potencialmente asociada a tumores de mejor pronóstico, ha sido más analizado en la literatura. De hecho, la ciclina E, ha resultado pronóstica en distintos estudios.

En 2001, Müller-Tidow, de la Universidad de Munster, en Alemania, junto con colaboradores de la Universidad de Colonia y de la Universidad de California, publicaban un estudio con el contundente título de “La Ciclina E es la única ciclina asociada a cdk2 que predice metástasis y supervivencia en estadios precoces de CBNM” (185). En efecto, en una serie de 70 muestras de tumores en estadios I a IIIA completamente reseados, encuentra que, especialmente en estadios I y II, la expresión a nivel génico (que a posteriori confirma a nivel proteico por IHQ, con una buena correlación) de ciclina E se asocia a un peor pronóstico ($p < 0,03$) y a mayor probabilidad de desarrollar metástasis ($p < 0,01$).

Un año antes, Fukuse también publicaba resultados similares en una serie quirúrgica que incluía los mismos estadios, aunque en este caso con un tamaño muestral mayor ($N = 242$). Describió la resección completa, el estadio y la sobreexpresión de ciclina E como factores pronósticos independientes (308). Incluso sugiere que se deberían desarrollar fármacos dirigidos contra esta proteína o su entorno biomolecular.

El inicio de siglo fue muy prolijo en lo que se refiere al estudio de esta proteína en cáncer de pulmón. Prometía dar mucha información y permitir algún tipo de aplicabilidad en la clínica. Otro estudio, en este caso japonés, con 217 CBNM en estadios precoces reseados, encontraba también que la sobreexpresión de ciclina E asociaba un peor pronóstico ($HR = 2,09$; $p = 0,03$). Asimismo lo asociaba a valores más altos de ki-67, es decir, a tumores con mayor proliferación y más invasivos (309).

Este optimismo llevó a una interesante revisión realizada en 2003 por los oncólogos de la Universidad de Munster, en Alemania, que versaba sobre el papel pronóstico de las ciclinas A y E en el cáncer. No lo hacía específicamente para el cáncer de pulmón, ya que los hallazgos para este tipo de tumor se habían repetido en años precedentes para neoplasias de otro origen como mama, colorrectal, cabeza y cuello y próstata (310). De los ocho estudios que incluyeron en su revisión y que habían analizado el papel de la expresión de ciclina E en el pronóstico del CBNM, en 7 de ellos la expresión de ciclina E asoció un peor pronóstico. Varias series pasaban de los 200 casos.

Con estos antecedentes, distintos equipos de investigadores trataron de encontrar la posible aplicación trasla-

cional de la determinación y en su caso potencial actuación sobre la ciclina E. Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado esta posible relevancia clínica.

Pese a que en alguna serie posterior, aunque con pocos pacientes, no se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de ciclina E y el pronóstico de los mismos (302), su interés sigue vigente, como lo demuestra el metaanálisis que se publica en 2012 (311). Hasta ese momento se incluyen catorce estudios (tabla 52). Todos son de análisis de expresión proteica por inmunohistoquímica. En todos excepto en uno (el mismo que la revisión antes citada encontraba como único discordante) la tendencia es a un peor pronóstico en pacientes con sobreexpresión de la proteína. Sin embargo, solo en cinco de ellos las diferencias fueron significativas. A pesar de ello, la potencia de estos cinco estudios pesó en el resultado del metaanálisis, que ofreció un Hazard Ratio de 1,38 (1,07 – 1,79). Por tipo histológico, sin embargo, las diferencias dejan de ser significativas cuando se analizan los estudios que se centran en carcinomas epidermoides. La conclusión del metaanálisis insta a diseñar estudios prospectivos experimentales que permitan validar estos hallazgos.

Desde la publicación de este metaanálisis no se ha publicado nada más en relación al papel de la ciclina E en cáncer de pulmón.

En nuestra serie, los resultados siguen la línea que hemos estado describiendo.

Así, considerando positivas las muestras con inmunorreactividad para ciclina E en más del 5 % de las células (lo que supone un 25,6 % de los tumores), vemos en primer lugar que el grado de expresión fue similar para escomoso y adenocarcinoma.

Las curvas de supervivencia global son claramente diferentes. La ciclina E se comportó como factor pronóstico en el estudio univariante, con una probabilidad de supervivencia a uno, tres y cinco años del 92,4 %, 75,4 % y 61,5 % respectivamente para pacientes con expresión de ciclina E negativa. Esta supervivencia pasó a 95 %, 40,5% y 32,7 % en los pacientes en quienes la expresión fue positiva. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$). La gran caída en la supervivencia se produjo entre el segundo y tercer años.

El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox mostró un Hazard Ratio para expresión positiva de la proteína ciclina E de 2,22, con un intervalo de confianza al 95 % de entre 1,39 y 3,54. Son valores superponibles a algunos de los estudios realizados en la última década y que Huang incluye en su metaanálisis.

Respecto a la supervivencia libre de recidiva, también hubo una clara diferencia a la hora de analizar las curvas con el método de Kaplan y Meier. De nuevo se produce una importante caída en la supervivencia durante los primeros 12 a 36 meses, para luego estabilizarse. El Hazard Ratio en este caso de de 2,19, con un intervalo de confianza al 95 % entre 1,39 y 2,46.

Es decir, que en nuestra serie, la expresión de ciclina E en más del 5 % de las células de la muestra se asoció a una recidiva más precoz y a una supervivencia global peor, con un pico de aparición del evento terminal (fuera recidiva o fallecimiento) entre los 24 y los 36 meses. Parece que se trata de un factor pronóstico que podría tener aplicación en la clínica.

Podría justificar, por una parte la intensificación del seguimiento durante dicho período, y por otro lado, la administración de algún tipo de tratamiento adyuvante en pacientes, que, aun con factores clínicos, quirúrgicos y de

estadificación habitual, favorables, presentaran una sobreexpresión de esta proteína.

Tabla 52: Estudios incluidos en el metaanálisis de Huang, publicado en 2012, acerca del valor pronóstico de la ciclina E en la supervivencia del CBNM. Tomada de (311)

Autor	Año publicación	Hazard Ratio	IC 95%	% del peso en el metanálisis
Mishina T	2000	1,85	1,14-2,29	10,29
Fukuse	2000	1,92	1,19-3,11	10,32
Anton R	2000	0,84	0,39-1,77	6,63
Muller-Tidow C	2001	1,57	0,65-3,79	5,46
Dasaka-Akita H	2001	2,09	1,09-4,13	7,49
Hayashi H	2001	1,30	0,60-6,79	6,49
Takahashi S	2002	2,01	0,60-2,80	3,41
Yoo JY	2007	0,89	0,52-1,54	9,35
Kosacka	2009	1,63	0,66-4,02	5,28
Gao AF	2001	2,51	1,28-3,47	10,03
Shou YN	2007	2,13	1,35-3,45	10,51
Filipits M	2007	1,01	0,81-1,25	14,74
Global		1,53	1,19-1,97	100

Asimismo, parece razonable, dados los hallazgos encontrados, no solo en nuestra serie, sino en la literatura en los últimos años, continuar desarrollando líneas de investigación en torno al *pathway* que involucra a esta forma de regulación del ciclo celular (complejos ciclinas/cdks), buscando posibles dianas terapéuticas en puntos de control en los que sabemos que tiene un papel importante la ciclina E, por cuanto parece que su actividad tiene mucho que ver con la invasividad y agresividad del tumor.

En lo que respecta a nuestra serie, parece necesario validar los resultados a ser posible con una serie de mayor tamaño muestral pero que conserve las características y homogeneidad de la que aquí estamos presentando. A este respecto es importante señalar que los estudios incluidos en el metaanálisis de Huang y que de algún modo corroboran los hallazgos de nuestra series en relación con esta proteína, son bastante heterogéneos en cuanto al punto de corte de inmunorreactividad de la proteína utilizado para considerarla positiva, estadios (la mayoría incluyen estadio III), tipo histológico y tamaño muestral (tabla 53).

En nuestra serie, para intentar detectar posibles factores de confusión, analizamos la expresión de ciclina E en función de otras variables clínicas, como fueron el género, la edad, la afectación ganglionar N1 y el estadio TNM. En ningún caso encontramos diferencias en la expresión de ciclina E en función de estos parámetros.

Tabla 53: Características de los estudios incluidos en el metaanálisis de Huang, publicado en 2012, acerca del valor pronóstico de la ciclina E en la supervivencia del CBNM. Tomada de (311)

Autor	Año	Tamaño muestral	Punto de corte	Estadio	Tipo histológico
Mishina T	2000	217	No especificado	I-IIIIB	Epi: 92, AD: 107, Otros: 18
Dobashi Y	1998	190	5 %	No especificado	Epi: 55, AD: 58, MC: 36 ICG: 41
Fukuse	2000	242	20 %	I-III A	Epi: 85, AD: 148, Otros: 6
Anton R	2000	83	50 %	I-II	Epi
Muller-Tidow C	2001	70	No especificado	I-III A	Epi: 34, AD: 26, ICG: 10
Dosaka-Akita H	2001	214	30 %	I-III B	Epi: 92, AD: 107, Otros: 18
Hayashi H	2001	98	5 %	No especificado	AD
Takahashi S	2002	62	5 %	No especificado	Epi: 26, AD: 36
Dobashi Y	2003	144	5 %	I-III A	Epi: 59, AD: 56, ICG: 29
Yoo JY	2007	219	30 %	I-III	Epi: 100, AD: 119
Kosacka	2009	71	No especificado	I-III A	Epi: 43, AD: 17, Otros: 11
Gao AF	2001	86	No especificado	No especificado	Epi: 54, AD: 32
Shou YN	2007	132	10 %	I-IV	Epi: 38, AD: 86, Otros: 8
Filipits M	2007	778	No especificado	I-III	Epi: 432, AD: 249, Otros: 97

Epi: Epidermoide, AD: Adenocarcinoma, MC: Microcítico, ICG: Indiferenciado de células grandes.

Proteína p16

Ya hemos visto que se trata de una proteína supresora del ciclo celular. Bloquea el punto de control crítico del paso de las fases G1 a S por medio de la inhibición del complejo cdk4/6. La inhibición de esta proteína llevaría a una pérdida de control del ciclo celular, con una proliferación celular acelerada y, por tanto, hipotéticamente, una mayor agresividad tumoral.

En los últimos años hemos visto cómo una de las formas más importantes de inactivación de p16 es por medio de la metilación de su promotor. El papel que esta metilación, con la consiguiente inhibición de p16, puede tener sobre la supervivencia en el CBNM no está claro. En este sentido, a principios de 2013, el Departamento de Cirugía Torácica del Hospital Universitario de Nanjing, en China, publicó una revisión sistemática y metaanálisis bastante representativo de todo lo estudiado hasta la fecha en relación a este evento epigenético sobre el promotor de p16 (312). Incluye un total de 18 estudios, que a su vez combinan diferentes estadios, en la mayoría de los casos I a III o incluso a IV. La conclusión de la revisión es que la metilación del promotor de p16 se comporta como factor independiente de mal pronóstico, tanto para supervivencia global (Hazard Ratio = 1,36) como libre de recidiva (Hazard Ratio = 1,68). Pero estamos analizando expresión proteica detectada por IHQ. Aquí, aunque hay variabilidad en los distintos estudios realizados, la tendencia es la detección de que una pérdida en su expresión es factor de mal pronóstico, lo cual parece correlacionarse con cualquier alteración epigenética que hiciera que la proteína no se sintetizase en concentraciones normales, como podía ser el fenómeno descrito de la

metilación de su promotor (313). Un metaanálisis publicado en 2011 y que incluye 20 estudios desde 1995, confirma que la expresión aumentada de p16 funcionó como factor de buen pronóstico (desde el punto de vista estadístico, factor protector) en CBNM, especialmente en epidermoides, e incluyendo diferentes estadios (186). Como ejemplo, y aunque se trata de una publicación antigua, en estadios precoces el estudio combinado de las proteínas p16 y ciclina D1 resultó dar información pronóstica importante, resultando más favorable la evolución de los pacientes con p16 expresado y ciclina D1 no expresada (314).

En nuestra serie la expresión de p16 no difirió en función del tipo histológico y el grado de diferenciación. Consideramos positiva la expresión cuando la inmunorreactividad fue detectada en más del 10 % de las células de la muestra. Con este criterio, p16 se expresó en un 33,1 % de los pacientes.

No encontramos diferencias en la supervivencia global ni libre de enfermedad ni al comparar las curvas con el test de log-rank ni al hacer un estudio de riesgos proporcionales de Cox.

Las diferencias que pueden existir entre el nivel proteómico, es decir, el análisis de la expresión proteica por IHQ y las alteraciones a nivel epigenético pueden ser importantes. En ocasiones no es tanto la diferencia en la expresión de la proteína como la posible disfunción de la misma. Esto es importante en la regulación del ciclo celular, muy complejo y sometido a controles de unas proteínas sobre otras y en las que a veces la expresión proteica no significa la normofunción de la misma. En cualquier caso, buscamos factores pronósticos biomoleculares fáciles de identificar y con una perspectiva traslacional. Repetimos con insistencia esta declaración de intenciones, pero es fácil al reflexionar sobre distintos aspectos de los resultados obtenidos, caer en la trampa de intentar descifrar a partir de una curva de supervivencia el complejo entramado de información biomolecular que manejamos al estudiar las células neoplásicas, lo cual lleva con frecuencia a grandes divagaciones si no se concreta inicialmente de forma adecuada qué es lo que se desea analizar y con qué fin.

Proteína p27

Se trata de una proteína de la familia de los inhibidores de las cdks. En condiciones normales se expresa en altas concentraciones en las fases G0 y G1 del ciclo celular, para disminuir cuando la célula comienza a dividirse y el ciclo comienza a progresar. De modo que controla la replicación de la célula. Se le ha atribuido la capacidad de inducir la apoptosis celular. También se ha relacionado con mecanismos de quimio-resistencia. De hecho, en los pacientes del Ensayo Internacional de Adyuvancia en Cáncer de Pulmón (IALT), su sobreexpresión se ha asociado a una menor respuesta a tratamiento quimioterápico, hasta el punto de que solo se beneficiaron de adyuvancia tras resección quirúrgica los pacientes tratados con p27 negativo (315). Su ausencia en animales de experimentación parece aumentar su susceptibilidad al desarrollo de neoplasias, lo que le ha valido la condición de proteína supresora de tumores.

En diferentes neoplasias, su disminución se ha asociado a un peor pronóstico. En el caso del CBNM los resultados son dispares. Sin embargo, un metaanálisis junto con la revisión sistemática de lo publicado al respecto hasta el año 2011, ha confirmado que se trata de una proteína cuya sobreexpresión confiere un mejor pronóstico a pacientes con CBNM, si bien la mayoría de estudios incluyen pacientes del este asiático (316). Incluye once publi-

caciones de entre 1997 y 2010, bastante heterogéneos. Encuentra un Hazard Ratio para el metaanálisis de dichos estudios de 1,55 (IC al 95 %: 1,09 – 2,21). Los puntos de corte de inmunorreactividad para el estudio de IHQ varían del 5 % al 50 %. Solo un estudio incluye en exclusiva pacientes en estadio I (317). En este caso la tendencia de la expresión de p27 (en este caso con un punto de corte del 30 %) también es a funcionar como factor de buen pronóstico, si bien de forma no significativa.

De entre los estudios que en su momento nos llevaron a incluir esta proteína en nuestro proyecto destacó el de Tsukamoto, publicado en Lung Cancer en 2001 (318). Estudia la expresión por IHQ en pacientes completamente reseados. No define la positividad de un modo semicuantitativo, sino que compara la inmunorreactividad del núcleo de la célula tumoral en relación con la normal en linfocitos normales. Encuentra una supervivencia a cinco años del 35,4 % en el grupo con expresión reducida de p27, claramente menor que el 63,2 % que alcanza el subgrupo de alta expresión de esta proteína.

En nuestra serie, dada la heterogeneidad encontrada en la literatura, analizamos la expresión de p27 por triplicado, con distintos puntos de corte de inmunorreactividad: > 0 %, > 5 %, > 20 %. El porcentaje de muestras que según los diferentes criterios fueron positivas fue del 28,1 %, 22,6 % y 12,5 %, respectivamente. En ningún caso vimos diferente expresión en función del tipo histológico ni el grado de diferenciación.

En la actualidad sabemos que las alteraciones que vemos en la expresión de p27 (hasta en el 30 % de los CBNM aparece una pérdida de dicha expresión) tienen su origen a nivel epigenético. Su regulación depende de una fosforilación traslacional y su degradación por la vía ubiquitina/proteasoma 26. Conceptos que superan las intenciones de nuestro proyecto, pero que pueden explicar distintos comportamientos de tumores a priori semejantes en relación a la expresión de proteínas como p27 (como ella muchas otras) y su posible relación traslacional con el comportamiento y la historia natural de los tumores pulmonares (319). Quizá la epigenética pueda explicar las diferencias encontradas al estudiar perfiles de expresión proteica. Aunque hay que señalar que el principal factor de confusión es la heterogeneidad de las series en que se estudian dichos perfiles, y que en el CBNM suelen englobar, como estamos viendo hasta el momento, estadios muy dispares incluso con tratamientos muy variados. Volvemos a insistir en el esfuerzo realizado al diseñar nuestra serie para intentar mantener la mayor homogeneidad posible y minimizar así este tipo de sesgos. Solo el tiempo y la validación en series más grandes confirmarán si lo hemos hecho correctamente.

Proteína supresora del retinoblastoma (pRB)

Se trata de una de las proteínas más trascendentales en la regulación del ciclo celular, por cuanto participa en el paso limitante o punto de control del mismo. En una célula en situación de reposo o estabilidad permanece unida a la proteína E2F1, un factor de transcripción capaz de activar toda la cascada del ciclo celular (figura 64). La unión a dicho factor la mantiene inactiva. La fosforilación de pRb conlleva un cambio conformacional que la libera de E2F1, permitiendo que se active de forma irremediable la replicación celular, pasando de la fase G1 a la fase S. En el cáncer de pulmón son muy frecuentes las alteraciones de pRb, bien a nivel de codificación de la proteína, sobre todo en el carcinoma microcítico, bien por trastornos relacionados con la fosforilación de la proteína, más

típico del CBNM. Algunos autores han relacionado la disminución en la expresión de pRb con un peor pronóstico en pacientes con CBNM reseca (192), aunque los hallazgos una vez más son dispares. También aparece implicada en fenómenos de quimio-resistencia. Se ha correlacionado con p53 a la hora de establecer patrones pronósticos, sin resultados claros al respecto.

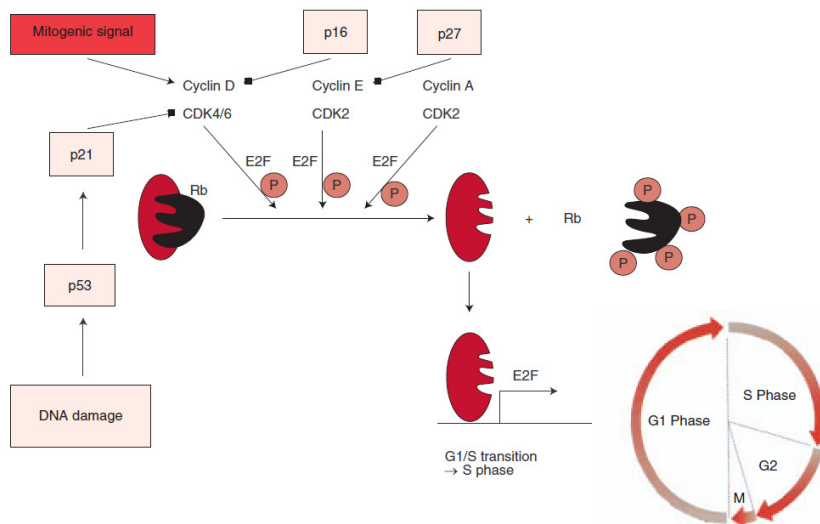
En nuestra serie establecimos como criterio para considerar positiva la expresión de pRb una inmunoreactividad superior al 10 %. Con este criterio la proteína se expresó en un 30,6 % de las muestras. En este caso el concepto es diferente a las proteínas con supuesto potencial oncogénico o de invasividad tumoral, ya que la expresión de la proteína sería en teoría señal de buen control del ciclo celular. La alteración en la expresión de pRb, que en nuestra serie aparece en el 69,4 % de los tumores analizados, coincide con la literatura, en el sentido de que alrededor de dos tercios de los casos de CBNM presentan alteraciones a nivel de esta vía oncogénica.

La expresión de la proteína fue mayor en tumores escamosos que en adenocarcinomas. O, dicho de otro modo, las alteraciones en su expresión fueron mayores en los adenocarcinomas. Este dato coincide con la literatura (320).

No encontramos diferencias en la supervivencia global ni libre de enfermedad en los pacientes de nuestro estudio en función de la expresión de esta proteína. Tampoco estratificando por tipo histológico.

Una vez más el complejo entramado que establecen las proteínas implicadas en el ciclo celular probablemente hace que la cuantificación aislada por IHQ de una de ellas no tenga el peso suficiente para definir grupos de pacientes con distinto pronóstico susceptibles de ser tratados o vigilados de una manera especial, que es lo que perseguimos en nuestro proyecto entre pacientes con CBNM en estadios precoces reseca.

Figura 64: Regulación de la activación del ciclo celular por la vía de pRb. Tomada de (310)



Proteína mdm2

Mdm2 es un inhibidor natural de p53 (vía bloqueo o vía destrucción por ubiquitinación). Cabe pensar pues que su acción, inhibiendo a una proteína supresora del ciclo celular, sería la de favorecer la replicación de la célula y

por tanto favorecería el crecimiento y la agresividad de un tumor. Hay pocos estudios que analicen la expresión de mdm2 con resultados significativos. La mayoría no le dan un papel relevante como condicionante del pronóstico en pacientes resecaos. Tanto es así que, en contra de lo que podría pensarse, la expresión de esta proteína se comportó en varios estudios como factor de buen pronóstico (193). Sí parece que la expresión es mayor en estadios avanzados, pero no está claro si en estadios precoces puede influir en el pronóstico (321). Sí ha demostrado comportarse como factor de mal pronóstico su amplificación génica, estudiada por PCR (322).

En nuestra serie pocos tumores expresaron mdm2. Considerando positivas aquellas muestras con detección en más del 10 % de las células, solo un 8,8 % de la serie lo fue. Una vez más no hubo diferencias por tipo histológico y grado de diferenciación. Tampoco aparecieron variaciones en la supervivencia global o libre de enfermedad determinadas por la expresión de la proteína. Coinciden estos hallazgos con la mayoría de estudios de la literatura al respecto que no encuentran la expresión de mdm2 como factor pronóstico, aunque sí aparece relacionado con otras proteínas reguladores del ciclo celular y podría tener importancia a nivel epigenético o de respuesta a fármacos.

3-4.2.b. Receptores de membrana

Como hemos comentado en la introducción, la función de la célula está controlada en gran medida por las señales que recibe de su entorno. Estas señales, en forma de hormonas, factores de crecimiento, enzimas, etc., provocan cambios bioquímicos en su membrana y su citoplasma, que van a terminar en la mayoría de los casos en acciones sobre el núcleo, y más concretamente sobre el genoma de la célula, nivel en el cual se gestará la respuesta final de la misma a la señal que recibió.

Los factores que interaccionan con las células lo hacen a través de receptores de membrana. La mayoría de ellos son receptores proteicos transmembrana, con un dominio extracelular, otro propiamente a través de la membrana y un tercero a nivel intracelular. La interacción extracelular de cualquiera de estos factores induce cambios en la conformación intracelular de los receptores que desencadenan una respuesta en cascada por todo el citoplasma hasta llegar al núcleo. La expresión patológica de genes con un papel crítico en estas vías de señalización puede contribuir a la alteración del crecimiento celular que a su vez se asocia con el desarrollo de un cáncer. Asimismo, alteraciones en esos receptores de membrana pueden provocar un descontrol en información que la célula recibe, con consecuencias potencialmente lesivas para su entorno. Los receptores más estudiados en oncología y que han demostrado hasta el momento una implicación fundamental en el desarrollo del cáncer constituyen la familia de señalización ErbB. Como la mayoría de receptores de este tipo, cuentan con un dominio intracelular de tipo tirosín quinasa que activa la cascada de reacciones moleculares intracelulares que desembocarán en una activación de la replicación y crecimientos celulares. De este modo, la mayoría de miembros de la familia de receptores ErbB se comportan como oncogenes cuando están sobreexpresados o mutados. Entre ellos, el más significativo en la actualidad, sobre todo por la implicación que en la clínica tienen sus alteraciones, es el EGFR.

Proteína EGFR (receptor ErbB-1)

El receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) se detecta por IHQ en un 40 % a 80 % de los CBNM. La desregulación de la señal ErbB-1 se ha implicado en el desarrollo o progresión de diferentes tipos de tumores. Parece que la simple existencia de un receptor activado no es suficiente para la transformación celular, y que sería necesaria la presencia del ligando para desencadenar la señal proliferativa. En varios tumores se ha observado un incremento de producción de ligandos para ErbB-1 asociado a la sobreexpresión del receptor. Algunos de estos ligandos son el Factor de Crecimiento Epidérmico, la anfiregulina y el Factor de Crecimiento Tumoral alfa (TGF- α), entre otros.

En hasta un 17 % - 18 % de los CBNM aparecen pequeñas mutaciones o deleciones en el dominio tirosín quinasa del EGFR. Su presencia se ha asociado a una respuesta en ocasiones espectacular a inhibidores selectivos de dicho dominio, los llamados agentes anti-EGFR o anti tirosín quinasa (TKI). La sobreexpresión del receptor desde el punto de vista inmunohistoquímico no ha demostrado una clara influencia directa en el pronóstico (como sí lo ha hecho en otros tumores). Sin embargo, es uno de los factores más estudiados al respecto.

Llama la atención cómo al realizar búsquedas bibliográficas que relacionen las proteínas que estamos aquí analizando con el pronóstico en el cáncer de pulmón, la mayoría de dichas proteínas dan lugar a entre 150 y 200 resultados en forma de publicaciones científicas. Sin embargo, cuando se trata del EGFR, el número de estudios que devuelven los buscadores digitales médicos habituales supera los 1600.

La causa de tal prolífica investigación en lo referente a esta proteína es esa aplicación que ya en la clínica tiene desde hace años la detección de dichas alteraciones genéticas en su genoma. Las mutaciones son más frecuentes en adenocarcinomas de mujeres no fumadores de raza asiática. Parece que en ellas el crecimiento de este tipo de tumores (de forma especial los antes llamados bronquioloalveolares) depende directamente de la activación de esta vía del EGFR. Las mutaciones relacionadas con una mayor respuesta a los TKI se localizan en los cuatro primeros exones del gen. Se han descritos tres tipos, en orden de frecuencia de aparición: la deleción del exón 19, la mutación antisentido (missense) del exón 21 (L858R) y casos de mutaciones puntuales de los exones 18, 20 y 21, así como duplicaciones o inserciones del exón 20. La presencia de mutaciones de EGFR en aquellos pacientes que inicialmente responden a TKI se ha asociado a una mejor supervivencia (198).

La relación entre los grados de expresión de EGFR y el pronóstico no está clara. En algunos estudios la sobreexpresión del receptor se asocia a peor pronóstico (323). Incluso su detección o no como proteína soluble en sangre se ha relacionado con la evolución de los pacientes (324). Sin embargo, no hay datos fidedignos como para utilizar estos hallazgos en la clínica, ya que en otras series no existe este comportamiento. Para otros autores es necesaria la sobreexpresión de ErbB-2 para que el EGFR se comporte como factor pronóstico.

En nuestra serie debemos recordar que hemos analizado expresión proteica por IHQ; no hemos investigado las alteraciones en la codificación del receptor a nivel genético. No está claro hasta qué punto esas alteraciones genéticas influyen en la detección por IHQ del receptor. Conceptualmente los datos que podemos obtener de la valoración de la expresión proteica pueden no estar en correlación con la realidad del receptor a nivel de DNA. Sin embargo, investigadores del Departamento de Anatomía Patológica del Mount Sinai School of Medicine de Nue-

va York sí encuentran esta relación que podría permitir ahorrar costes en lo que a detección de mutaciones se refiere, ya que parece ser que hay una buena correlación con la IHQ (325).

Dicho esto, nuestra serie no mostró la expresión del EGFR como factor pronóstico. Llama la atención que casi un 60 % de las muestras presentó inmunorreactividad para esta proteína en la IHQ en menos del 1 % de las células, criterio que se consideró negativo, siendo el resto de muestras positivas. Con esta clasificación, el 40,6 % de las muestras fueron positivas.

Encontramos asimismo que la expresión de EGFR fue positiva de forma mucho más significativa en los carcinomas escamosos que en los adenocarcinomas ($p < 0,01$). Este dato coincide con series destacadas de la literatura al respecto (326). No hubo diferencias, sin embargo, en el grado de diferenciación.

En relación al pronóstico, tanto las curvas de supervivencia global como libre de enfermedad discurren prácticamente superpuestas. Sí es cierto que cuando estratificamos por tipo histológico, la tendencia es a un mejor pronóstico en los epidermoides con sobreexpresión de EGFR, y sin embargo, a la inversa en los adenocarcinomas, donde la disminución en su inmunorreactividad es lo que se relaciona con una mejor evolución. No son diferencias significativas, pero las tendencias son llamativas. No hay que olvidar que hablamos de estadios precoces. En ningún caso han sido pacientes tratados con quimioterapia a lo largo de toda la historia natural de su enfermedad. Y el pronóstico en las alteraciones genéticas del EGFR viene dado en estadios avanzados ya en los últimos años por la buena respuesta al tratamiento con TKIs. Aún así, cabe pensar que no está todo descrito en relación al papel de la IHQ en la cuantificación de la expresión de EGFR y su potencial papel pronóstico, posiblemente en subtipos histológicos determinados y en contextos concretos aún por definir.

Merece la pena no dejar de lado la proteómica en el estudio de este receptor de membrana y tratar de desarrollar series con la misma homogeneidad, pero a ser posible de un tamaño muestras mayor que la de nuestro estudio.

Proteína receptor ErB-2

Tiene varias denominaciones, que a menudo parecen proteínas diferentes: ErB-2, HER2/neu, CD340 o p185. En realidad podemos considerar que el proto-oncogén ErB-2 codifica la proteína de membrana p185. Pero podemos encontrar las nomenclaturas utilizadas de forma variada en la literatura.

Codificada en el brazo largo del cromosoma 17, se trata de una proteína con actividad tirosín quinasa de su dominio citosólico, como hemos dicho, y receptora natural de diferentes factores de crecimiento como el EGFR o Erb-1. Ha sido muy estudiado en cáncer de mama, donde aparece sobreexpresado con frecuencia. Incluso se ha podido desarrollar un fármaco que se une selectivamente al receptor, el trastuzumab.

La amplificación del gen de c-Erb-2 da lugar a una sobreexpresión de su proteína p185, lo que favorece de algún modo la activación de la replicación celular. Esta sobreexpresión aparece en un 20 % - 30 % de los CBNM, especialmente en los adenocarcinomas. Meert y su equipo del Laboratorio de Investigación Clínica y Oncología Experimental del *Institut Jules Bordet* de Bruselas, realizaron una revisión sistemática y metaanálisis del papel que la sobreexpresión de p185 había demostrado en el pronóstico de pacientes con CBNM. Hasta ese momento la mayoría de las series, de nuevo con resultados dispares, eran bastante limitadas en cuanto a tamaño muestral. Sin

embargo, para el metaanálisis reúnen más de 4500 pacientes de un total de 30 estudios. Se trata de estudios muy dispares. La mayoría no diferencian entre tipos histológicos (escamosos vs adenocarcinomas, e incluso un estudio de microcíticos) e incluyen estadios de I a III o incluso IV. La gran mayoría utilizan la IHQ para la detección de la expresión de la proteína y en la gran mayoría de casos también se trata de muestras quirúrgicas.

Finalmente incluyen 21 estudios, más o menos repartidos al 50 % en cuanto a sus resultados de p185 como factor pronóstico (327). En ningún caso, eso sí, la expresión de la proteína se asoció a un mejor pronóstico. Es decir, aun en casos en que no fue significativa la diferencia, la tendencia fue que la sobreexpresión del receptor se asociaba a una peor supervivencia de los pacientes. Encuentran un factor de heterogeneidad significativo ($p = 0,001$). El resultado del metaanálisis es que la sobreexpresión de p185 (proteína de c-Erb-2) se asoció a un peor pronóstico con un Hazard Ratio de 1,55 (IC 95 %: 1,29 – 1,86). Cuando se analizan los 17 estudios que utilizan la IHQ como método de detección de dicha expresión, las diferencias continúan siendo significativas, con un Hazard Ratio de 1,59 (IC 95 %: 1,23 – 2,04). Pese a los sesgos que los autores analizan en los estudios incluidos, las conclusiones del metaanálisis resultan muy interesantes de cara a incluir esta proteína en todo estudio que analice proteómica y factores pronósticos en CBNM, como nosotros hicimos.

Efectivamente se trata de una publicación antigua. En los últimos años, los resultados no han variado mucho. Destacan los hallazgos de Takenaka, que presenta 236 casos de CBNM reseca de forma consecutiva. El análisis por IHQ de la expresión de p185 concluyó que su positividad (por encima del 30 % de células inmunorreactivas) se asoció a peor pronóstico de forma significativa, con una supervivencia global a 5 años por encima del 75 % entre los casos con inmunorreactividad en menos del 30 % de las células, y apenas un 20 % para tumores con mayor expresión (328). Sin embargo, los casos con ese grado de expresión de p185 son pocos, por lo que instan a desarrollar series mayores.

Por su parte, desde la Universidad noruega de Tromsø, analizan la expresión de EGFR y p185 tanto a nivel proteómico por IHQ como genómico por hibridación in situ. Si bien encuentran que la amplificación genómica de c-Erb-2 se asocia a un peor pronóstico entre mujeres con CBNM, hacemos referencia aquí a este estudio porque concluyen que la IHQ no se correlaciona bien con los hallazgos a nivel de amplificación genética (328).

Recientemente Xhuan y sus colaboradores presentan una serie bastante parecida a la nuestra, con 177 pacientes en estadio I en quienes la detección de p185 por IHQ muestra que su sobreexpresión se asoció a un peor pronóstico ($p = 0,014$). Encuentra asimismo una mayor expresión en adenocarcinomas que en epidermoides (329).

Los resultados de nuestra serie van en consonancia con lo que hemos reseñado de la literatura al respecto de c-Erb-2. Nos llamó la atención que la expresión de la proteína ocurrió en pocos casos: con un criterio de positividad de inmunorreactividad en más del 5 % de las células, solo el 11,3 % de la serie fue positiva. Esto limita bastante los hallazgos, aunque no los invalida desde el punto de vista estadístico, como comprobamos.

En primer lugar, la expresión fue mayor en adenocarcinomas que en epidermoides ($p = 0,02$). No hubo diferencias para el grado de diferenciación.

La supervivencia global fue significativamente menor entre los pacientes con sobreexpresión de p185, con una supervivencia a 5 años en positivos y negativos del 16,2 % y 58,5 % respectivamente ($p = 0,001$). Con una me-

diana de tan solo 21 meses, la supervivencia esperada del subgrupo de pacientes con c-ErB-2 positivo fue de las más bajas de todo nuestro estudio.

La estratificación por tipo histológico mantuvo las diferencias estadísticas. Así, el Hazard Ratio de modelo predictivo definido por la sobreexpresión de esta proteína fue de 2,69 (IC 95 %: 1,46 – 4,94), resultados bastante en consonancia con la literatura. Llama la atención que aunque escasos en número, a los dos años de la cirugía casi la totalidad de los casos de CBNM epidermoide con expresión de c-ErB-2 positiva habían fallecido. No ocurrió de esa manera significativa en los adenocarcinomas.

En cuanto a la supervivencia libre de recidiva, se mantuvieron las diferencias, con un Hazard Ratio ajustado por tipo histológico de 2,29 (IC 95 %: 1,25 – 4,17). $p < 0,01$.

Parece que estamos ante un proto-oncogén (c-ErB-2) y su proteína p185 que confieren un claro peor pronóstico al CBNM. Nuestra serie tiene la limitación del tamaño muestral, que en el caso de esta proteína se hace especialmente pequeño para el subgrupo de pacientes con expresión positiva (un 11,3 % de la serie para un criterio de positividad situado solo en el 5 % de las células). Sin embargo, la homogeneidad en cuanto a las características quirúrgicas de la misma compensan de alguna manera ese posible sesgo y animan a desarrollar series de características similares pero con mayor tamaño muestral. La mayoría de estudios, como hemos visto, no analizan de forma específica pacientes quirúrgicos en estadios precoces (327), por lo que la información queda más “diluida”, de cara a establecer potenciales patrones de actuación en la práctica clínica.

El modo en que este gen confiere ese peor pronóstico no estaba claro hace una década, en el momento de la publicación del metaanálisis de Meert, y sigue sin estar claro ahora. Aunque parece que esta proteína puede dotar a la célula de capacidad de migración y por tanto de metastatización, el caso es que lo hace incluso en situaciones de escasa actividad angiogénica, por lo que su potencial de malignización se sugiere independiente de la vía de la neovascularización. No hay que olvidar la relación que parece mostrar con otros receptores de la familia ErB, como el propio EGFR, pero también con elementos de adhesión celular, como el complejo e-cadherina-catetina que luego analizaremos, pues está formado por dos proteínas incluidas en nuestro estudio.

La implicación de este gen y su proteína en la historia natural del CBNM continúa siendo objeto de estudio, toda vez que existe, como hemos dicho, un ligando específico en forma de agente terapéutico como es el trastuzumab, que ya ha demostrado resultados esperanzadores en la clínica en el último lustro (330).

Proteína c-kit

Se trata de una proteína de membrana conocida también como CD117, con actividad tirosín quinasa. Es pues un receptor, en este caso para el *stem cell factor*, que induce a través de esta vía señales de crecimiento celular. El gen c-kit, identificado en 1987, es un proto-oncogén, en tanto en cuanto sus posibles mutaciones y otras alteraciones son capaces de favorecer el desarrollo de un cáncer. Se ha relacionado con tumores del estroma gastrointestinal (GIST), seminomas, melanomas o algunos tumores hematológicos como la leucemia mieloide aguda. Su determinación por IHQ permite la identificación entre otros de dichos GISTs, pues es característica en ellos su positividad. En el cáncer de pulmón se ha demostrado asociación entre la expresión de c-kit y el pronóstico en

carcinoma microcítico (331). Sin embargo, en CBNM no está tan clara esta asociación (201).

Como receptor de membrana, c-kit puede funcionar como potencial diana terapéutica para fármacos de tipo TKI, como el imatinib (que hemos visto en el caso del EGFR). El análisis de la sobreexpresión del receptor podría seleccionar grupos de pacientes subsidiarios de ser candidatos a estas terapias (332). Algunos estudios, publicados hace ya una década, llamaban la atención sobre esta proteína y su posible papel como factor pronóstico. Sin embargo, ha quedado de algún modo en el olvido, al menos en lo que se refiere al CBNM. Es cierto que la tasa de sobreexpresión no es muy alta (10 % - 15 % según las series, de forma bastante homogénea entre adenocarcinomas y escamosos). Pero sí hay datos para pensar en un posible rol, a determinar con más estudios (333). En nuestra serie definimos la positividad de c-kit en la expresión en más del 30 % de las células. Con este criterio, solo un 6,9 % de la serie resultó positiva, lo cual va en consonancia con la escasa tasa de sobreexpresión en series similares que hemos comentado. Incluso en nuestro caso esta tasa está por debajo de lo habitual. Nosotros no encontramos diferencias en la expresión en función del tipo histológico ni del grado de diferenciación. Tampoco hallamos relación entre la expresión de este receptor y el pronóstico, tanto hablando de supervivencia global como libre de enfermedad. Así pues no hemos podido aportar mucha luz en el posible papel de esta proteína a la hora de definir grupos de pacientes de riesgo o que podrían beneficiarse de fármacos dirigidos a bloquearla. No obstante, los hallazgos que en la literatura sí defienden el papel de c-kit son prácticamente en su totalidad referidos a estadios avanzados de CBNM y, como hemos dicho, a carcinomas de células pequeñas.

3-4.2.c. Apoptosis o muerte celular

Cada día mueren entre 50 y 70 billones de células por apoptosis en un adulto. La regulación de este fenómeno es fundamental. Mueren las células que deben hacerlo, y de no ser así, los tejidos crecerían de forma descontrolada. Es lo que ocurre (y acepte el lector esta simplificación al máximo) en el cáncer.

Lo que es cierto es que son muchos los factores implicados en la muerte celular programada (anexo IV). Y el complejo equilibrio que lleva a que cada célula viva sola y exclusivamente durante el tiempo que debe hacerlo, es uno de los aspectos que la ciencia lucha desde hace tiempo por desentrañar, ya que en él radica la explicación y potencialmente tratamiento de muchas enfermedades, no solo dentro de la oncología.

Las diferentes vías de activación de la apoptosis, entre las que se encuentran implicadas la vía del Ligand Inductor de la Apoptosis relacionado con el Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α), la familia de bcl-2 o la propia k-ras, suelen llevar a la activación de proteínas efectoras o ejecutoras como las caspasas, que inician la fase final de la muerte celular a través de la degradación de proteínas del mismo núcleo.

Hace unos 10 años la expresión de algunas de estas caspasas o de proteínas como la cathepsina D, una proteasa sobreexpresada en distintos tipos de tumores, era objeto de estudio por parte de la comunidad científica tratando de dilucidar su posible papel pronóstico en el CBNM. Hoy las vías conocidas son más, y los datos que tenemos de ellas son mayores, de modo que se han desarrollado incluso fármacos que actúan sobre diferentes niveles de esas vías apoptóticas (334).

A la hora de diseñar este estudio, y siguiendo los criterios que ya hemos definido para elegir las proteínas a

analizar, fueron seleccionadas como representantes de este mecanismo oncogénico la caspasa 3 y la catepsina D, que pasamos a analizar brevemente.

Proteína caspasa 3

Como hemos dicho, se trata de una proteína efectora en la compleja cascada intracelular que conduce a la apoptosis. No es de las más estudiadas. Sin embargo, ya desde hace más de una década se ha sugerido que puede tener un papel importante en la oncogénesis del CBNM (208). La expresión de caspasa 3 se ha asociado en alguna serie a buen pronóstico en pacientes con CBNM reseca. Sin embargo, como en otras proteínas y según comentaremos más adelante, el tipo de anticuerpos que se utilice puede modificar los resultados. Por ejemplo, otros estudios que analizan la forma activa de la caspasa 3 nos llevan a la conclusión bastante lógica de que su sobreexpresión se asocia a una peor evolución de los pacientes, con diferencias muy significativas con respecto a aquellos en que no se expresa (335). Incluso en asociación con c-myc, del que hablaremos después, la disminución en la expresión de la forma activa de la caspasa 3 ha demostrado definir un grupo de pacientes con medianas de supervivencia 10 veces mayor que en aquellos sin dicha sobreexpresión (208).

En nuestra serie consideramos la expresión de caspasa 3 como positiva si al menos un 25 % de las células de la muestra presentaban inmunorreactividad. Con ese criterio, en un 25 % de la serie podemos hablar de una sobreexpresión de esta proteína.

No encontramos diferencias en la expresión entre adenocarcinomas, epidermoides e indiferenciados de células grandes. Tampoco el grado de diferenciación influyó en la misma.

Las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad fueron totalmente superpuestas, de modo que la caspasa 3 no se comportó como factor pronóstico en nuestra serie. En general la literatura va en consonancia con estos hallazgos, ya que los casos antes descritos son realmente anecdóticos en el contexto del estudio general de la expresión de esta proteína en el CBNM. Además, como hemos visto, no hay estudios que se centren en series quirúrgicas de estadios precoces como la nuestra.

Proteína catepsina D

Se trata de una proteasa implicada en la degradación proteica. Conocida desde 1949, ha sido recientemente cuando se ha identificado su papel en las vías apoptóticas celulares. Asimismo, su secreción de forma aberrante y su expresión descontrolada se han relacionado con el desarrollo y la progresión de tumores malignos, destacando los de origen mamario. En pulmón los resultados son dispares. Recientemente, Mimae y colaboradores presentan en 2012 una cohorte de 150 pacientes con adenocarcinoma de pulmón reseca (204). De ellos, la tercera parte corresponden a estadios III y IV. En primer lugar, llama la atención que existen diferencias significativas respecto a la expresión de catepsina D en los distintos tipos de adenocarcinoma conforme a la nueva clasificación que hemos descrito de la IASLC. Así, apenas destaca su expresión en los de patrón lepidico, mientras que es significativamente más intensa en los de predominio sólido con producción de mucina. Los autores tratan de relacionar la expresión de esta proteína con los factores pronósticos y de respuesta a tratamiento más destacados de los últimos

años: EGFR, kras y ALK. Encuentran que la mayoría de casos con expresión de catepsina D no tienen alteraciones genéticas en el EGFR, mientras que sí tienen algún caso más de presencia del gen de fusión ALK (si bien son pocos los casos, debido a la escasa incidencia de la presencia de esta traslocación). No encuentran diferencias con las alteraciones en kras. Asimismo encuentran que la expresión aumentada de catepsina D se comporta como factor pronóstico de supervivencia a cinco años

Paralelamente, el grupo del Servicio de Anatomía Patológica de Shenyang, en China, encuentra también una influencia de esta proteína analizada por IHQ en la supervivencia en el CBNM (336). Encuentra además una potenciación de ese riesgo cuando aparece asociado a una disminución en la expresión de caspasa 3. Tiene sentido pensar que esta última tiene un papel apoptótico importante para el control celular. De hecho, su potencial papel como diana terapéutica pretendería conservar su función efectora de la muerte celular programada. Sin embargo, la catepsina D parece que actúa a otro nivel, y es su sobreexpresión la que asocia un menor control celular y con ello una mayor progresión tumoral.

En nuestra serie, catepsina D tampoco ofreció mucha información relevante comparable a la de estas dos recientes publicaciones. Dada la variabilidad de criterio que encontramos en la literatura y la distribución de nuestra serie en cuanto al grado de expresión, repetimos el análisis con dos criterios:

1. Expresión positiva para cualquier porcentaje de células inmunorreactivas. Con ello el 48,8 % de las muestras fueron positivas. En este caso encontramos una mayor expresión de la proteína en los adenocarcinomas, lo cual coincide con las publicaciones previamente reseñadas ($p < 0,01$). No hubo diferencias en función del grado de diferenciación. No analizamos los distintos patrones histológicos del adenocarcinoma según la nueva clasificación promovida por Travis. Respecto a su posible función como factor pronóstico, no encontramos tal asociación con la supervivencia global ni libre de enfermedad, ni en el estudio univariante ni ajustando por tipo histológico.
2. Positividad con inmunorreactividad en más del 5 % de las células. En este caso el 25,6 % de la serie se consideró positiva. Las diferencias en función del tipo histológico no desaparecieron, pero dejaron de ser significativas ($p = 0,08$). No hubo relación con el pronóstico.
3. Muestras positivas para captación de más del 20 % de las células. El porcentaje de la serie considerada positiva con este tercer criterio descendió al 10,6 %. Desaparecen las diferencias en función del tipo histológico, sin que exista ninguna variación en los estudios de supervivencia.

Parece pues que el punto de corte adecuado para aumentar el papel diferenciador de la expresión de catepsina D es considerar negativas solo aquellas muestras sin ninguna inmunorreactividad en la IHQ, toda vez que con este criterio la serie se estratifica en dos grupos más o menos similares en número. En ningún caso encontramos diferencias en la supervivencia en nuestra serie. Dado que se trata de estadios precoces y que la literatura aglutina generalmente todos los estadios de CBNM al hablar de esta proteína (aun en el caso de tratarse de series quirúrgicas) podemos intuir que la catepsina D puede tener un papel relevante en la definición de subgrupos pronósticos, pero especialmente (si no de forma exclusiva) en estadios avanzados del CBNM. Sin embargo, habría que realizar

una serie específica para comprobar o desmentir esta hipótesis, no siendo objetivo de este proyecto el hacerlo.

3-4.2.d. Vías de reparación del DNA

Ya comentamos en la pequeña reseña de los diferentes pathways a analizar en este proyecto, que uno de los más estudiados en los últimos años en el CBNM es el de las vías de reparación del DNA. La disfunción de dicha reparación puede provocar que las alteraciones que por agentes internos o exógenos se producen en el DNA de forma continua puedan trascender y dar lugar a la activación de señales anómalas que puedan repercutir en el control del crecimiento celular y favorecer el desarrollo y progresión de neoplasias.

En el momento de diseñar nuestro estudio y escoger las proteínas que analizaríamos, las vías de reparación de DNA todavía no habían sido tan estudiadas como en la actualidad, lo cual hizo que fueran apenas dos las proteínas representantes de esta vía oncogénica las que se incluyeran en nuestros tissue-arrays: MSH2 y MLH1. La expresión de ambas proteínas había demostrado estar disminuida en muestras de CBNM (97, 210-212).

Proteína MSH2

Codificada en el brazo corto del cromosoma 2, está implicada en varias vías de reparación del DNA. Ubicada en el citoplasma, forma un heterodímero con MSH6, que a su vez se combina con MSH3 para formar el complejo activo reparador propiamente dicho que accede al núcleo e interacciona directamente con el DNA. Aparece genéticamente alterada en distintos tipos de cáncer, algunos de ellos con perfiles hereditarios como el síndrome de Lynch (forma de cáncer de colon hereditario autosómico dominante). Al estudiar esta proteína por IHQ, la inmunorreactividad se produce en el núcleo, con los anticuerpos que se utilizan habitualmente. Es por ello que en el caso de esta proteína lo anómalo es su ausencia de expresión a nivel nuclear. Skarda y col. realizan un análisis de la expresión de esta MSH2 en 179 casos de CBNM, si bien se trata de una serie heterogénea en cuanto a estadio tumoral y tratamientos recibidos. Destaca la ausencia de expresión en el 10 % de la serie, lo cual, insistimos, es lo anómalo. No encuentran relación entre el patrón de expresión de la proteína y diferentes factores demográficos y tumorales analizados, así como tampoco hallan asociación con la supervivencia (337). Tampoco encuentra relación Couso, que sin embargo sí relaciona la expresión de MSH2 con el status de fumador (247). Sin embargo, en los últimos años, ha resurgido el interés por el papel de estas proteínas reparadoras en el cáncer de pulmón. Así, en los pacientes del ya comentado ensayo IALT se ha descrito que la expresión de MSH2 se asocia a un mayor beneficio de la adyuvancia con platinos en pacientes con CBNM completamente reseado (315), sobre todo en casos con niveles disminuidos de p53 y de ERCC1.

También se ha encontrado un comportamiento distinto en función del tipo histológico. En el estudio de Vageli (2013) niveles elevados de MSH2 se asociaron a un mejor pronóstico y mejor respuesta a quimioterapia en tumores de estirpe escamosa. Sin embargo esta sobreexpresión pasó a ser deletérea a la hora de analizar los adenocarcinomas. De hecho, conllevó una peor sensibilidad al tratamiento médico (212, 338).

En nuestra serie un 23,1 % de las muestras no presentó expresión de MSH2, lo que hemos definido como anómalo. Aceptamos como negativa la inmunorreactividad en menos del 5 % de las células, no solo en las que había

una total ausencia de expresión a nivel nuclear. La expresión fue mayor en los epidermoides que en los adenocarcinomas ($p=0,05$). No hubo diferencias en función del grado de diferenciación. Sin embargo no encontramos ninguna diferencia en la supervivencia, ni global ni libre de enfermedad. MSH2 no se comportó como factor pronóstico ni en escamosos ni en adenocarcinomas. Sin embargo, sí se aprecia una leve tendencia que viene a confirmar los hallazgos de Vageli: el pronóstico tendió a ser mejor en escamosos con MSH2 positiva (a partir de los cuatro años de seguimiento) y en adenocarcinomas con MSH2 negativas (durante todo el seguimiento). Puede que esta proteína, sobre todo ahora que comenzamos a saber las alteraciones epigenéticas que condicionan las alteraciones en su expresión (metilaciones, polimorfismos, inestabilidad de microsátélites), todavía nos pueda aportar mucha información en el estudio biomolecular del CBNM.

Proteína MLH1

Muy relacionada con MSH2 y codificada en este caso en el cromosoma 3, su gen aparece alterado también en el síndrome de Lynch. En el estudio de Vageli que hemos comentado se comporta de manera parecida a *msh2* (338). De similar manera, polimorfismos en su gen la han relacionado recientemente con fenómenos de quimiosensibilidad en estadios avanzados (339, 340). La expresión por IHQ no se ha estudiado en los últimos años. Su papel pronóstico no está claro (337).

En nuestra serie, con criterio de positividad similar a MSH2, es decir, $> 5\%$ de células inmunorreactivas, la mitad de la serie (49,4 %) se consideró así, mientras que la otra mitad fue negativa. La diferencia en la expresión en función del tipo histológico fue mucho más llamativa que para MSH2 ($p=0,01$). Sin embargo, como en aquella, no hubo diferencias en la supervivencia en función de su expresión, ni de forma general, ni estratificando por tipo histológico. Pero se repitió el patrón de la historia natural de estos tumores, diferente para escamosos y adenocarcinomas, aunque hablamos de tendencias no significativas.

Probablemente el papel de estas dos proteínas reparadoras del DNA sea más relevante en estadios avanzados de CBNM, sobre todo por su correlación con la sensibilidad a tratamientos basados en platinos. Merece la pena ahondar en el posible rol de estas proteínas, con potenciales implicaciones traslacionales.

En el momento actual son muchas las vías de reparación de DNA que se conocen, y muchas más las alteraciones a nivel biomolecular que relacionan estas vías con el desarrollo y evolución de muy diversos tipos de tumores. Probablemente existen proteínas implicadas en estos *pathways* que puedan dar mucha información pronóstica y sean de fácil detección por IHQ. Son pues merecedoras de un estudio más específico.

3-4.2.e. Vías de invasión y metástasis

Ya comentamos en el repaso inicial a las vías oncogénicas estudiadas en este proyecto el fenómeno de la “cascada metastásica”, todo el proceso que lleva a una célula tumoral a salir de su entorno, trasladarse a otro punto del organismo y dar lugar a una metástasis que a su vez prolifere lejos de su origen. La adhesión celular está mediada por un complejo entramado de moléculas, con un papel muy relevante de las proteínas transmembrana que interaccionan con el entorno extracelular.

Proteínas e-cadherina/beta-catenina

Entre estas proteínas destacan las *cadherinas*, una familia de péptidos transmembrana cuya unión a elementos extracelulares está mediada por calcio. Familia que a su vez cuenta con diversos miembros. Destacamos para nuestro estudio la e-cadherina, situada en tejido epitelial (de ahí su prefijo). Conocemos su papel en el mantenimiento de la estructura tisular y en la movilidad celular.

La proteína e-cadherina guarda una estrecha relación con *beta-catenina*. Se trata ésta de una proteína citoplasmática que se une al dominio intracelular de e-cadherina. Simplificando mucho, podemos decir que sirve de puente entra la proteína transmembrana y el esqueleto de la célula, en concreto los filamentos de actina (figura 65). Entre otras funciones su presencia regula el crecimiento celular una vez que ha terminado la formación del tejido epitelial, impidiendo un sobrecrecimiento del mismo. En los últimos años beta-catenina se ha identificado como una de las proteínas intracelulares claves en la vía de señalización celular *wnt* (341).

El fenómeno por el cual las células dejan de estar ancladas de forma estable en un tejido y adquieren movilidad se ha denominado recientemente la *Transición epitelial-mesenquimal* (con sus siglas en inglés EMT). Las proteínas implicadas en esta propiedad son las cadherinas, la beta-catenina y la vimentina. Han demostrado un papel muy relevante durante el desarrollo embrionario, etapa de movilidad celular por excelencia. Sin embargo, han pasado a tener también un rol muy destacado en fenómenos de invasión y expansión tumoral (342). Incluso han demostrado funcionar como posibles dianas terapéuticas con resultados prometedores en distintos tipos de tumores.

El papel pronóstico de la expresión de estas proteínas cuantificadas por IHQ ha sido bastante estudiado. Destacamos aquí por su actualidad la publicación del grupo coreano de Kim (2013) que analiza de forma retrospectiva muestras en parafina de adenocarcinomas de pulmón (casi el 80 % de la serie son estadios precoces). Encuentra que la ausencia de expresión de e-cadherina y la expresión aberrante de beta-catenina se asocian a una menor supervivencia global y libre de enfermedad (342). Para nuestro estudio nos resulta especialmente relevante porque metodológicamente es muy similar (de hecho emplea puntos de corte de expresión de estas proteínas semejantes a los nuestros) y pone de manifiesto la actualidad de la valoración de las mismas por IHQ.

¿Cómo interpretamos los resultados obtenidos en nuestra serie?

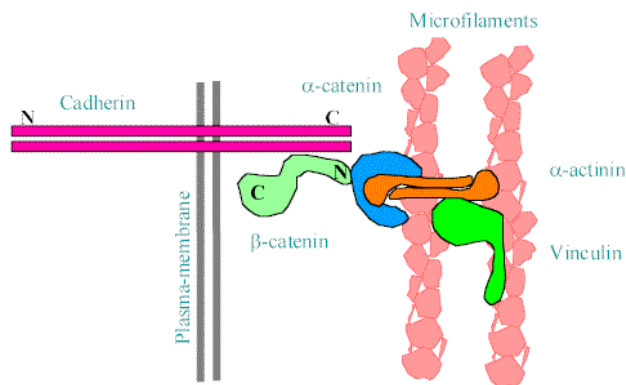
En relación a e-cadherina el punto de corte para considerar positiva su expresión en una muestra fue el 75 % de las células. Con este criterio, el 15 % de la serie fue positiva. Llama la atención que más de la mitad de nuestra serie no mostró expresión de e-cadherina en la IHQ.

La expresión fue significativamente mayor en los tumores de estirpe epidermoide ($p=0,02$). Dicho de forma más relevante, teniendo en cuenta el papel que hemos descrito para la proteína, su pérdida de expresión fue más significativa en el adenocarcinoma. En cuanto a la supervivencia, las variaciones en su expresión no actuaron como factor pronóstico ni en lo referente a la supervivencia global ni libre de enfermedad, con curvas de Kaplan-Meier prácticamente superpuestas.

Sí apareció una tendencia a la hora de estratificar por tipo histológico a un mejor pronóstico en el escamoso

con pérdida de expresión de e-cadherina, y al efecto inverso en el adenocarcinoma (es decir, peor pronóstico al disminuir su inmunoreactividad). Esta tendencia quedó lejos de ser significativa, pero nos han llamado la atención las diferencias encontradas, sobre todo teniendo en cuenta la publicación que hemos comentado de Kim.

Figura 65: Esquema de la relación entre E-cadherina y beta-catenina. Tomada de www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/encyclop/Abp-c/Catenin.htm. Universidad de Edimburgo.



Y es que hace ya más de una década que la expresión disminuida de e-cadherina se asoció a un peor pronóstico en CBNM (343). Un metaanálisis publicado en 2012 que agrupa trece estudios y 2274 pacientes confirma esta peor evolución de los pacientes con disminución en la expresión de la proteína (344). En este caso el porcentaje de casos con dicho decremento en la IHQ no llegó a la mitad de la serie (41 % en el caso de estadios I), lo cual difiere de nuestros resultados. Sí hay cierta variabilidad en la interpretación de los tissue arrays a la hora de dar valor de expresión en función de la inmunoreactividad observada. La influencia de esta menor expresión en el pronóstico arroja en dicho metaanálisis un Hazard Ratio de 1,49 en asiáticos y apenas 1,01 en el resto de razas. Además ese efecto pronóstico deja de ser estadísticamente significativo en tumores en estadio I, que, recordemos, es predominante en nuestra serie, que no es, evidentemente, asiática. Estos posibles factores de confusión como son la raza y el estadio pueden explicar que nuestra serie se comporte de manera aparentemente diferente a como se reseña en la literatura. De hecho no son muchas las series propiamente quirúrgicas publicadas.

Por su parte, respecto a beta-catenina, establecimos su punto de corte de expresión en el 5 % de las células, también en relación a la literatura. Con ello, el 23,8 % de la serie mostró expresión, mientras que el 76,2 % de las muestras fueron negativas (expresión en menos del 5 % de las células). Aunque la tendencia fue a una mayor pérdida de expresión en tumores epidermoides, es decir, al contrario que la e-cadherina, las diferencias en función del tipo histológico no fueron significativas. Tampoco encontramos diferencias en función del grado de diferenciación.

Las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad fueron totalmente superponibles, con Hazard Ratio de en torno a 1, es decir, sin ninguna diferencia apreciable en relación a la expresión de la proteína.

Ha sido descrito en la literatura que la disminución en la expresión de beta-catenina se ha asociado a una mayor capacidad metastásica de ciertas células neoplásicas (345). Aunque en los últimos años se ha intensificado el estudio del valor pronóstico de esta proteína en el CBNM los resultados no permiten extraer conclusiones dada su

disparidad. Un metaanálisis de muy reciente publicación incluyendo doce artículos entre 2000 y 2012, muestra un peor pronóstico en pacientes con disminución de su expresión en CBNM, con un Hazard Ratio de 1,91 (IC 95 % 1,14 – 2,50) para estudios con análisis multivariantes, y un Hazard Ratio de 1,91 (IC 95 % 1,51 – 2,41) para publicaciones con estudios únicamente univariantes (346). Una vez más encontramos posibles sesgos a la hora de extraer conclusiones: no hay homogeneidad en cuanto al estadio, se mezclan series quirúrgicas sin tratamientos adyuvantes con series de pacientes que han recibido quimioterapia o radioterapia, no se incluye una análisis multivariante con otros posibles factores de riesgo como son el estadio o el tipo histológico, y el punto de corte para considerar positiva o negativa la expresión de la proteína varía entre el 5 % y el 88 % de las células. Nos parece que estos más que posibles sesgos restan validez a un metaanálisis con estudios tan heterogéneos. No en vano los autores instan a realizar estudios prospectivos para intentar llegar a determinar el valor pronóstico de esta proteína. En nuestra serie gran parte de estos posibles sesgos son evitados. Sin embargo, no estamos exentos de otros factores de confusión recientemente sugeridos. Así, Li y colaboradores encuentran que el comportamiento de los tumores, y por ende, su pronóstico, varía en función de en qué parte de la célula se detecte el aumento o disminución de la expresión de beta-catenina. En efecto, una disminución en la expresión en la membrana se asocia a un peor pronóstico. Sin embargo, un aumento en la concentración en el citoplasma conllevó también una menor supervivencia (347). Incluso describen una traslocación de beta-catenina al interior del núcleo de la célula en respuesta a señales del EGFR, unido a la implicación el pronóstico de un factor de transcripción llamado Nanog. Como vemos la red de señales internas de la célula es tan compleja que probablemente existan siempre factores de confusión en estos estudios que no llegamos a conocer. Esto nos obliga a homogeneizar al máximo aquellas variables que sí podemos controlar.

3-4.2.f. Factores de transcripción

Habitualmente activados por diferentes señales intracelulares, estos factores son capaces de actuar sobre el crecimiento y proliferación celulares, la diferenciación, la apoptosis, y la propia amplificación del DNA. La hipótesis de su posible papel como inductor de tumores y favorecedor de su invasión, parte del hecho de que su sobreexpresión conlleva una actividad perpetuada que rompe con la regulación y el control de la proliferación celular. Para nuestro estudio seleccionamos c-myc, que es considerado un proto-oncogén, pues sus alteraciones moleculares conducen a errores en la transcripción que llevan a una actividad descontrolada de su proteína, lo cual podría justificar la hipótesis planteada. Existen muchos otros factores de transcripción. Su análisis supera con mucho los objetivos de este estudio.

Proteína c-myc

Codificada por el proto-oncogén c-myc, situado en el cromosoma 8, se considera capaz de regular la transcripción de hasta el 15 % de los genes del DNA. Es capaz de actuar a muchos niveles y de diferente manera en función de las señales de activación que reciba. Por ejemplo, hace ya tiempo que se comprobó que en respuesta a señales de activación puede favorecer la mitosis y proliferación celular, si bien en ausencia de las mismas es proa-

prognóstico.

Se estudia fundamentalmente la expresión del gen, así como las posibles alteraciones epigenéticas que alteran la codificación y función del mismo. Sin embargo, son pocos los estudios de expresión de la proteína. Hace ya tiempo que se relacionó con una posible influencia pronóstica en el CBNM, vinculado de algún modo a la vía de la apoptosis, de la que ya hemos hablado (348).

En nuestra serie utilizamos dos criterios de positividad:

Criterio 1. Expresión de c-myc positiva con inmunorreactividad en más del 5 % de las células de la muestra.

Con este criterio el 35 % de la serie fue considerada positiva. Aunque la expresión fue ligeramente superior en adenocarcinomas no hubo diferencias con respecto al tipo histológico ni al grado de diferenciación. Con este criterio no encontramos diferencias en la supervivencia ($p=0,58$) si bien la tendencia fue a una mayor mortalidad en pacientes con sobreexpresión de la proteína, tanto a la hora de hablar de supervivencia global como libre de enfermedad.

Criterio 2. Expresión de c-myc positiva para una inmunorreactividad superior al 20 % de la célula. En este caso los hallazgos sí fueron significativos. En primer lugar, la expresión fue mayor en tumores indiferenciados o con bajo grado de diferenciación. Como resultado en consonancia con este hallazgo, y pese a su escaso número, destacó la sobreexpresión en los tumores indiferenciados de células grandes. Sin embargo, eliminando este pequeño subgrupo no encontramos diferencias entre el adenocarcinoma y el epidermoide.

La sobreexpresión de c-myc con este criterio sí resultó asociarse a un peor pronóstico, con una supervivencia a 1, 3 y 5 años de 93,2 %, 69,6 % y 57,9 % respectivamente para tumores sin sobreexpresión de c-myc, y de 92,1 %, 56,1 % y 37,1 % para aquéllos con un aumento de la inmunorreactividad de la proteína. Las diferencias fueron significativas ($p=0,02$). Estas diferencias se mantuvieron para los estudios estratificados por tipo histológico y por grado de diferenciación. De hecho, en el análisis multivariante, utilizando un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox, la expresión de c-myc mantuvo ese efecto como factor de mal pronóstico, con un Hazard Ratio de 1,8 (IC 95 % 1,08 – 3,1; $p=0,028$).

En la literatura reciente Iwakawa, del Instituto Nacional de Investigación del Cáncer de Tokio, encuentra resultados parecidos en adenocarcinomas en estadios I. Sin embargo, su estudio analiza amplificación del gen por PCR. Los resultados ($p=0,013$) llevan a los autores a concluir que la amplificación del gen c-myc podría ser una alteración genética crucial a la hora de convertir las células de los adenocarcinomas en potencialmente capaces de metastatizar. Y defienden que los pacientes con estos hallazgos serían buenos candidatos a recibir tratamiento adyuvante en el postoperatorio (215). No son ajenos en su discusión a las diferencias que establece la nueva clasificación del adenocarcinoma a la que hemos hecho mención en varias ocasiones en el presente estudio. En efecto, habría que validar estos hallazgos en los distintos tipos histológicos de adenocarcinoma antes de plantear en qué pacientes deben llevarse a la práctica terapias adyuvantes o seguimientos más intensivos.

También habría que relacionar los hallazgos desde el punto de vista genómico (amplificación del gen de c-myc) con los que encontramos nosotros en proteómica. La transcripción de un gen amplificado a un pool de pro-

teínas aumentado en número y función es algo que hay que demostrar en cada caso.

Sí hacen referencia los autores a los hallazgos de Socek y colaboradores, quienes en 2008 publican en Nature que la inhibición de myc en adenocarcinomas inducidos en ratas por mutación de ras supone una regresión muy importante de tumores incipientes o ya bien establecidos, con escasa patogenicidad sobre tejido, por lo que podría ser una diana terapéutica de alcance (349). Fukazawa, dos años después, confirma que la inhibición de c-myc bloquea el crecimiento de líneas celulares de adenocarcinoma humano con k-ras mutado en células con sobreexpresión de c-myc (350).

Nuestra serie demuestra que la determinación de la expresión de c-myc por IHQ puede tener un papel destacado en la definición de subgrupos pronósticos en CBNM precoces completamente reseados. El hecho de que pueda inhibirse este gen podría abrir puertas al desarrollo de terapias dirigidas.

Una de las limitaciones principales de estos hallazgos es el hecho de que c-myc es un gen implicado, como hemos dicho, en multitud de vías de señalización celular. No se trata de un gen que se active específicamente en el cáncer de pulmón y por tanto habrá que ser muy cautos a la hora de analizar los posibles efectos que se pueden obtener por su inhibición in vivo. Los estudios antes reseñados muestran sus hallazgos en líneas celulares de adenocarcinoma.

Al hablar de supervivencia libre de enfermedad los hallazgos de nuestra serie son parecidos a los de supervivencia global. En este caso no se alcanza la significación estadística, pero c-myc continúa actuando como factor de mal pronóstico, con un Hazard Ratio ajustado por tipo histológico de 1,63 (IC 95 % 0,98 – 2,71; p =0,06).

3-4.2.g. Otras proteínas

Proteína Topoisomerasa 2 alfa

Ya comentamos que las topoisomerasas se encargan de mantener la estructura del DNA y permitir que a la hora de la transcripción se “desenrolle y vuelva a enrollar” adecuadamente sin perder su configuración tridimensional. Por este papel tan relevante de forma directa e inmediata en la transcripción del material genético, evento trascendental para la replicación celular, son dianas terapéuticas de quimioterapias de uso habitual en la clínica, como son las antraciclinas o el etopósido. Interrumpir su función conlleva a la muerte celular. También vimos que su papel como factor pronóstico en CBNM no estaba bien establecido, aunque en carcinoma microcítico ha demostrado no solo influir en dicho pronóstico, sino también definir fenómenos de quimiorresistencia en tumores que presentan una expresión aumentada de la proteína, analizada por IHQ.

En mamíferos existen dos isoformas de la Topoisomerasa 2 (alfa y beta). La analizada en este estudio es la isoforma alfa, que es la que ha demostrado aparecer sobreexpresada en tejido neoplásico en relación con tejido sano. La isoforma beta, por su parte, muestra una expresión similar en células tumorales y en sanas.

En nuestra serie consideramos positiva la expresión de Topoisomerasa 2 en muestras con inmunorreactividad en más del 30 % de las células. Con este criterio el 26,3 % de la serie fue positiva.

No encontramos diferencias en la expresión en función del tipo histológico ni del grado de diferenciación.

Tampoco encontramos relación con la supervivencia global ni libre de enfermedad.

Estos hallazgos están en consonancia con la literatura más reciente. Así, una serie turca publicada en 2012, bastante equiparable a la nuestra aunque con un tamaño muestras menor (100 pacientes completamente reseca- dos), tampoco encuentra diferencias en función de la expresión de Topoisomerasa 2 alfa (351).

Sin embargo la serie China de Yan con 151 pacientes con CBNM reseca- do en estadios I a III, demuestra que la quimioterapia adyuvante mejora de forma significativa la supervivencia de los pacientes con sobreexpresión de Topoisomerasa 2 alfa (352).

Con estos hallazgos, pensamos que el papel que la expresión de estas proteínas nucleares puede desempeñar a la hora de definir la quimiosensibilidad de un tumor merece continuar con la investigación en esta línea.

Proteína Timidilato Sintasa

De forma similar a las topoisomerasas la relevancia de la timidilato sintasa radica en que es diana de quimio- terapicos de uso frecuente en clínica como el 5-fluorouracilo y el pemetrexed. Su sobreexpresión se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes con estadios avanzados de CBNM. Asimismo, la respuesta al pemetrexed parece mayor en esos casos (353).

En nuestra serie encontramos que la mayoría de las muestras tumorales presentaban algún grado de expresión de esta proteína. Consideramos positiva cualquier intensidad de inmunorreactividad, y con ello, el 82,5 % de la serie lo fue.

La expresión fue significativamente mayor en el adenocarcinoma, hasta el punto de que prácticamente no hubo ningún caso de adenocarcinoma sin expresión de la proteína ($p < 0,01$).

En el estudio de supervivencia global no encontramos diferencias en función de la expresión, ni de forma glo- bal, ni estratificando por tipo histológico. Tampoco al hablar de supervivencia libre de enfermedad.

En la literatura se ha relacionado la expresión de timidilato sintasa con el pronóstico, si bien la mayoría de las series con pacientes con CBNM reseca- do incluyen estadios III, por lo que son pacientes que reciben en algún momento de la historia natural de la enfermedad tratamientos con quimioterapia (354). Este hecho podría hacer que el pronóstico viniera definido más por los distintos fenómenos de quimiosensibilidad que por la sobreexpre- sión de la proteína per se.

Uno de los estudios más importantes en relación con esta proteína y su capacidad de predecir la respuesta a tra- tamiento con pemetrexed es el publicado por Tanaka en 2011, que incluye una serie de 2621 pacientes de 21 cen- tros japoneses con cáncer de pulmón (casi todos no microcíticos, aunque incluyeron 35 microcíticos). Todos ellos fueron pacientes quirúrgicos sin tratamientos neoadyuvantes. Midieron la expresión génica de timidilato sintasa por PCR. La expresión fue mucho mayor en microcíticos, escamosos, pacientes por encima de 67 años de edad y tumores indiferenciados. Aunque en el estudio univariante hubo correlación entre la expresión del gen y el estadio tumoral, esto no se confirmó en el estudio multivariante. Los autores dejan en ese momento pendiente el análisis de supervivencia para un estudio ulterior, avanzado el tiempo de seguimiento mínimo necesario en estos casos para extraer conclusiones. Estudio que, hasta la fecha, no hemos encontrado publicado.

La serie más homogénea a la nuestra es la americana de Zheng, publicada en 2008. En este caso sí se trata de una serie quirúrgica estricta con 160 pacientes en estadio I que no recibieron tratamiento adyuvante en ningún momento. La supervivencia en los casos de expresión aumentada del gen fue significativamente menor ($p=0,013$). Este dato parece ir en contra de los hallazgos en estadios avanzados en que los pacientes reciben quimioterapia. Cabe destacar que Zheng utiliza un punto de corte de inmunorreactividad en más del 25 % de las células para considerar positiva la muestra (355).

4. MODELOS PRONÓSTICOS EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO MICROCÍTICO

4-1. Introducción

Como ya hemos comentado a lo largo de este trabajo, en la actualidad la hoja de ruta para el tratamiento del CBNM la establece la estadificación TNM. Documentos de consenso, vías clínicas, guías a nivel nacional o internacional, recomendaciones de sociedades científicas, etc., tratan de acotar un poco más el tratamiento en función de otros hallazgos. Sin embargo, no está claro si la evidencia científica permite por ahora aplicar otros factores en la práctica asistencial habitual. Es cierto que se han identificado diversos y muy variados factores de riesgo capaces de predecir un peor pronóstico a nivel general, pero pocos con peso suficiente como para generalizar su uso. La combinación de algunos de esos factores y su estudio conjunto, con la ayuda de análisis estadísticos multivariantes, permiten establecer grupos de pacientes con mejor o peor pronóstico en función de las distintas variables (que pueden ser demográficas, patológicas, quirúrgicas, de respuesta, etc.). Se intentan crear así modelos predictivos. A su vez estos pueden ser modelos predictivos de supervivencia, de respuesta al tratamiento, de riesgo quirúrgico, etc. En el CBNM en estadio precoz el TNM ha hecho ya una primera clasificación práctica en los últimos años. Cuando comenzamos a desarrollar este proyecto la literatura incluía como precoces los estadios I y II, pues no había evidencia científica de peso como para separar ambos estadios a la hora de hablar de estos pacientes. Por eso, muchos estudios que buscaban factores pronósticos en estadios precoces incluían en sus series los pacientes sin afectación ganglionar mediastínica (es decir, no N2), sin diferenciar a menudo entre estadios I y II. Así hemos hecho nosotros. El hecho que correlaciona claramente ambos estadios es que son pacientes subsidiarios de cirugía, lo cual da una más que notable homogeneidad a las series, por las peculiaridades que tienen estos pacientes. La gran diferencia entre la afectación ganglionar N1 y N2 es la supuesta resección completa que la cirugía oncológica del cáncer de pulmón hace de las adenopatías N1, mientras que, en general, se ha hablado de cirugía incompleta cuando el paciente intervenido es N2, germen del eterno debate acerca de si la enfermedad N2 es quirúrgica, puede serlo en algún caso, o nunca lo es.

El caso es que los estudios que analizan estadios precoces del CBNM en general se están refiriendo a pacientes con tumores reseados, independientemente del estadio. A nosotros nos parece que mezclar en una serie de estadios precoces pacientes N0-1 con pacientes N2, independientemente de que sean todos quirúrgicos con resección

presumiblemente completa, introduce un factor de confusión muy importante como es el propio N2, ya que se ha demostrado una enorme heterogeneidad dentro de este subgrupo. Hablar de estadios precoces debería restringir el análisis a estadios I y II.

Incluso con este nivel de restricción los pacientes con afectación ganglionar N1 tienen un pronóstico claramente peor que los N0, y se benefician de tratamientos adyuvantes. Incluso los tumores en estadio Ib que reúnen ciertas peculiaridades (tamaño mayor de 4 cm, linfadenectomía subóptima, resección sublobar) pueden ser candidatos a adyuvancia en casos seleccionados (97). Es por eso que hoy es difícil encontrar tumores en estadio II que no hayan recibido tratamiento complementario a la cirugía, bien de quimioterapia, bien de quimiorradioterapia adyuvante.

Por este motivo los estudios de factores pronósticos en estadios precoces CBNM que se desarrollan en la actualidad y pretenden ser restrictivos no incluyendo casos con afectación N2 reseca, tampoco suelen incluir los estadios II, y se reducen a los pacientes con CBNM en estadio I. En nuestra serie ya hemos dicho que no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con CBNM en estadios I y II, probablemente por el tamaño muestral del estadio II y porque dentro del mismo se han seleccionado los casos más favorables. Esto mantiene el valor de nuestro estudio y su representatividad a la hora de argumentar que hemos analizado claramente pacientes con estadios precoces.

La mayoría de factores pronósticos que se han identificado en los últimos años son biomoleculares. Al fin y al cabo, factores demográficos tan de relieve en la actualidad como el género, vienen determinados por características biomoleculares como pueden ser los receptores estrogénicos. Es pues a este nivel proteómico o genómico al que estamos avocados a movernos en nuestra investigación en cáncer. La terminología al hablar de modelos tiene también sus matices (tabla 54).

Por tanto los modelos predictivos clásicos, como puede ser la propia clasificación TNM, irán dando paso de forma irremediable a modelos basados en hallazgos biomoleculares.

Tabla 54. Terminología al hablar de la influencia de biomarcadores en la evolución de pacientes con CBNM.

Factores pronósticos	Dan información acerca del curso natural que seguirá la enfermedad, independientemente del tratamiento
Factores predictivos	Predicen la respuesta a un determinado tratamiento o la influencia del tratamiento en la historia natural de la enfermedad
Mixtos	Dan información sobre ambos aspectos: son los más relevantes, pues permiten seleccionar a qué pacientes tratar y cuál es el mejor tratamiento a emplear

4-2. Factores clinicopatológicos clásicos y su relevancia clínica en términos de adyuvancia en el CBNM en estadio precoz completamente reseado.

Distintos factores clínicos como el estadio o el género, o patológicos como la diferenciación celular, la vascularización del tumor o la propia invasión neoplásica de estructuras vasculares o linfáticas, influyen en las decisiones terapéuticas en estadios precoces de CBNM, sobre todo en términos de adyuvancia. Es cierto que hasta la fecha, como hemos comentado, solo el TNM (al fin y al cabo basado en tamaño del tumor, invasión local y afectación ganglionar) es el único biomarcador clinicopatológico prospectivamente validado que actúa como factor pronóstico y predictivo.

Según las guías clínicas de más prestigio a nivel internacional, como son la European Society of Medical oncology (ESMO), la American Society of Clinical Oncology (ASCO), la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) y el American College of Chest Physicians (ACCP), está indicada la adyuvancia con quimioterapia basada en platinos como tratamiento estándar en CBNM en estadios II y IIIA, con un beneficio estimado en la supervivencia del 4 % - 5 % a cinco años (112, 136, 356). Los resultados en estadio IA no tienen peso como para recomendar adyuvancia, mientras que los hallazgos favorables encontrados en el IB no están validados y están basados en análisis de subgrupos, con la consiguiente pérdida de poder estadístico.

Sí parece importante el tipo de estadificación, que hemos defendido en este estudio desde el principio, en tanto en cuanto un reciente análisis retrospectivo con más de 20.000 pacientes con CBNM en estadio I reseado demostró que el número de ganglios extirpados en la linfadenectomía podía ser un factor predictivo, si bien las diferencias podrían atribuirse a un efecto terapéutico directo de la propia disección ganglionar (357). Otros estudios también recientes y casi todos retrospectivos, han investigado el alto grado tumoral, la invasión vascular, o la afectación de la pleura visceral como factores de mal pronóstico, con resultados significativos que en un momento determinado puede apoyar la indicación de un tratamiento adyuvante sin evidencia clara del beneficio que puede aportar al paciente (358, 359). Otros factores pronóstico clinicopatológicos que parecen ser independientes son la edad avanzada, el género masculino y la histología no escamosa. Solo el Performance Status ha actuado como factor predictivo clínico de respuesta al tratamiento (123, 133, 135). El valor de los factores pronósticos y predictivos clinicopatológicos en la actualidad es tal que en la práctica clínica no hay ningún modelo genético que aporte más información que la proporcionada por la combinación de estos factores clásicos. Si a este le unimos la correlación que existe entre los patrones biomoleculares y las características histológicas, podemos decir que hoy la clínica y la anatomía patológica morfológica siguen siendo elementos de alta precisión predictiva (360, 361).

4-3. Factores biomoleculares: su papel actual en el CBNM.

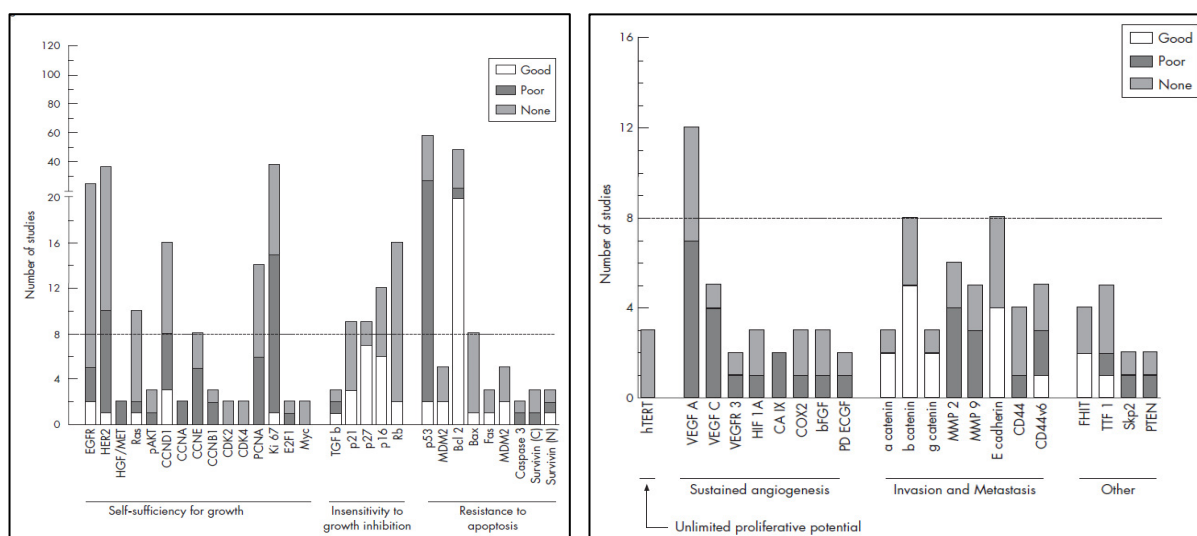
En la actualidad, como hemos dicho, conocemos alteraciones o peculiaridades genéticas en algunos tumores que los hacen susceptibles de tratamientos dirigidos con buenos resultados en algunos casos, como aquellos basados en TKIs o el uso del crizotinib en pacientes con tumores portadores del gen de fusión ALK. Sin embargo estos

no son propiamente modelos predictivos, pues no combinan un conjunto de variables a la hora de decidir los tratamientos en la clínica. Y sin embargo, como hemos repasado aquí, la expresión de diferentes genes y sus proteínas ha actuado como factor pronóstico en series bien seleccionadas para estudios bien realizados. En los últimos veinte años numerosas publicaciones con estudios de este tipo concluyen con aseveraciones del tipo: “la expresión de la proteína o del gen analizado funcionó como factor pronóstico y puede servir para definir subgrupos de pacientes subsidiarios de un tratamiento más intensivo o un seguimiento más exhaustivo”. La figura 66 da ejemplo de la variabilidad de estos hallazgos en una revisión realizada hace ya varios años por Zhu.

La pregunta es: ¿estamos preparados para utilizar marcadores biomoleculares para la estadificación, el pronóstico y la selección del tratamiento en estadios precoces de CBNM?

Desde el Grupo Español de Cáncer de Pulmón se realiza una interesante revisión al respecto de muy reciente publicación en respuesta a esa misma pregunta (361). Massuti y el resto del equipo dirigido por el Dr. Rosell, en lo más puntero en cuanto a este aspecto del estudio del cáncer de pulmón, defienden que en efecto, diferentes perfiles de expresión génica pueden facilitar las decisiones a tomar en CBNM.

Figura 66: Número de publicaciones sobre marcadores que habían sido analizados por al menos de grupos de investigadores. Para cada biomarcador se puede ver el número de estudio en que su sobreexpresión se ha comportado como factor de mal pronóstico, buen pronóstico o neutro. Tomada de (362)



Se han publicado modelos predictivos biomoleculares (a la postre llamados perfiles de expresión, ya sea génica o proteica) que han tratado de definir subgrupos de pacientes con mejor o peor pronóstico y candidatos a recibir tratamientos específicos. Sin embargo se hacen eco de las limitaciones que tienen este tipo de estudios: la más que probable influencia de diferentes factores de confusión que actúan sobre la historia natural de la enfermedad y repercuten en la supervivencia de los pacientes, análisis estadísticos y metodología insuficiente para extraer conclusiones de peso, dificultad en la validación de los hallazgos que se publican y que en ocasiones no es posible cuando se aplica el estudio a una serie diferente, etc. De manera que estudios de este tipo con resultados metodológicamente sustentados y bien validados hay realmente pocos (362-367). Destaca una firma génica determinada por 15 genes publicada recientemente por Zhu (362) a partir del ensayo JBR.10 del Grupo de Ensayos Clínicos

del Instituto Nacional del Cáncer de Canadá. Utiliza 133 muestras tumorales en parafina recogidas de forma prospectiva y encuentra un perfil génico capaz no solo de definir el pronóstico de los pacientes, sino también la respuesta al tratamiento quimioterápico. Estos hallazgos fueron validados en cuatro series independientes de microarrays publicadas. A su vez, al utilizar esta serie para validar los hallazgos de otros estudios que previamente habían identificado posibles firmas génicas con influencia en la supervivencia en estadios precoces de CBNM, encontramos que solo los seis genes de una de ellas, la del grupo de Boutros (367), se comportan como factores pronósticos y a la vez predictivos. La serie más recientemente publicada hasta el momento en este sentido es la del grupo de Jablons, de la Universidad de California. Aquí los investigadores desarrollan una firma compuesta por 14 genes, de los que 11 son genes relacionados con el cáncer (366). A posteriori validan su serie en dos poblaciones distintas: una serie de 433 pacientes con carcinomas no epidermoides en estadio I completamente reseca del norte de California, y una cohorte de 1006 resecciones de CBNM en estadios IA a IIIB del Consorcio de Ensayos Clínicos de China. La firma génica resultó en todos los casos actuar como factor pronóstico independiente en todos los estadios TNM (I, II y III). Esta serie, publicada en *Lancet*, ha relanzado en el último año el interés por el desarrollo de firmas génicas de estas características, por cuanto aporta una metodología seria y sus dos validaciones le confieren un rigor de sumo interés. Sin embargo, no está exenta de limitaciones. Por una parte, excluye a los pacientes con carcinoma escamoso. Y por otro lado, adolece de falta de homogeneidad en cuanto a la linfadenectomía: un 18 % de las resecciones por CBNM en Estados Unidos carecen de estudio linfoganglionar.

Hemos de decir que casi ninguno de los genes que estas series incluyen en sus firmas codifican proteínas de las analizadas en nuestro estudio (MDM2 es una excepción), si bien, la gran mayoría de ellos están relacionados, como la proteína 1 asociada a cdk2 o el receptor de membrana erbB-3, perteneciente a la familia de receptores con actividad tirosín quinasa de los que hemos hablado.

Nuestro grupo de trabajo, perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, en Madrid (IdISSC), ha desarrollado recientemente una firma constituida por 50 genes utilizando la tecnología de microarrays y la metodología de clusters de genes que parece predecir la supervivencia en estadios precoces de CBNM reseca. Se trata de una serie con la misma rigurosidad desde el punto de vista quirúrgico y de seguimiento que hemos definido en este estudio, por lo que puede aportar datos importantes y metodológicamente bien sustentados en el ámbito de la evolución de los estadios precoces de cáncer de pulmón intervenidos. Llama la atención que la firma desarrollada involucra en la influencia pronóstica de nuestros pacientes una batería de genes relacionados con la inmunidad humoral B (368). La firma ha sido validada con éxito en la serie de Roepman, una cohorte de 172 pacientes con CBNM en estadios I y II reseca.

Estos estudios permiten analizar cientos o miles de genes (en esta serie de nuestro grupo 2160 genes) de forma sistemática sobre todas las muestras gracias a la tecnología de microarrays (en este caso por doble hibridación a partir del RNA mensajero extraído). La tecnología de clusters nos permite agrupar genes con patrones de expresión similares.

¿Hallazgos de estas características y a este nivel hacen que nuestro estudio, analizando perfiles de expresión proteica de genes previamente seleccionados de forma más o menos arbitraria quede superado y pierda utilidad?

Creemos que no. Y la prueba es que hasta el momento actual los grandes avances en cuestión de terapias dirigidas en cáncer se han desarrollado sobre la expresión aislada de determinados genes, y no sobre firmas génicas. Son vías paralelas de investigación en cáncer que no se excluyen mutuamente.

Comentábamos al inicio de esta apartado el papel de los inhibidores de receptores tirosín quinasa o del crizotinib en el tratamiento del CBNM. Mencionaremos brevemente cuáles son los biomarcadores pronósticos y predictivos individuales que han demostrado utilidad en estadios precoces de CBNM:

- a. Excision repair cross complementation group 1 (ERCC1). Implicado en diferentes vías de reparación del DNA, hoy sabemos que su sobreexpresión en las células tumorales favorece la resistencia a distintos tipos de platinos (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino). Esta implicación ha sido demostrada tanto a la hora de medir niveles de RNA mensajero como en la cuantificación de la proteína por IHQ (369). Curiosamente, esta expresión de ERCC1 que en pacientes tratados se asocia a peor respuesta, en pacientes que no han recibido tratamiento conlleva un mejor pronóstico en estadios precoces. En relación con este gen ya hemos hablado del papel de p27 y MSH2 a lo ahora de predecir respuesta al tratamiento en pacientes en estadios precoces (315).
- b. Ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1). Enzima clave en la regulación de la síntesis del DNA, su función es bloqueada por la gencitabina. Distintos estudios han demostrado que su sobreexpresión, tanto a nivel génico como proteico, se asocia a una peor respuesta al tratamiento con dicho fármaco (370). Sin embargo, el Spanish Customized Adjuvant Trial (SCAT), estudio multicéntrico de biomarcadores desarrollado por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón (GECP) y en el que nuestro centro participa, encuentra que la expresión de la proteína RRM1 predice el resultado a tratamientos con cisplatino y vinorelbina, pero no influye en pacientes tratados con cisplatino, paclitaxel y gemcitabina (371, 372). Independientemente de estos fenómenos predictivos, RRM1 actúa como factor pronóstico en pacientes en estadios I y II no tratados tras la resección, de modo que su sobreexpresión parece conferir una mejor supervivencia a los pacientes.
- c. Breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1). Uno de los genes más estudiados en cáncer de mama, pero que ha demostrado ser fundamental en diferentes tipos de tumores. Actúa en parte como gen supresor tumoral, y recientemente ha demostrado actuar como uno de los principales factores predictivos para desarrollar terapias dirigidas en cáncer de pulmón (373). Parece que predice resistencia a cisplatino y respuesta a docetaxel. Además, entre pacientes sin tratamiento adyuvante, la expresión de BRCA1 funcionó como factor de mal pronóstico en pacientes del citado GECP (373).
- d. Timidilato Sintasa. Ya hablamos del papel de este gen y su proteína en el apartado correspondiente, por lo que no entraremos en detalles. Hemos querido incluirlo en esta lista dada la importancia que mantiene en la actualidad a la hora de definir biomarcadores pronósticos y predictivos en CBNM.
- e. Kirsten-rou avian sarcoma (KRAS). Pertenece a la familia de proteínas RAS que codifican GTPasas implicadas en fenómenos de transducción celular. Entre un 10 % y un 25 % de los CBNM presentan mutaciones en KRAS. La mayoría de ellas afectan a los codones 12 y 13. Las mutaciones de KRAS se asocian a fuma-

dores y adenocarcinomas. Hace tiempo que se sugirió el posible papel de las mutaciones de este gen en el pronóstico del adenocarcinoma de pulmón (374). Sin embargo, aún hoy no está claro (375). Sí se ha descrito recientemente que los tumores con mutaciones de KRAS parecen predecir un menor efecto de la adyuvancia con quimioterapia en casos de tumores reseados, como muestran los estudios biomoleculares de ensayos como el CALGB 9633 o el LACE.

- f. **Beta-tubulina.** La formación de microtúbulos, paso fundamental en la mitosis celular, es diana de un grupo de fármacos entre los que destaca, por su aplicación en el CBNM el paclitaxel. La sobreexpresión de la beta-tubulina clase III (β TUBIII) se ha asociado a mayor riesgo de recidiva y a menor respuesta al tratamiento con estos antimicrotúbulos (376).

Con todos estos datos, ¿podemos hablar del uso de biomarcadores en la clínica para decidir el tratamiento más adecuado para los pacientes? Probablemente “aún no, pero casi”. Es cierto que la quimioterapia ha ido demostrando un beneficio en determinados pacientes con CBNM en estadios precoces reseado. Y parece cada vez más claro que la estadificación TNM no es suficiente para seleccionar qué pacientes se beneficiarán de la misma. Son varios los biomarcadores identificados como posibles factores pronósticos o predictivos (tablas 55 y 56), pero en la clínica todavía muy pocos se han incorporado a la toma de decisiones. Las mutaciones en el gen del EGFR, así como la presencia del gen de fusión ALK son las únicas alteraciones que por el momento deben hacerse de rutina en los adenocarcinomas que pudieran ser subsidiarios de un tratamiento adyuvante a la cirugía.

Parece cuestión de tiempo, no obstante, que el número de biomarcadores que condicionen el tratamiento de los pacientes se incremente. Sin embargo, todavía hay limitaciones en los estudios que hemos ido comentando, como que la mayoría corresponden a series seleccionadas retrospectivamente.

Por eso, se esperan con gran interés los resultados de cuatro ensayos clínicos multicéntricos randomizados que tratan de identificar terapias a la carta en función de la expresión de los genes ERCC1, RRM1 y BRCA1 (361). En resumen, aunque parece que pronto se abrirán puertas en la aplicación traslacional de los numerosos hallazgos en cuestión de factores pronósticos y predictivos en estadios precoces de CBNM, todavía su uso no está recomendado en la clínica, como leemos en la guía de práctica clínica de la ESMO sobre tumores de estas características (377).

Tabla 55: Biomarcadores pronósticos en CBNM en estadios precoces. Tomada de Massuti et al (361)

Estudio	Estadios	Tamaño muestral	Diseño del estudio	Biomarcador	Hazard Ratio para supervivencia global(valor de p)
Olaussen et al, 2006	I-III	1867/761	Retrospectivo (en el seno del IALT)	ERCC1 (IHQ) sobreexpresado	0,66 (0,009)
Kamal et al, 2010	I-III	1867/673	Retrospectivo (en el seno del IALT)	MSH2 (IHQ) sobreexpresado	0,66 (0,01)
Tsao et al, 2007	IB-II	482/253	Retrospectivo (en el seno del JBR.10)	P53 (IHQ) sobreexpresado (>15 % de células)	1,89 (0,03)
Graziano et al, 2010	IB	344/250	Retrospectivo (en el seno del CALBG 9633)	P53 (IHQ) expresión positiva	2,30 (0,0005)
Seve, 2007	IB-II2	482/265	Retrospectivo (en el seno del CALBG 9633)	βTUBIII (IHQ) sobreexpresada	1,72 (0,04)
Rosell, et al, 2007	I-III A; IB-II B	126;58 (cohorte de validación)	Análisis retrospectivo de una cohorte	BRCA1 (RT-qPCR)	1,98 (0,02); 2,4 (0,04)

Tabla 56: Biomarcadores predictivos en CBNM en estadios precoces. Tomada de Massuti et al (361)

Estudio	Estadios	Tamaño muestral	Diseño del estudio	Biomarcador	Hazard Ratio para supervivencia global; valor de p en el test de interacción
Olaussen et al, 2006	I-III	1867/761	Retrospectivo (en el seno del IALT)	ERCC1 (IHQ) expresión negativa vs positiva	0,65 (0,002) vs 1,14 (0,40); 0,009
Kamal et al, 2010	I-III	1867/673	Retrospectivo (en el seno del IALT)	MSH2/ERCC1 (IHQ) ambos bajos vs ambos altos	0,65 (0,01) vs 1,32 (0,19); 0,01
Kamal et al, 2010	I-III	1867/673	Retrospectivo (en el seno del IALT)	MSH2 (IHQ) baja vs alta expresión	0,76 (0,03) vs 1,12 (0,48); 0,06
Kamal et al, 2010	I-III	1867/673	Retrospectivo (en el seno del IALT)	MSH2/p27 (IHQ) ambos bajos vs ambos altos	0,65(0,01) vs 1,31 (0,22); 0,01
Tsao et al, 2007	IB-II	482/253	Retrospectivo (en el seno del JBR.10)	p53 (IHQ) expresión positiva (>15 % de células) vs negativa	0,54 (0,02) vs 1,40 (0,26); 0,02
Filipits et al, 2007	I-III	1867/778	Retrospectivo (en el seno del IALT)	p27 (IHQ) expresión negativa vs positiva	0,66(0,006) vs 1,09 (0,54); 0,02
Pirker et al, 2007	I-III	1867/778	Retrospectivo (en el seno del IALT)	ERCC1/p27 (IHQ) ambos negativos vs positivos	0,52 (95 % CI:0,36-0,74) vs 1,27 (95 % IC: 0,87-1,84); no especificado

4-4. Interpretación de nuestro modelo pronóstico

¿Cuál es la información que nos proporciona nuestro modelo pronóstico? Los hallazgos de nuestro estudio nos

dicen que pacientes con CBNM en estadios precoces (I y II) completamente resecaos que reúnen ciertas características tienen una supervivencia significativamente mayor. Dichas características son las definidas en la tabla 57 (para supervivencia global) y 58 (para intervalo libre de enfermedad).

Como ya hemos comentado al hablar de los distintos períodos de tiempo a que se puede hacer referencia en estudios de factores pronósticos, nos centraremos en el que resulta más representativo y de más adecuada validación en otras series: la supervivencia global.

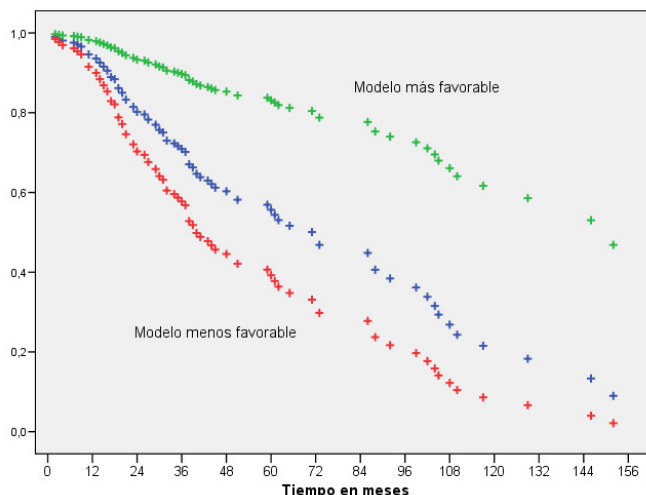
Tabla 57: Variables incluidas en el modelo pronóstico resultante de nuestro estudio mediante la realización de una regresión logística con los factores pronóstico obtenidos de los estudios univariantes. Supervivencia global.

Variable	Valor en el modelo de peor pronóstico	Valor en el modelo de mejor pronóstico
Género	Masculino	Femenino
Edad	≥ 70 años	< 70 años
Grado de Diferenciación	Bajo	Alto
c-myc	positivo	negativo
c-erb2	positivo	negativo
ciclina-E	positivo	negativo

Tabla 58: Variables incluidas en el modelo pronóstico resultante de nuestro estudio mediante la realización de una regresión logística con los factores pronóstico obtenidos de los estudios univariantes. Intervalo libre de enfermedad.

Variable	Valor en el modelo de peor pronóstico	Valor en el modelo de mejor pronóstico
Edad	≥ 70 años	< 70 años
Grado de Diferenciación	Bajo	Alto
c-myc	positivo	negativo
c-erb2	positivo	negativo
ciclina-E	positivo	negativo

Reproducimos de nuevo la tabla y la gráfica que explican el modelo.



MODELO PREDICTIVO MÁS FAVORABLE			MODELO PREDICTIVO MENOS FAVORABLE		
TIEMPO	Probabilidad de supervivencia estimada	IC 95 %	TIEMPO	Probabilidad de supervivencia estimada	IC 95 %
1 año	98,3 %	99,3 % - 100 %	1 años	91,5 %	90,5 % - 92,6 %
3 años	89,7 %	86,8 % - 92,7 %	3 años	57,7 %	54,8 % - 60,7 %
5 años	83,1 %	79 % - 87,3 %	5 años	39,2 %	35,1 % - 43,4 %

La probabilidad de supervivencia entre dos supuestos pacientes con los valores más y menos favorables de las variables incluidas en el modelo es claramente distinta sobre todo a partir de los tres años de seguimiento. Es decir, un paciente varón, con un CBNM pobremente diferenciado y que presente una sobreexpresión de c-myc, c-erB2 y ciclina E (con los criterios que hemos definido previamente) presenta una probabilidad de estar vivo a 3 y 5 años del 57,7 % y el 39,2 % respectivamente. Sin embargo, una mujer con un CBNM bien diferenciado y sin sobreexpresión de las proteínas anteriores ve aumentada su probabilidad de supervivencia a 3 y 5 años hasta un 89,7 % y un 83,1 % respectivamente.

Así reflejado, pueden parecer unos resultados altamente provocadores, pues parece que queda definido un modelo pronóstico de gran valor estadístico (la comparación de estas curvas presenta un valor de p inferior a 0,001). Y podría inferirse de dichos resultados que la aplicación del modelo nos permitiría con una base de evidencia científica seleccionar qué pacientes son candidatos a un tratamiento adyuvante o a un seguimiento más exhaustivo tras la resección quirúrgica, conforme hemos planteado en la hipótesis de trabajo del presente proyecto de investigación. Sin embargo, centrarnos solamente en la mejor y peor curva de supervivencia tiene una seria limitación:

- El número de pacientes de nuestra serie que cumple los requisitos que definen el perfil de mejor pronóstico es de tan solo dos. Ello es debido básicamente a que esta curva más favorable incluye el género femenino, y en nuestro estudio solo aparecen incluidas diez mujeres.
- De la misma manera, el número de pacientes de la serie que cumple los requisitos que dan lugar al

patrón menos favorable es de 11, condicionado sobre todo porque solo 18 pacientes presentan sobreexpresión de c-erb2.

Esto no exime de valor al modelo, que de hecho queda avalado estadísticamente en la serie. Como ocurre en este tipo de modelos pronósticos, fijarnos tan solo en lo que ocurre con los pacientes con el mejor y el peor perfil da información muy visual y llamativa pero no refleja una correcta interpretación de los resultados. Hemos encontrado unas variables que se han comportado como factores pronósticos independientes en nuestra serie, con un peso estadístico representado por las tasas de riesgo (Hazard Ratio) que definimos en la tabla 47 y que combinadas podrían definir grupos de más o menos riesgo de mortalidad tras la resección de su tumor. Sería necesario correlacionar unas variables con otras para intentar definir no subgrupos de pacientes con mejor o peor pronóstico, sino subtipos de tumores de diferente comportamiento sobre los que poder actuar. Además estaría por ver si la intervención sobre los pacientes de peor pronóstico, bien con un seguimiento más intensivo, o bien con la administración de tratamiento adyuvante, modifica la historia natural de la enfermedad en estos pacientes, para lo cual habría que definir si estos factores que aquí nos han resultado pronósticos se comportan en su caso también como predictivos de respuesta a tratamiento, conforme a las definiciones que de estos dos términos hemos indicado previamente. Máxime cuando la quimioterapia adyuvante en estadios precoces ha demostrado un beneficio limitado a un 4-5 % de mejora en la supervivencia de manera global. Esto exige un número de pacientes a tratar para beneficiar a uno solo que podría no justificar su administración salvo que en efecto se definan factores predictivos de respuesta que complementen nuestros hallazgos.

Es por ello que la interpretación de un modelo pronóstico de estas características debe ser muy prudente, sin caer en la tentación de encasillar a pacientes de forma prospectiva en grupos de riesgo con fines traslacionales sin antes haber comprobado los hallazgos de este estudio.

5. ANÁLISIS CRÍTICO DE LA METODOLOGÍA PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO

Son muchos los estudios que a lo largo de las últimas dos décadas han tratado de identificar marcadores biomoleculares con repercusión pronóstica en oncología, y de forma particular en CBNM. Según hemos visto, los que realmente alcanzan relevancia clínica son muy limitados, y casi todos ellos lo deben a una susceptibilidad aumentada a un determinado tratamiento, que se presenta de forma poco menos que casual.

Son abundantes los estudios publicados (muchos de ellos los hemos ido refiriendo) que presentan diferentes marcadores que se comportan como factor pronóstico en varias series, e incluso en algún metaanálisis. Y sin embargo, series similares con metodologías de estudio equiparables no muestran este comportamiento, por lo que su posible aplicación práctica queda en el aire. ¿Por qué encontramos tantas diferencias en estudios a priori comparables? A la hora de responder a esta pregunta se señalan diferentes problemas (378):

- a. Diferencias metodológicas
- b. Mal diseño de los estudios
- c. Estudios y técnicas no estandarizados o no reproducibles
- d. Tamaños muestrales pequeños que limitan los análisis estadísticos
- e. Selección de los pacientes de forma retrospectiva y con frecuencia condicionando su inclusión a la disponibilidad de tejido suficiente para las determinaciones (que a su vez puede depender del propio tamaño del tumor o de las necesidades previas de material para el diagnóstico)
- f. Variabilidad en las propias técnicas de análisis, como la heterogeneidad demostrada entre anticuerpos de distintas casas comerciales a la hora de hacer determinaciones mediante IHQ

Probablemente hay más limitaciones, que hacen que muchos de los estudios publicados adolezcan de falta de rigor y en el momento que los hallazgos tratan de ser validados en series externas pierden toda significación.

De esta situación se hicieron eco en el año 2000 el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI) y la Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC) en su primera reunión sobre “diagnóstico en cáncer” que tuvo lugar en Dinamarca. De ella surgió un comité encargado de desarrollar un documento de consenso con las líneas de trabajo que deberían guiar a los estudios de marcadores biomoleculares en cáncer. Estas son las veinte recomendaciones que surgieron de ese grupo de trabajo sobre cómo debe estructurarse y qué debe incluir un estudio como el del presente proyecto:

Introducción

1. Definir el marcador o marcadores a analizar, los objetivos del estudio y una hipótesis de trabajo.

Material y métodos

2. Describir las características de los pacientes y los tumores, así como los criterios de inclusión y exclusión.
3. Describir los tratamientos recibidos y las indicaciones de cada uno de ellos
4. Describir el tipo de material biológico utilizado (incluidas las muestras de control), así como los métodos de preservación y almacenamiento
5. Describir el método de análisis empleado, incluyendo un protocolo detallado de la metodología de las técnicas empleadas, incluyendo los agentes o kits utilizados, los procedimientos de control de calidad, los análisis de reproducibilidad, métodos de cuantificación y definición de scores.

Diseño del estudio

6. Definir el método de selección de los casos, haciendo hincapié en si es prospectivo o retrospectivo y si se hizo algún tipo de estratificación (por ejemplo por estadio o edad). Incluir el período de tiempo en el que se incluyeron pacientes, el tiempo de seguimiento y la mediana de este tiempo de seguimiento.
7. Definir las variables clínicas analizadas
8. Enumerar las posibles variables candidatas a ser incluidas en modelos pronósticos
9. Razonar la conveniencia del tamaño muestral. Si el estudio se diseñó para detectar un efecto concreto, defi-

nir la potencia y tamaño de dicho efecto.

Metodología estadística

10. Describir los métodos estadísticos, incluyendo selección de variables, creación de modelos y actuación ante los valores perdidos.
11. Dejar claro cómo se manejaron los valores de los marcadores en el análisis. De ser relevante, hacer referencia a los métodos utilizados en la determinación de puntos de corte.

Resultados

Datos

12. Describir el diagrama de flujo de pacientes a lo largo del estudio, incluyendo el número de pacientes en cada paso del estudio y justificando las exclusiones. Para el análisis de subgrupos definir claramente el número de pacientes y de eventos.
13. Indicar la distribución en función de características demográficas básicas (al menos edad y género), variables pronósticas estándar (propias de la enfermedad) y marcadores tumorales (incluyendo el número de valores perdidos).

Análisis y presentación

14. Mostrar la relación entre el marcador y una serie de variables pronósticas estándar.
15. Presentar análisis univariantes que muestren la relación entre el marcador y la supervivencia, con una estimación del efecto (Hazard Ratio y probabilidad de supervivencia). Preferiblemente hacer estudios similares para todas las variables analizadas. Se recomienda el método de Kaplan-Meier para analizar el efecto de un marcador en el tiempo.
16. Para análisis multivariantes presentar el efecto estimado con su intervalo de confianza para cada marcador y en caso de desarrollar un modelo final, para todas las variables incluidas en el mismo.
17. Entre los resultados que se presentan mostrar los efectos estimados con su intervalo de confianza para un análisis donde se incluya el marcador y variables pronósticas estándar.
18. Si se han hecho, presentar resultados de otras investigaciones suplementarias, como análisis de sensibilidad o tests de validación interna.

Discusión

19. Interpretar los resultados en el contexto de las hipótesis planteadas inicialmente y de otros estudios relevantes. Incluir una discusión acerca de las limitaciones del estudio.
20. Discutir las implicaciones de los hallazgos para investigaciones futuras y su posible valor clínico.

Los autores de esta guía clínica, publicada de forma simultánea en diferentes revistas internacionales del ámbito de la oncología y la biología molecular, sugieren que estas directrices deben tenerse en cuenta no solo por los investigadores a la hora de desarrollar un estudio de estas características, sino también por editores y revisores de cara a optimizar la calidad de las publicaciones de este tipo e intentar así disminuir la heterogeneidad y variabilidad existentes en la actualidad en los resultados sobre efectos de posibles marcadores pronósticos en cáncer. Asi-

mismo defienden que el estudio de posibles factores predictivos debe realizarse en el seno de ensayos prospectivos a ser posible randomizados, para minimizar también el riesgo de sesgos y darles la validez necesaria.

Pensamos que nuestro estudio, si bien presenta importantes limitaciones a las que haremos referencia más adelante, se amolda aceptablemente bien a los parámetros establecidos por los grupos de trabajo de la NCI y la EORTC.

6. ASPECTOS DESTACABLES DEL ESTUDIO

En relación con la guía clínica comentada, y haciendo una aproximación crítica a nuestro proyecto de investigación, su metodología y resultados, procede una reflexión razonada de los puntos que dan valor a los hallazgos aquí presentados:

Homogeneidad de una serie quirúrgica

Lo hemos mencionado en muchos momentos a lo largo del estudio. De hecho nos parece la característica más importante del proyecto. La selección de la serie ha sido muy rigurosa. Si queremos hablar de pacientes con CBNM en estadios precoces, lo más importante es unificar al máximo las variables quirúrgicas. El equipo quirúrgico ha sido el mismo (tres únicos cirujanos), todas las resecciones han cumplido criterios de “oncológicamente completas”, se ha realizado disección ganglionar mediastínica sistemática en todos los procedimientos, etc.

Ajuste adecuado de las variables demográficas y las propias del tumor

Salvo el género y la edad, que influyeron en el pronóstico y ya hemos comentado, el resto de variables demográficas de los pacientes y los tumores no afectaron a la supervivencia global ni libre de enfermedad. Tampoco algunas que podrían a priori limitar la homogeneidad de la serie, como el estadio (I o II), el TNM (T1 vs T2 o N0 vs N1), el tipo histológico o el tipo de resección quirúrgica. El grado de diferenciación presentó una tendencia casi significativa a actuar como factor pronóstico. La utilidad clínica de un modelo predictivo basado en variables biomoleculares, como defienden Subramanian y Simon (379), pasa porque prediga mejor el pronóstico que un modelo basado en variables clásicas, como el género, la edad, el tipo de resección o el propio TNM. En nuestro caso los factores clásicos no llegan a definir grupos pronósticos claros, por lo que los hallazgos relacionados con los factores biomoleculares tienen más valor. Además, pese a que el estudio comenzó hace más de una década y la estadificación se hizo en base a la sexta edición del TNM, no se ha visto influenciado por la modificación en la clasificación de los tumores realizada a raíz de la definición de la séptima edición, por lo que el estudio es válido y homogéneo a día de hoy.

Este hecho (la relativa antigüedad) nos ha permitido evitar un sesgo muy importante que se ha venido demostrando en los últimos años y del que hemos hablado: el género. Se trata de una serie con más del 90 % de varones. Probablemente el CBNM de la mujer, sobre todo no fumadora, es una enfermedad diferente al de varones, o al menos al de varones fumadores. Esto reduce el campo de aplicación de los resultados de nuestro estudio, pero una

vez más muestra que la serie objeto del mismo está bastante bien definida.

Por último, cabe destacar que variables como la del diagnóstico preoperatorio no influyen en los resultados ni en la selección de los pacientes, por cuanto ésta comienza cuando se ha realizado la resección quirúrgica y se confirma que se trata de un CBNM en estadio precoz. Tampoco influye que los pacientes fuesen intervenidos sin la realización previa de un PET-CT, dada la época en que se realizó la cirugía. Por el mismo motivo, lo que pasó antes de la intervención no influyó en la selección de pacientes, que es posterior.

Seguimiento y recogida prospectiva de los datos

Todos los pacientes del estudio fueron seguidos durante al menos cinco años. El seguimiento se hizo de forma homogénea, con implicación del equipo quirúrgico, de manera que la introducción de los datos se realizó de forma prospectiva a tiempo real. Solo los análisis biomoleculares se realizaron a posteriori. Los protocolos de seguimiento fueron los mismos durante todo el estudio, por lo que la interpretación de los datos derivados de medir el intervalo libre de enfermedad fue homogénea. Al estar basado el momento de recidiva en una interpretación de datos radiológicos, hemos de decir que el equipo de radiólogos que interpretó las imágenes fue también el mismo, reducido a un número de dos.

Homogeneidad en la manipulación de las muestras y en el protocolo de estudio de laboratorio

Todas las muestras fueron tratadas desde el momento de su obtención en quirófano hasta la lectura del tissue-array de forma homogénea y siguiendo protocolos de actuación muy estrictos. Los dos patólogos que realizaron las lecturas de los arrays fueron los mismos durante todo el estudio. En el centro existía desde el principio experiencia en el manejo de estas muestras, el diseño de matrices de tejido y la lectura de las mismas.

Implicaciones traslacionales

En unos tiempos en que los estudios de expresión génica parecen hacer dejado de lado los análisis de expresión proteica, encontrar proteínas (cuantificables por inmunohistoquímica) que pueden actuar como factor pronóstico nos parece suficiente como para llamar la atención sobre el papel de la proteómica en la selección de pacientes de riesgo para posibles terapias adyuvantes. La accesibilidad a la inmunohistoquímica en cualquier laboratorio de anatomía patológica y los costes más reducidos de esta técnica frente a otras más complejas para identificación de perfiles génicos (basados habitualmente en técnicas de reacción en cadena de polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-PCR) y a otras técnicas de secuenciación de DNA, dan un valor añadido a las conclusiones que pudiesen derivarse de nuestros hallazgos a la hora de plantear una eventual aplicación práctica a corto y medio plazo. No es objetivo de estudio el análisis de costes de los medios técnicos utilizados en comparación con técnicas de análisis genómicos, y mucho menos de su posible repercusión a nivel traslacional, pero la citada universalidad de la IHQ nos puede hacer pensar en llevarlo a cabo en un segundo tiempo.

Valor tanto de las proteínas que han resultados pronósticas como las que no han mostrado ese efecto

A menudo encontramos publicados estudios que han obtenido resultados positivos en la identificación de factores pronósticos. Sin embargo muchas investigaciones sin resultados en este sentido no llegan a ver la luz en el magma a veces confuso de la literatura científica. Sin embargo, creemos que todos los hallazgos son importantes, y los resultados positivos se sirven para su interpretación de los hallazgos negativos, pues a menudo los protocolos o la metodología de los estudios difieren. Por ello nuestro estudio tiene tanto valor potencial por las variables que han funcionado como factores pronósticos, como por aquellas que no lo han hecho, en tanto en cuanto la metodología utilizada ha sido la misma para todas. A la hora de plantear una validación de los hallazgos, bien en una serie interna, como en una serie ajena, habrá que tener también en cuenta los resultados de aquellas variables que no han dado resultados positivos en nuestra serie de partida.

7. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Es este uno de los aspectos más importantes en investigación, pero adquiere si cabe mayor trascendencia al hablar de biología molecular potencialmente aplicable a la práctica clínica. En nuestro caso son varias las limitaciones que obligan a ser cautos con los hallazgos que hemos presentado:

Posibles sesgos en la selección de pacientes y proteínas a analizar

Si bien se trata de una serie bastante homogénea, es cierto que se ha seleccionado de forma retrospectiva. De los criterios de inclusión utilizados, alguno puede dar lugar a sesgos:

- a) El criterio “disponibilidad de muestra en parafina adecuada para la determinación de expresión proteica por IHQ” puede introducir sesgos si pensamos que la existencia o no de este material adecuado puede distribuirse de forma no homogénea en la muestra.
- b) Aunque la selección incluye pacientes con CBNM completamente reseado en estadio precoz, se han considerado dos grupos con a priori peor pronóstico como son los estadios I y los estadios II. Más aún, no se trata de una serie de estadios I y II, ya que algunos de dichos estadios II se han descartado (como los T3). Si bien en nuestra serie no ha habido diferencias en la supervivencia en función del estadio o del TNM, sí podrían darse en una serie que se utilizara como validación de nuestro modelo, o con intención de reproducir los hallazgos, lo cual podría dar lugar a diferencias en los resultados encontrados.
- c) Se han incluido resecciones segmentarias, que si bien en nuestra serie no se han asociado a un peor pronóstico, per se pueden conllevar peores resultados, especialmente si se trata de resecciones no anatómicas.
- d) No se ha discriminado en la selección entre adenocarcinomas, epidermoides y tumores indiferenciados. Hoy sabemos que desde el punto de vista de perfiles genéticos y de expresión proteica parecen comportarse de forma diferente. Aunque en nuestra serie los análisis estadísticos en relación a expresión de proteínas y resultados en términos de supervivencia o intervalo libre de enfermedad se han ajustado por tipo histológico, muchos investigadores abogan en el momento actual por seleccionar de entrada series de un solo tipo his-

- tológico, especialmente orientadas al adenocarcinoma, que por el momento es el tipo de tumor que presenta más mutaciones y alteraciones biomoleculares susceptibles de condicionar terapias dirigidas.
- e) No se han descartado los 10 casos de mujeres incluidos en nuestro estudio. Muchos hallazgos recientes hacen pensar, como ya hemos comentado, que el CBNM tiene un comportamiento y un perfil diferente por género. Nuestras conclusiones deberían entenderse como dentro de una serie de gran predominio masculino.
- f) El panel de proteínas a analizar se ha realizado de forma relativamente aleatoria, tomando como referencia los antecedentes publicados en la literatura en el momento de hacer la selección, pero también la disponibilidad de anticuerpos para su determinación en el laboratorio de anatomía patológica donde se ha realizado el estudio.

Posibles variaciones en las determinaciones inmunohistoquímicas

Se ha demostrado que el tipo de anticuerpo utilizado para la determinación de la expresión de las distintas proteínas puede conllevar una pequeña variabilidad que podría influir en la reproducibilidad de los análisis. Por eso detallamos la marca comercial de los mismos. En el tiempo, estas marcas pueden no estar disponibles, dando lugar a posibles variaciones difíciles de controlar.

Asimismo los puntos de corte para la consideración de la positividad de una proteína han sido establecidos en base a estudios previos publicados y a algunos factores subjetivos, como son la distribución de frecuencias de los distintos scores o puntuaciones dadas a cada patrón de expresión. Hay diversidad de opiniones acerca de cómo deben establecerse esos puntos de corte.

Por último, sería importante correlacionar los hallazgos que hemos descrito a nivel IHQ con la determinación a nivel génico de la expresión de las correspondientes proteínas analizadas para ver si es extrapolable un tipo de análisis a otro.

Necesidad de validación de los resultados

Todo modelo pronóstico exige una doble validación a la hora de plantear su posible aplicación en la clínica. Inicialmente una validación en una serie equiparable; pero idealmente es importante desarrollar un estudio prospectivo que permita la inclusión de pacientes tomando como referencia el modelo pronóstico desarrollado y comprobando en el tiempo que se comporta como tal. Este paso se realizará necesariamente como complemento a esta tesis doctoral.

Aplicación en la clínica en función de los resultados

Como indica claramente Subramanian (379), un modelo pronóstico biomolecular en CBNM puede considerarse útil desde el punto de vista traslacional si cumple dos condiciones: 1) que es más efectivo que un modelo pronóstico clásico como puede ser el propio TNM, pero también el basado en factores histológicos, como la infiltración vascular o linfática, el grado de diferenciación, etc.), y 2) que no solo identifica pacientes en estadio I

candidatos a tratamiento quimioterápico, sino que también es capaz de determinar qué pacientes en estadio II (supuestamente con indicación de adyuvancia según estudios clásicos) no se beneficiarán de tal adyuvancia, pudiendo por tanto evitarla. La comparación entre el modelo pronóstico clásico y un eventual modelo pronóstico biomolecular como el nuestro se hace desde el punto de vista estadístico comparando las áreas bajo las correspondientes curvas ROC (acrónimo de *Receiver Operating Characteristic*, o *Característica Operativa del Receptor*).

Nosotros no hemos partido de un modelo pronóstico basado en factores clásicos en nuestra serie, por lo que no hemos hecho esta comparación y no podemos decir si predice mejor el modelo biomolecular desarrollado que uno distinto clásico que pudiéramos diseñar. En cualquier caso los factores clásicos los hemos analizado convenientemente y aquellos que han funcionado como pronósticos los hemos incluido en el modelo, por lo que no pensamos que se trate de un método exclusivo biomolecular llamado a sustituir a otros establecidos como el TNM. En cualquier caso, en el momento actual, pese a que muchas de las variables de las que habla Subramanian han resultado comportarse como pronósticas en series parecidas a las nuestras, en la práctica clínica la utilización de estos resultados para la toma de decisiones es muy limitada, por lo que no constituyen un modelo con el cual comparar nuestros resultados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

▪ CONCLUSIONES AL OBJETIVO PRINCIPAL:

La sobreexpresión de las proteínas c-myc, c-erb2 y ciclina E en muestras tumorales de carcinoma broncogénico no microcítico completamente resecado en estadios I y II, se asoció de forma independiente y estadísticamente significativa a un peor pronóstico de los pacientes, en términos de supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, mientras que la sobreexpresión de las proteínas ciclina A, cdk1, cdk-2, p16, p53, p27, pRb, mdm2, EGFR, c-kit, caspasa 3a, catepsina D, msh2, mlh1, e-cadherina, beta-catenina, topoisomerasa II alfa y timidilato sintasa no influyó en el pronóstico.

▪ CONCLUSIONES A LOS OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Las proteínas ciclina A, msh2, mlh1, pRb, e-cadherina y EGFR se sobreexpresaron en mayor medida en el carcinoma epidermoide. Las proteínas timidilato sintasa, catepsina D y c-erb2 lo hicieron en el adenocarcinoma. Las restantes proteínas (c-myc, cdk1, cdk-2, p16, p53, p27, mdm2, c-kit, caspasa 3a, beta-catenina y topoisomerasa II alfa) no presentaron diferencias en la expresión en función del tipo histológico.
2. La edad a partir de 70 años y el grado de diferenciación se comportaron como factores de mal pronóstico de supervivencia global y libre de enfermedad. El género, el tipo histológico, el estadio, la clasificación TNM y el tipo de resección no actuaron como factores pronósticos.
3. Las variables “*expresión de c-myc*”, “*expresión de c-erb-2*”, “*expresión de ciclina E*”,

“género”, “edad” y “grado de diferenciación”, constituyeron un modelo pronóstico de supervivencia global.

Las variables “expresión de *c-myc*”, “expresión de *c-erb-2*”, “expresión de ciclina E”, “edad” y “grado de diferenciación”, constituyeron un modelo pronóstico de supervivencia libre de recidiva.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest*. 1986 Apr;89(4 Suppl):225S-33S.
2. Sánchez de Cos J. El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamiento actuales. *Arch Bronconeumol*. 2009 Jul;45(7):341-48.
3. cancer.org. What are the key statistics about lung cancer? 2012 17/02/2012 [cited 2012; Available from: <http://www.cancer.org/Cancer/LungCancer-Non-SmallCell/DetailedGuide/non-small-cell-lung-cancer-key-statistics>
4. How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the surgeon general. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2010.
5. Treasure T, Utlei M. Survival after resection for primary lung cancer. *Thorax*. 2006 Aug;61(8):649-50.
6. Butler CA, Darragh KM, Currie GP, Anderson WJ. Variation in lung cancer survival rates between countries: do differences in data reporting contribute? *Respir Med*. 2006 Sep;100(9):1642-6.
7. de Cos JS, Miravet L, Abal J, Núñez A, Muñoz FJ, García L, et al. Lung cancer survival in Spain and prognostic factors: a prospective, multiregional study. *Lung Cancer*. 2008 Feb;59(2):246-54.
8. Donington JS, Colson YL. Sex and gender differences in non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Summer;23(2):137-45.
9. Paggi MG, Vona R, Abbruzzese C, Malorni W. Gender-related disparities in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett*. 2010 Dec 1;298(1):1-8.
10. Ezzati M, Lopez AD. Measuring the accumulated hazards of smoking: global and regional estimates for 2000. *Tob Control*. 2003 Mar;12(1):79-85.
11. Malkinson AM. Primary lung tumors in mice: an experimentally manipulable model of human adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1992 May 1;52(9 Suppl):2670s-6s.
12. Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, Rodenhuis S. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst*. 1991 Jul 17;83(14):1024-7.
13. Doll R, Peto R. Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among regular smokers and lifelong non-smokers. *J Epidemiol Community Health*. 1978 Dec;32(4):303-13.
14. Warren GW, Singh AK. Nicotine and lung cancer. *J Carcinog*. 2013 Jan 31;12:1.
15. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):21S-49S.
16. Taylor DH, Jr., Hasselblad V, Henley SJ, Thun MJ, Sloan FA. Benefits of smoking cessation for longevity. *Am J Public Health*. 2002 Jun;92(6):990-6.
17. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer*. 2005 Oct 3;93(7):825-33.
18. Etzel CJ, Amos CI, Spitz MR. Risk for smoking-related cancer among relatives of lung cancer patients. *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8531-5.
19. Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Apr;12(4):359-65.
20. Campa D, Zienolddiny S, Maggini V, Skaug V, Haugen A, Canzian F. Association of a common polymor-

- phism in the cyclooxygenase 2 gene with risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*. 2004 Feb;25(2):229-35.
21. Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Wiest JS, et al. A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet*. 2004 Sep;75(3):460-74.
 22. Boffetta P, Nyberg F. Contribution of environmental factors to cancer risk. *Br Med Bull*. 2003 Jan;68:71-94.
 23. Larkin EK, Smith TJ, Stayner L, Rosner B, Speizer FE, Garshick E. Diesel exhaust exposure and lung cancer: adjustment for the effect of smoking in a retrospective cohort study. *Am J Ind Med*. 2000 Oct;38(4):399-409.
 24. Gustavsson P, Jakobsson R, Nyberg F, Pershagen G, Jarup L, Scheele P. Occupational exposure and lung cancer risk: a population-based case-referent study in Sweden. *Am J Epidemiol*. 2000 Jul 1;152(1):32-40.
 25. Santillan AA, Camargo CA, Jr., Colditz GA. A meta-analysis of asthma and risk of lung cancer (United States). *Cancer Causes Control*. 2003 May;14(4):327-34.
 26. Spitz MR, Hong WK, Amos CI, Wu X, Schabath MB, Dong Q, et al. A risk model for prediction of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007 May 2;99(9):715-26.
 27. Travis W.D, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, editors. *Pathology and genetics: tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: IARC; 2004.
 28. Travis WD, Colby TV, Corrin B, Brambilla E, Shimosato Y. *Histologic Typing of Lung and Pleural Tumors-The World Health Organization (WHO) Classification of Lung Cancer*. 3rd ed. Berlin: Springer-Berlag; 1999.
 29. Travis WD. *Pathology of lung cancer*. *Clin Chest Med*. 2011 Dec;32(4):669-92.
 30. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, 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*. Feb;6(2):244-85.
 31. Fraser R. S, Colman N., Müller N. L., Paré P.D. Neoplasias pulmonares. In: Masson, editor. *Fundamentos de las Enfermedades del Tórax*. 3ª ed. Barcelona: Masson; 2006. p. 342-44.
 32. Bryant A, Cerfolio RJ. Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer. *Chest*. 2007 Jul;132(1):185-92.
 33. Strauss GM, Kwiatkowski DJ, Harpole DH, Lynch TJ, Skarin AT, Sugarbaker DJ. Molecular and pathologic markers in stage I non-small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol*. 1995 May;13(5):1265-79.
 34. Topol M, Maslon A. The problem of direct lymph drainage of the bronchopulmonary segments into the mediastinal and hilar lymph nodes. *Clin Anat*. 2009 May;22(4):509-16.
 35. Rocco G. Results of cutting-edge surgery in stage IIIA-N2 nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2009 Mar;21(2):105-9.
 36. Denoix PF. Enquet permanent dans les centres anticancereux. *Bull Inst Nat Hyg*. 1946;1:70-5.
 37. International Union Against Cancer (UICC) Committee on TNM classification. *Malignant tumors of the lung: clinical stage classification and presentation of results*. Geneva; 1966.
 38. Feinstein AR, Bondy PK. A new staging system for cancer, and a re-appraisal of "early" treatment and "cure" by radical surgery. *Trans Assoc Am Physicians*. 1967;80:111-22.
 39. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest*. 1997 Jun;111(6):1718-23.
 40. Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1978 Dec;76(6):832-9.
 41. Vasallo B. Historia de la estadificación del carcinoma broncogénico. In: Vasallo B, editor. *Estadificación del carcinoma broncogénico*. Barcelona: Caduceo Multimedia S.L; 2005. p. 13-51.
 42. Miller SJ. Staging of lung cancer. In: Roth JA, Ruckdeschel, J.C., Weisenburger, T.H., editor. *Thoracic Oncology*. Philadelphia: WB Saunders; 1989. p. 142-55.
 43. Hermanex P, Sobin, L.H. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 4th ed. Berlin: Springer Verlag; 1987.
 44. American Joint Committee on Cancer. *Manual for Staging Lung Cancer*. 3rd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Co; 1988.

45. American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 5th ed. Philadelphia: Lipincott Raven; 1997.
46. UICC International Union Against Cancer. TNM Classification of Malignant Tumours. 5th ed. New York: Wiley-Liss; 1997.
47. Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997 Jun;111(6):1710-7.
48. Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007 Aug;2(8):694-705.
49. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007 Aug;2(8):706-14.
50. Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007 Jul;2(7):593-602.
51. Crowley JJ, LeBlanc, M., Jacobson, J. Some exploratory tools for survival analysis. In: Lin DY, Fleming, T.R., editors. *Proceedings of the First Seattle Symposium in Biostatistics: Survival Analysis*. 1st ed. New York: Springer; 1997. p. 199-229.
52. Giroux DJ, Rami-Porta R, Chansky K, Crowley JJ, Groome PA, Postmus PE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: data elements for the prospective project. *J Thorac Oncol*. 2009 Jun;4(6):679-83.
53. Lim E, Goldstraw P, Nicholson AG, Travis WD, Jett JR, Ferolla P, et al. Proceedings of the IASLC International Workshop on Advances in Pulmonary Neuroendocrine Tumors 2007. *J Thorac Oncol*. 2008 Oct;3(10):1194-201.
54. Toloza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):137S-46S.
55. Silvestri GA, Gould MK, Margolis ML, Tanoue LT, McCrory D, Toloza E, et al. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007 Sep;132(3 Suppl):178S-201S.
56. Wang J, Welch K, Wang L, Kong FM. Negative predictive value of positron emission tomography and computed tomography for stage T1-2N0 non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Lung Cancer*. Mar;13(2):81-9.
57. Dhillon SS, Dhillon JK, Yendamuri S. Mediastinal staging of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med*. Dec;5(6):835-50.
58. Gomez M, Silvestri GA. Endobronchial ultrasound for the diagnosis and staging of lung cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 Apr 15;6(2):180-6.
59. Adams K, Shah PL, Edmonds L, Lim E. Test performance of endobronchial ultrasound and transbronchial needle aspiration biopsy for mediastinal staging in patients with lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2009 Sep;64(9):757-62.
60. Talebian M, von Bartheld MB, Braun J, Versteegh MI, Dekkers OM, Rabe KF, et al. EUS-FNA in the preoperative staging of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010 Jul;69(1):60-5.
61. Kuzdzal J, Szlubowski A. Ultrasound-guided transbronchial and transesophageal needle biopsy in the mediastinal staging of lung cancer. *Thorac Surg Clin*. 2012 May;22(2):191-203.
62. De Leyn P, Lardinois D, Van Schil PE, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M, et al. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007 Jul;32(1):1-8.
63. Rami-Porta R, Call S. Invasive staging of mediastinal lymph nodes: mediastinoscopy and remediastinoscopy. *Thorac Surg Clin*. 2012 May;22(2):177-89.
64. Mateu-Navarro M, Rami-Porta R, Bastus-Piulats R, Cirera-Nogueras L, Gonzalez-Pont G. Remediastinoscopy

- after induction chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2000 Aug;70(2):391-5.
65. D'Andrilli A, Venuta F, Rendina EA. The role of lymphadenectomy in lung cancer surgery. *Thorac Surg Clin.* 2012 May;22(2):227-37.
66. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009 May;4(5):568-77.
67. Lardinois D, De Leyn P, Van Schil P, Porta RR, Waller D, Passlick B, et al. ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Nov;30(5):787-92.
68. Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery. Intraoperative lymph node staging in bronchogenic carcinoma surgery. Consensus report]. *Arch Bronconeumol.* 2001 Dec;37(11):495-503.
69. Manser R, Wright G, Hart D, Byrnes G, Campbell DA. Surgery for early stage non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005(1):CD004699.
70. Wright G, Manser RL, Byrnes G, Hart D, Campbell DA. Surgery for non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Thorax.* 2006 Jul;61(7):597-603.
71. Wu Y, Huang ZF, Wang SY, Yang XN, Ou W. A randomized trial of systematic nodal dissection in resectable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002 Apr;36(1):1-6.
72. Darling GE, Allen MS, Decker PA, Ballman K, Malthaner RA, Inculet RI, et al. Randomized trial of mediastinal lymph node sampling versus complete lymphadenectomy during pulmonary resection in the patient with N0 or N1 (less than hilar) non-small cell carcinoma: results of the American College of Surgery Oncology Group Z0030 Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Mar;141(3):662-70.
73. Keller SM, Adak S, Wagner H, Johnson DH. Mediastinal lymph node dissection improves survival in patients with stages II and IIIa non-small cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group. *Ann Thorac Surg.* 2000 Aug;70(2):358-65; discussion 65-6.
74. Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT, Rocco G, Sculier JP, Varela G, et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *Eur Respir J.* 2009 Jul;34(1):17-41.
75. Benzo R, Kelley GA, Recchi L, Hofman A, Sciarba F. Complications of lung resection and exercise capacity: a meta-analysis. *Respir Med.* 2007 Aug;101(8):1790-7.
76. Brunelli A, Pompili C, Berardi R, Mazzanti P, Onofri A, Salati M, et al. Performance at preoperative stair-climbing test is associated with prognosis after pulmonary resection in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2012 Jun;93(6):1796-800.
77. Brunelli A, Pompili C, Berardi R, Mazzanti P, Onofri A, Salati M, et al. Performance at preoperative stair-climbing test is associated with prognosis after pulmonary resection in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2008 Jun;93(6):1796-800.
78. Brunelli A, Refai M, Xiume F, Salati M, Marasco R, Sciarra V, et al. Oxygen desaturation during maximal stair-climbing test and postoperative complications after major lung resections. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008 Jan;33(1):77-82.
79. Brunelli A, Refai M, Xiume F, Salati M, Sciarra V, Socci L, et al. Performance at symptom-limited stair-climbing test is associated with increased cardiopulmonary complications, mortality, and costs after major lung resection. *Ann Thorac Surg.* 2008 Jul;86(1):240-7.
80. Bobbio A, Chetta A, Ampollini L, Primomo GL, Internullo E, Carbognani P, et al. Preoperative pulmonary rehabilitation in patients undergoing lung resection for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008 Jan;33(1):95-8.
81. Varela G, Ballesteros E, Jimenez MF, Novoa N, Aranda JL. Cost-effectiveness analysis of prophylactic respiratory physiotherapy in pulmonary lobectomy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Feb;29(2):216-20.
82. Sekine Y, Chiyo M, Iwata T, Yasufuku K, Furukawa S, Amada Y, et al. Perioperative rehabilitation and physiotherapy for lung cancer patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg.*

2005 May;53(5):237-43.

83. Sarna L, Padilla G, Holmes C, Tashkin D, Brecht ML, Evangelista L. Quality of life of long-term survivors of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Jul 1;20(13):2920-9.

84. Pompili C, Salati M, Refai M, Berardi R, Onofri A, Mazzanti P, et al. Preoperative quality of life predicts survival following pulmonary resection in stage I non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013 May;43(5):905-10.

85. Bringas S, Krikorian A., Hernando F., Rodriguez O., Jarabo JR., Fernández E., Gómez AM., Calatayud J., Olivares ME., Balibrea JL. Protocolo de Intervención psicosocial en pacientes oncológicos sometidos a cirugía torácica. *Psicooncología*. 2006;3(2-3):407-22.

86. Whitson BA, Groth SS, Duval SJ, Swanson SJ, Maddaus MA. Surgery for early-stage non-small cell lung cancer: a systematic review of the video-assisted thoracoscopic surgery versus thoracotomy approaches to lobectomy. *Ann Thorac Surg*. 2008 Dec;86(6):2008-16.

87. Gharagozloo F, Margolis M, Tempesta B, Strother E, Najam F. Robot-assisted lobectomy for early-stage lung cancer: report of 100 consecutive cases. *Ann Thorac Surg*. 2009 Aug;88(2):380-4.

88. Rami-Porta R, Wittekind C, Goldstraw P. Complete resection in lung cancer surgery: proposed definition. *Lung Cancer*. 2005 Jul;49(1):25-33.

89. Jensik RJ. Miniresection of small peripheral carcinomas of the lung. *Surg Clin North Am*. 1987 Oct;67(5):951-8.

90. Pettiford BL, Schuchert MJ, Santos R, Landreneau RJ. Role of sublobar resection (segmentectomy and wedge resection) in the surgical management of non-small cell lung cancer. *Thorac Surg Clin*. 2007 May;17(2):175-90.

91. Ginsberg RJ, Rubinstein LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Ann Thorac Surg*. 1995 Sep;60(3):615-22.

92. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, Kabasawa K. Survival following lobectomy vs limited resection for stage I lung cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2005 Mar 28;92(6):1033-7.

93. Stiles BM, Altorki, N.K. Segmentectomy versus lobectomy for stage I lung cancer in patients with good pulmonary function. In: Ferguson MK, editor. *Difficult Decisions in Thoracic Surgery*. 2nd ed. London: Springer; 2011. p. 125-33.

94. Ettinger DS, Akerley W, Bepler G, Blum MG, Chang A, Cheney RT, et al. Non-small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010 Jul;8(7):740-801.

95. Schuchert MJ, Abbas G, Pennathur A, Nason KS, Wilson DO, Luketich JD, et al. Sublobar resection for early-stage lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 Spring;22(1):22-31.

96. Gaissert HA, Mathisen DJ, Moncure AC, Hilgenberg AD, Grillo HC, Wain JC. Survival and function after sleeve lobectomy for lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 May;111(5):948-53.

97. Strauss GM, Herndon JE 2nd, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol*. 2008 Nov 1;26(31):5043-51.

98. Martini N, Burt ME, Bains MS, McCormack PM, Rusch VW, Ginsberg RJ. Survival after resection of stage II non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1992 Sep;54(3):460-5.

99. Gilligan D, Nicolson M, Smith I, Groen H, Dalesio O, Goldstraw P, et al. Preoperative chemotherapy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of the MRC LU22/NVALT 2/EORTC 08012 multicentre randomised trial and update of systematic review. *Lancet*. 2007 Jun 9;369(9577):1929-37.

100. Milleron B, Westeel V, Quoix E, Moro-Sibilot D, Braun D, Lebeau B, et al. Complete response following preoperative chemotherapy for resectable non-small cell lung cancer: accuracy of clinical assessment using the French trial database. *Chest*. 2005 Sep;128(3):1442-7.

101. Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jan

22;350(4):351-60.

102. Downey RJ, Martini N, Rusch VW, Bains MS, Korst RJ, Ginsberg RJ. Extent of chest wall invasion and survival in patients with lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1999 Jul;68(1):188-93.

103. Gould PM, Bonner JA, Sawyer TE, Deschamps C, Lange CM, Li H. Patterns of failure and overall survival in patients with completely resected T3 N0 M0 non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Aug 1;45(1):91-5.

104. Stoelben E, Ludwig C. Chest wall resection for lung cancer: indications and techniques. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2009 Mar;35(3):450-6.

105. Dilege S, Toker A, Tanju S, Ziyade S, Kilicaslan Z, Yilmazbayhan D, et al. Chest wall invasion in lung cancer patients. *Acta Chir Belg.* 2003 Aug;103(4):396-400.

106. Detterbeck FC. Changes in the treatment of Pancoast tumors. *Ann Thorac Surg.* 2003 Jun;75(6):1990-7.

107. Kunitoh H, Kato H, Tsuboi M, Shibata T, Asamura H, Ichinose Y, et al. Phase II trial of preoperative chemoradiotherapy followed by surgical resection in patients with superior sulcus non-small-cell lung cancers: report of Japan Clinical Oncology Group trial 9806. *J Clin Oncol.* 2008 Feb 1;26(4):644-9.

108. Wright CD, Menard MT, Wain JC, Donahue DM, Grillo HC, Lynch TJ, et al. Induction chemoradiation compared with induction radiation for lung cancer involving the superior sulcus. *Ann Thorac Surg.* 2002 May;73(5):1541-4.

109. Rusch VW, Giroux DJ, Kraut MJ, Crowley J, Hazuka M, Johnson D, et al. Induction chemoradiation and surgical resection for non-small cell lung carcinomas of the superior sulcus: Initial results of Southwest Oncology Group Trial 9416 (Intergroup Trial 0160). *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Mar;121(3):472-83.

110. Deslauriers J, Tronc F, Gregoire J. History and current status of bronchoplastic surgery for lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Jan;57(1):3-9.

111. Yan TD, Black D, Bannon PG, McCaughan BC. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2009 May 20;27(15):2553-62.

112. Robinson LA, Ruckdeschel JC, Wagner H, Jr., Stevens CW. Treatment of non-small cell lung cancer-stage IIIA: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007 Sep;132(3 Suppl):243S-65S.

113. Stamatis G. Risks of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy. *Thorac Surg Clin.* 2008 Feb;18(1):71-80.

114. Jiménez MF, Varela, G., Novoa, N.M., Aranda, J.L. Results of surgery for non-small cell lung cancer with N2 involvement unsuspected before thoracotomy. *Arch Bronconeumol.* 2008 Feb;44(2):65-9.

115. De Leyn P, Stroobants S, De Wever W, Lerut T, Coosemans W, Decker G, et al. Prospective comparative study of integrated positron emission tomography-computed tomography scan compared with remediastinoscopy in the assessment of residual mediastinal lymph node disease after induction chemotherapy for mediastinoscopy-proven stage IIIA-N2 Non-small-cell lung cancer: a Leuven Lung Cancer Group Study. *J Clin Oncol.* 2006 Jul 20;24(21):3333-9.

116. Marra A, Hillejan L, Fechner S, Stamatis G. Remediastinoscopy in restaging of lung cancer after induction therapy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Apr;135(4):843-9.

117. Lim E, Dusmet M. Remediastinoscopy: a statistical reinterpretation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Jan;137(1):254-5.

118. Cerfolio RJ, Maniscalco L, Bryant AS. The treatment of patients with stage IIIA non-small cell lung cancer from N2 disease: who returns to the surgical arena and who survives. *Ann Thorac Surg.* 2008 Sep;86(3):912-20.

119. Roberts JR, Eustis C, Devore R, Carbone D, Choy H, Johnson D. Induction chemotherapy increases perioperative complications in patients undergoing resection for non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2001 Sep;72(3):885-8.

120. Detterbeck F. What to do with "Surprise" N2?: intraoperative management of patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2008 Mar;3(3):289-302.

121. Perrot E, Guibert B, Mulsant P, Blandin S, Arnaud I, Roy P, et al. Preoperative chemotherapy does not increase complications after nonsmall cell lung cancer resection. *Ann Thorac Surg.* 2005 Aug;80(2):423-7.
122. Okumura T, Asamura H, Suzuki K, Kondo H, Tsuchiya R. Intrapulmonary metastasis of non-small cell lung cancer: a prognostic assessment. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Jul;122(1):24-8.
123. Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, Grunenwald D, et al. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant Cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Jan 1;28(1):35-42.
124. Garrido P, Gonzalez-Larriba JL, Insa A, Provencio M, Torres A, Isla D, et al. Long-term survival associated with complete resection after induction chemotherapy in stage IIIA (N2) and IIIB (T4N0-1) non small-cell lung cancer patients: the Spanish Lung Cancer Group Trial 9901. *J Clin Oncol.* 2007 Oct 20;25(30):4736-42.
125. Macchiarini P, Chapelier AR, Monnet I, Vannetzel JM, Rebeschung JL, Cerrina J, et al. Extended operations after induction therapy for stage IIIb (T4) non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1994 Apr;57(4):966-73.
126. Dartevelle F, G., Yildizeli, B., Mussot, S. Extended resections for lung cancer. In: Roth J, A., Cox, J., D., Hong, W., K., editor. *Lung Cancer.* Massachusetts: Blackwell Publishing; 2008. p. 194-200.
127. Shargall Y, de Perrot M, Keshavjee S, Darling G, Ginsberg R, Johnston M, et al. 15 years single center experience with surgical resection of the superior vena cava for non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2004 Sep;45(3):357-63.
128. Spaggiari L, Magdeleinat P, Kondo H, Thomas P, Leon ME, Rollet G, et al. Results of superior vena cava resection for lung cancer. Analysis of prognostic factors. *Lung Cancer.* 2004 Jun;44(3):339-46.
129. Shen KR, Meyers BF, Lerner JM, Jones DR. Special treatment issues in lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest.* 2007 Sep;132(3 Suppl):290S-305S.
130. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *Bmj.* 1995 Oct 7;311(7010):899-909.
131. Keller SM, Adak S, Wagner H, Herskovic A, Komaki R, Brooks BJ, et al. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIA non-small-cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group. *N Engl J Med.* 2000 Oct 26;343(17):1217-22.
132. Scagliotti GV, Novello S. Adjuvant therapy in completely resected non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol Rep.* 2003 Jul;5(4):318-25.
133. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005 Jun 23;352(25):2589-97.
134. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzalez-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006 Sep;7(9):719-27.
135. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 20;26(21):3552-9.
136. Pisters KM, Evans WK, Azzoli CG, Kris MG, Smith CA, Desch CE, et al. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIa resectable non small-cell lung cancer guideline. *J Clin Oncol.* 2007 Dec 1;25(34):5506-18.
137. Stewart L, Arriagada R., Brichet, A., H., Lafitte, J., J., Burdett, S., Girling, D., J., et al. Postoperative radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2005;2:25.
138. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Riggi M, Hurlteloup P, Mahe MA. Impact of postoperative radiation therapy on survival in patients with complete resection and stage I, II, or IIIA non-small-cell lung cancer treated with adjuvant chemotherapy: the adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA) Randomized Trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Nov 1;72(3):695-701.

139. Burdett S, Stewart LA, Rydzewska L. A systematic review and meta-analysis of the literature: chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006 Sep;1(7):611-21.
140. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT, 3rd, Shepherd FA, Smith C, et al. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet.* 2009 Aug 1;374(9687):379-86.
141. Spicer J, Chowdhury S, Harper P. Targeting novel and established therapies for non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* 2007 May 18;250(1):9-16.
142. Gettinger S. Targeted therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008 Jun;29(3):291-301.
143. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med.* 2003;54:73-87.
144. Sattler M, Abidoye O, Salgia R. EGFR-targeted therapeutics: focus on SCCHN and NSCLC. *Scientific World Journal.* 2008;8:909-19.
145. Shojaei F, Ferrara N. Antiangiogenic therapy for cancer: an update. *Cancer J.* 2007 Nov-Dec;13(6):345-8.
146. Herbst RS, Sandler AB. Non-small cell lung cancer and antiangiogenic therapy: what can be expected of bevacizumab? *Oncologist.* 2004;9 Suppl 1:19-26.
147. Vokes E, Herbst R, Sandler A. Angiogenesis inhibition in the treatment of lung cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2006 Nov;4(Suppl 23):1-10.
148. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006 Dec 14;355(24):2542-50.
149. Calman L, Beaver K, Hind D, Lorigan P, Roberts C, Lloyd-Jones M. Survival benefits from follow-up of patients with lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Thorac Oncol.* 2011 Dec;6(12):1993-2004.
150. Endo C, Sakurada A, Notsuda H, Noda M, Hoshikawa Y, Okada Y, et al. Results of long-term follow-up of patients with completely resected non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2012 Apr;93(4):1061-8.
151. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Feb;15(1):4-9.
152. Claiborne PM, Fowler CS, Vaporciyan AA. Follow-up of patients with resected thoracic malignancies. *Thorac Surg Clin.* 2012 Feb;22(1):123-31.
153. Goodgame B, Viswanathan A, Zoole J, Gao F, Miller CR, Subramanian J, et al. Risk of recurrence of resected stage I non-small cell lung cancer in elderly patients as compared with younger patients. *J Thorac Oncol.* 2009 Nov;4(11):1370-4.
154. Mollberg NM, Ferguson MK. Postoperative surveillance for non-small cell lung cancer resected with curative intent: developing a patient-centered approach. *Ann Thorac Surg.* 2013 Mar;95(3):1112-21.
155. Gospodarowicz M, K., O'Sullivan, B., Koh, E. Factores pronósticos: principios y aplicaciones. In: Goldstraw P, editor. *Manual de Estadificación en Oncología Torácica.* 1st ed. Denver: IASLC; 2009. pp. 109-26.
156. Gospodarowicz M, O'Sullivan, B., Bristow. Host and environment-related prognostic factors. In: Gospodarowicz M, Henson, D.E., Hutter R.V.O., editor. *Prognostic Factors in Cancer.* 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 2001. p. 71-94.
157. Chlebowski RT, Chen Z, Anderson GL, Rohan T, Aragaki A, Lane D, et al. Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Mar 16;97(6):439-48.
158. Batevik R, Grong K, Segadal L, Stangeland L. The female gender has a positive effect on survival independent of background life expectancy following surgical resection of primary non-small cell lung cancer: a study of absolute and relative survival over 15 years. *Lung Cancer.* 2005 Feb;47(2):173-81.
159. Freeman HP. Poverty, culture, and social injustice: determinants of cancer disparities. *CA Cancer J Clin.* 2004 Mar-Apr;54(2):72-7.
160. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest.* 2002 Sep;122(3):1037-57.
161. Solan MJ, Werner-Wasik M. Prognostic factors in non-small cell lung cancer. *Semin Surg Oncol.*

2003;21(2):64-73.

162. Brundage MD, Mackillop, W.J. Lung cancer. In: Gospodarowicz MK, Hutter, R.V.P., O'Sullivan B., editor. Prognostic factors in cancer. 2nd ed. New York: Wiley-Liss; 2001. p. 351-70.
163. O'Byrne KJ, Cox G, Swinson D, Richardson D, Edwards JG, Lolljee J, et al. Towards a biological staging model for operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001 Dec;34 Suppl 2:S83-9.
164. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):113-27.
165. Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res*. 1995 Mar;1:9-19.
166. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30.
167. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev*. 1993 Mar;7(3):331-42.
168. Obeyesekere MN, Herbert JR, Zimmerman SO. A model of the G1 phase of the cell cycle incorporating cyclin E/cdk2 complex and retinoblastoma protein. *Oncogene*. 1995 Sep 21;11(6):1199-205.
169. Zwicker J, Lucibello FC, Wolfrum LA, Gross C, Truss M, Engeland K, et al. Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *Embo J*. 1995 Sep 15;14(18):4514-22.
170. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 1990 Apr 5;344(6266):503-8.
171. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993 Dec 16;366(6456):704-7.
172. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994 Jul 15;78(1):67-74.
173. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.
174. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol*. 2002 Jan;14(1):86-91.
175. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997 May 15;387(6630):296-9.
176. Jones SN, Roe AE, Donehower LA, Bradley A. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*. 1995 Nov 9;378(6553):206-8.
177. Senderowicz AM, Sausville EA. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Mar 1;92(5):376-87.
178. Gondeau C, Gerbal-Chaloin S, Bello P, Aldrian-Herrada G, Morris MC, Divita G. Design of a novel class of peptide inhibitors of cyclin-dependent kinase/cyclin activation. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13793-800.
179. Ji P, Sun D, Wang H, Bauzon F, Zhu L. Disrupting Skp2-cyclin A interaction with a blocking peptide induces selective cancer cell killing. *Mol Cancer Ther*. 2007 Feb;6(2):684-91.
180. Zajac-Kaye M. Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. *Lung Cancer*. 2001 Dec;34 Suppl 2:S43-6.
181. Volm M, Koomagi R, Mattern J, Efferth T. Expression profile of genes in non-small cell lung carcinomas from long-term surviving patients. *Clin Cancer Res*. 2002 Jun;8(6):1843-8.
182. Volm M, Koomagi R, Rittgen W. Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and E2F1 in squamous-cell lung carcinoma. *Int J Cancer*. 1998 Jun 19;79(3):294-9.
183. Perumal D, Singh S, Yoder SJ, Bloom GC, Chellappan SP. A novel five gene signature derived from stem-like side population cells predicts overall and recurrence-free survival in NSCLC. *PLoS One*. 2012;7(8):e43589.
184. Zhang C, Elkahloun AG, Robertson M, Gills JJ, Tsurutani J, Shih JH, et al. Loss of cytoplasmic CDK1 predicts poor survival in human lung cancer and confers chemotherapeutic resistance. *PLoS One*. 2011 Aug;6(8):e23849.
185. Muller-Tidow C, Metzger R, Kugler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, et al. Cyclin E is the only cyclin-

dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001 Jan 15;61(2):647-53.

186. Tong J, Sun X, Cheng H, Zhao D, Ma J, Zhen Q, et al. Expression of p16 in non-small cell lung cancer and its prognostic significance: a meta-analysis of published literatures. *Lung Cancer.* 2011 Nov;74(2):155-63.

187. Zhao W, Huang CC, Otterson GA, Leon ME, Tang Y, Shilo K, et al. Altered p16(INK4) and RB1 Expressions Are Associated with Poor Prognosis in Patients with Nonsmall Cell Lung Cancer. *J Oncol.* 2012;2012:957437.

188. Cho S, Sung SW, Jheon S, Chung JH. Risk of recurrence in surgically resected stage I adenocarcinoma of the lung: histopathologic and immunohistochemical analysis. *Lung.* 2008 Nov-Dec;186(6):411-9.

189. Tan DF, Li Q, Rammath N, Beck A, Wiseman S, Anderson T, et al. Prognostic significance of expression of p53 oncoprotein in primary (stage I-IIIa) non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2003 Mar-Apr;23(2C):1665-72.

190. Ishihara S, Minato K, Hoshino H, Saito R, Hara F, Nakajima T, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer: its immunohistochemical evaluation using biopsy specimens. *Lung Cancer.* 1999 Dec;26(3):187-94.

191. Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, Yazawa T, Inayama Y, Ito T, et al. High cyclin E and low p27/Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer.* 2001 Oct;34(1):59-65.

192. Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, Freedman AN, Bennett WP, et al. Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Jan 1;11(1):232-41.

193. Higashiyama M, Doi O, Kodama K, Yokouchi H, Kasugai T, Ishiguro S, et al. MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. *Br J Cancer.* 1997 Feb;75(9):1302-8.

194. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2003 Mar 10;284(1):99-110.

195. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J.* 2000 Jul 3;19(13):3159-67.

196. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Feb;2(2):127-37.

197. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer.* 2001 Sep;37 Suppl 4:S3-8.

198. Han SW, Kim TY, Hwang PG, Jeong S, Kim J, Choi IS, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *J Clin Oncol.* 2005 Apr 10;23(11):2493-501.

199. Ahn JH, Kim SW, Hong SM, Suh C, Kim WK, Lee IC, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in operable non-small cell lung carcinoma. *J Korean Med Sci.* 2004 Aug;19(4):529-35.

200. Ugocsai K, Mandoky L, Tizslavicz L, Molnar J. Investigation of HER2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2005 Jul-Aug;25(4):3061-6.

201. Herpel E, Jensen K, Muley T, Warth A, Schnabel PA, Meister M, et al. The cancer stem cell antigens CD133, BCRP1/ABCG2 and CD117/c-KIT are not associated with prognosis in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 2011 Dec;31(12):4491-500.

202. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, et al. The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Curr Drug Targets.* 2005 May;6(3):243-57.

203. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.

204. Mimae T, Tsuta K, Maeshima AM, Okada M, Asamura H, Kondo T, et al. Cathepsin D as a potential prognostic marker for lung adenocarcinoma. *Pathol Res Pract.* 2012 Sep 15;208(9):534-40.

205. Wolf M, Clark-Lewis I, Buri C, Langen H, Lis M, Mazzucchelli L. Cathepsin D specifically cleaves the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha, macrophage inflammatory protein-1 beta, and SLC that are expressed in human breast cancer. *Am J Pathol.* 2003 Apr;162(4):1183-90.
206. Cakir E, Yilmaz A, Demirag F, Oguztuzun S, Sahin S, Yazici UE, et al. Prognostic significance of micropapillary pattern in lung adenocarcinoma and expression of apoptosis-related markers: caspase-3, bcl-2, and p53. *Apmis.* 2011 Sep;119(9):574-80.
207. Yoo J, Kim CH, Song SH, Shim BY, Jeong YJ, Ahn MI, et al. Expression of caspase-3 and c-myc in non-small cell lung cancer. *Cancer Res Treat.* 2004 Oct;36(5):303-7.
208. Volm M, Koomagi R. Prognostic relevance of c-Myc and caspase-3 for patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2000 Jan-Feb;7(1):95-8.
209. Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, et al. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst).* 2004 Nov 2;3(11):1389-407.
210. Sarasin A, Monier R. DNA repair pathways and associated human diseases. *Biochimie.* 2003 Nov;85(11):1041.
211. Cooper WA, Kohonen-Corish MR, Chan C, Kwun SY, McCaughan B, Kennedy C, et al. Prognostic significance of DNA repair proteins MLH1, MSH2 and MGMT expression in non-small-cell lung cancer and precursor lesions. *Histopathology.* 2008 Apr;52(5):613-22.
212. Vageli D, Daniil Z, Dahabreh J, Karagianni E, Vamvakopoulou DN, Ioannou MG, et al. Phenotypic mismatch repair hMSH2 and hMLH1 gene expression profiles in primary non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2009 Jun;64(3):282-8.
213. Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1996 Nov;213(Pt 1):123-61.
214. Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung Cancer.* 2002 May;36(2):115-24.
215. Iwakawa R, Kohno T, Kato M, Shiraishi K, Tsuta K, Noguchi M, et al. MYC amplification as a prognostic marker of early-stage lung adenocarcinoma identified by whole genome copy number analysis. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 15;17(6):1481-9.
216. Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol.* 2008 Jul;3:221-47.
217. Knez L, Sodja E, Kern I, Kosnik M, Cufer T. Predictive value of multidrug resistance proteins, topoisomerases II and ERCC1 in small cell lung cancer: a systematic review. *Lung Cancer.* 2011 Jun;72(3):271-9.
218. Doyle LA. Topoisomerase expression in cancer cell lines and clinical samples. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994 Jan;34 Suppl:S32-40.
219. Lee SH, Noh KB, Lee JS, Lee EJ, Min KH, Hur GY, et al. Thymidylate synthase and ERCC1 as predictive markers in patients with pulmonary adenocarcinoma treated with pemetrexed and cisplatin. *Lung Cancer.* 2013 Jul;81(1):102-8.
220. Nakagawa T, Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Miyahara R, Matsuoka K, et al. Prognostic value of thymidylate synthase expression in patients with p-stage I adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2002 Feb;35(2):165-70.
221. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assn.* 1958;53:457-81.
222. Cox D. Regression models and life-tables (with discussion). *J Roy Stat Soc.* 1972;B(34):187-220.
223. Mantel N, Haenszel W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst.* 1959 Apr;22(4):719-48.
224. Intraoperative lymph node staging in bronchogenic carcinoma surgery. Consensus report. *Arch Bronconeumol.* 2001 Dec;37(11):495-503.
225. Gonzalez-Aragoneses F, Moreno-Mata N, Simon-Adiego C, Penalver-Pascual R, Gonzalez-Casaurran G, Perea LA. Lung cancer surgery in the elderly. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2009 Sep;71(3):266-71.

226. Cancer AJCo. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York: Springer; 2002.
227. Wind J, Smit EJ, Senan S, Eerenberg JP. Residual disease at the bronchial stump after curative resection for lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007 Jul;32(1):29-34.
228. Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 1;26(34):5630-7.
229. Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol.* 2001 Jan;8(1):14-20.
230. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer.* 2001 Oct 1;94(1):1-5.
231. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):844-7.
232. Andersen CL, Hostetter G, Grigoryan A, Sauter G, Kallioniemi A. Improved procedure for fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cytometry.* 2001 Oct 1;45(2):83-6.
233. Frantz GD, Pham TQ, Peale FV, Jr., Hillan KJ. Detection of novel gene expression in paraffin-embedded tissues by isotopic in situ hybridization in tissue microarrays. *J Pathol.* 2001 Sep;195(1):87-96.
234. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol.* 2001 Jun;70(3):255-64.
235. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J.* 2001 Jan-Feb;7(1):24-31.
236. Horvath L, Henshall S. The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology.* 2001 May;33(2):125-9.
237. Fedor HL, De Marzo AM. Practical methods for tissue microarray construction. *Methods Mol Med.* 2005;103:89-101.
238. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1245-51.
239. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest.* 2000 Dec;80(12):1943-9.
240. Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, Kobayashi M, Kawakubo Y, Kameya T. Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol.* 1998 Sep;153(3):963-72.
241. Leversha MA, Fielding P, Watson S, Gosney JR, Field JK. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. *J Pathol.* 2003 Aug;200(5):610-9.
242. Wang WD, Li R, Chen ZT, Li DZ, Duan YZ, Cao ZH. Cisplatin-controlled p53 gene therapy for human non-small cell lung cancer xenografts in athymic nude mice via the CARG elements. *Cancer Sci.* 2005 Oct;96(10):706-12.
243. Cheng YL, Lee SC, Harn HJ, Chen CJ, Chang YC, Chen JC, et al. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p53 and p16 in resected non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003 Feb;23(2):221-8.
244. Xue Q, Sano T, Kashiwabara K, Oyama T, Nakajima T. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in squamous cell carcinomas of lung. *Jpn J Cancer Res.* 2001 Mar;92(3):285-92.
245. Coleman LW, Bronstein IB, Holden JA. Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II-alpha and p53 in gastric carcinomas. *Anticancer Res.* 2001 Mar-Apr;21(2A):1167-72.
246. Friedrich M, Meyberg R, Villena-Heinsen C, Woll-Hermann A, Reitnauer K, Schmidt W, et al. Immunohistochemical analysis of DNA mismatch-repair enzyme hMSH-2 and Ki-67 in breast carcinomas. *Anticancer Res.* 1999 Jul-Aug;19(4B):3349-53.
247. Kouso H, Yoshino I, Miura N, Takenaka T, Ohba T, Yohena T, et al. Expression of mismatch repair pro-

- teins, hMLH1/hMSH2, in non-small cell lung cancer tissues and its clinical significance. *J Surg Oncol*. 2008 Oct 1;98(5):377-83.
248. Hashimoto H, Ozeki Y, Sato M, Obara K, Matsutani N, Nakagishi Y, et al. Significance of thymidylate synthase gene expression level in patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2006 Apr 1;106(7):1595-601.
249. Palacios J, Honrado E, Osorio A, Cazorla A, Sarrío D, Barroso A, et al. Immunohistochemical characteristics defined by tissue microarray of hereditary breast cancer not attributable to BRCA1 or BRCA2 mutations: differences from breast carcinomas arising in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Clin Cancer Res*. 2003 Sep 1;9(10 Pt 1):3606-14.
250. Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T, Nishi M, Kojima T, Hiroumi H, et al. Prognostic significance of p27KIP1 protein and ki-67 growth fraction in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2000 Oct;6(10):4073-81.
251. Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, Hirsch FR, Baron A, Bemis L, et al. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002 May 15;20(10):2417-28.
252. Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, Ogura S, Kinoshita I, Shimizu M, et al. Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer*. 2002 Feb 1;94(3):752-8.
253. Deeb G, Wang J, Ramnath N, Slocum HK, Wiseman S, Beck A, et al. Altered E-cadherin and epidermal growth factor receptor expressions are associated with patient survival in lung cancer: a study utilizing high-density tissue microarray and immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2004 Apr;17(4):430-9.
254. Breslow N. Covariance analysis of censored survival data. *Biometrics*. 1974 Mar;30(1):89-99.
255. Tarone RE. On summary estimators of relative risk. *J Chronic Dis*. 1981;34(9-10):463-8.
256. Tarone RE, Gart JJ. Significance tests for cancer screening trials. *Biometrics*. 1989 Sep;45(3):883-90.
257. Spaggiari L, Scanagatta P. Surgery of non-small cell lung cancer in the elderly. *Curr Opin Oncol*. 2007 Mar;19(2):84-91.
258. Weinmann M, Zimmermann F, Bamberg M, Jeremic B. Curative approaches to lung cancer in the elderly. *Semin Surg Oncol*. 2003;21(3):182-9.
259. Weinmann M, Jeremic B, Toomes H, Friedel G, Bamberg M. Treatment of lung cancer in the elderly. Part I: non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2003 Mar;39(3):233-53.
260. Yoshino I, Maehara Y. Impact of smoking status on the biological behavior of lung cancer. *Surg Today*. 2007 Aug;37(9):725-34.
261. O'Connor SJ. Review of the incidence, prevalence, mortality and causative factors for lung cancer in Europe. *Eur J Cancer*. 2011 Sep;47 Suppl 3:S346-7.
262. Kutikova L, Bowman L, Chang S, Long SR, Obasaju C, Crown WH. The economic burden of lung cancer and the associated costs of treatment failure in the United States. *Lung Cancer*. 2005 Nov;50(2):143-54.
263. Pompen M, Gok M, Novak A, van Wuijtswinkel R, Biesma B, Schramel F, et al. Direct costs associated with the disease management of patients with unresectable advanced non-small-cell lung cancer in The Netherlands. *Lung Cancer*. 2009 Apr;64(1):110-6.
264. Levi F, Bosetti C, Fernandez E, Hill C, Lucchini F, Negri E, et al. Trends in lung cancer among young European women: the rising epidemic in France and Spain. *Int J Cancer*. 2007 Jul 15;121(2):462-5.
265. Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Bielska-Lasota M, Coebergh JW, et al. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EURO CARE-4 study. *Lancet Oncol*. 2007 Sep;8(9):773-83.
266. Calatayud J, Gómez A, Hernando F, Talavera P, Sanz G, De Mingo M, et al. Nuestra experiencia en el tratamiento quirúrgico del carcinoma broncogénico no microcítico. Supervivencia a largo plazo. *Cir Esp*. 2000 Apr;68 (Suppl 1):418.
267. Roy MS, Donington JS. Management of locally advanced non small cell lung cancer from a surgical perspective. *Curr Treat Options Oncol*. 2007 Feb;8(1):1-14.

268. Martins RG, D'Amico TA, Loo BW, Jr., Pinder-Schenck M, Borghaei H, Chaft JE, et al. The management of patients with stage IIIA non-small cell lung cancer with N2 mediastinal node involvement. *J Natl Compr Canc Netw*. 2012 May;10(5):599-613.
269. Le Pimpec Barthes F, Mordant P, Pricopi C, Foucault C, Dujon A, Riquet M. [The place of surgery in metastatic non-small cell lung cancer]. *Rev Mal Respir*. 2012 Mar;29(3):376-83.
270. DiPerna CA, Wood DE. Surgical management of T3 and T4 lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Jul 1;11(13 Pt 2):5038s-44s.
271. Bolukbas S, Eberlein MH, Schirren J. Role of mediastinal lymph node dissection in non-small cell lung cancer. *Front Radiat Ther Oncol*. 2010;42:78-86.
272. Darling GE, Abdurahman A, Yi QL, Johnston M, Waddell TK, Pierre A, et al. Risk of a right pneumonectomy: role of bronchopleural fistula. *Ann Thorac Surg*. 2005 Feb;79(2):433-7.
273. Mordant P, Grand B, Cazes A, Foucault C, Dujon A, Le Pimpec Barthes F, et al. Adenosquamous carcinoma of the lung: surgical management, pathologic characteristics, and prognostic implications. *Ann Thorac Surg*. 2013 Apr;95(4):1189-95.
274. Lackey A, Donington JS. Surgical Management of Lung Cancer. *Semin Intervent Radiol*. 2013 Jun;30(2):133-40.
275. Westra WH, Baas IO, Hruban RH, Askin FB, Wilson K, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in atypical alveolar hyperplasias of the human lung. *Cancer Res*. 1996 May 1;56(9):2224-8.
276. Nikitin AY, Alcaraz A, Anver MR, Bronson RT, Cardiff RD, Dixon D, et al. Classification of proliferative pulmonary lesions of the mouse: recommendations of the mouse models of human cancers consortium. *Cancer Res*. 2004 Apr 1;64(7):2307-16.
277. Felip E, Rosell R, Maestre JA, Rodriguez-Paniagua JM, Moran T, Astudillo J, et al. Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 1;28(19):3138-45.
278. Simon C, Moreno N, Penalver R, Gonzalez G, Alvarez-Fernandez E, Gonzalez-Aragoneses F. The side of pneumonectomy influences long-term survival in stage I and II non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2007 Sep;84(3):952-8.
279. Pilz LG., Manegold C, Schmid-Bindert G. Statistical considerations and end points for clinical lung cancer studies: can progression free survival (PFS) substitute overall survival (OS) as a valid end point in clinical trials for advanced non small cell lung cancer? *Transl Lung Cancer Res*. 2012;1:26-35.
280. Padilla J, Penalver JC, Jorda C, Calvo V, Escriva J, Ceron J, et al. Non-small cell bronchogenic cancer in stage IA: mortality patterns after surgery. *Arch Bronconeumol*. 2005 Apr;41(4):180-4.
281. Lou F, Huang J, Sima CS, Dycoco J, Rusch V, Bach PB. Patterns of recurrence and second primary lung cancer in early-stage lung cancer survivors followed with routine computed tomography surveillance. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013 Jan;145(1):75-81.
282. Powell HA, Tata LJ, Baldwin DR, Stanley RA, Khakwani A, Hubbard RB. Early mortality after surgical resection for lung cancer: an analysis of the English National Lung cancer audit. *Thorax*. 2013 Sep;68(9):826-34.
283. Ferguson MK, Watson S, Johnson E, Vigneswaran WT. Predicted postoperative lung function is associated with all-cause long-term mortality after major lung resection for cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013 Sep 19. Epub ahead of print.
284. Felip E, Martinez-Marti A, Martinez P, Cedres S, Navarro A. Adjuvant treatment of resected nonsmall cell lung cancer: state of the art and new potential developments. *Curr Opin Oncol*. 2013 Mar;25(2):115-20.
285. Estadística INd. Encuesta Nacional de Salud. In: Sanidad Md, editor; 2011/2012.
286. Scaglia NC, Chatkin JM, Pinto JA, Tsukazan MT, Wagner MB, Saldanha AF. Role of gender in the survival of surgical patients with nonsmall cell lung cancer. *Ann Thorac Med*. 2013 Jul;8(3):142-7.
287. Sculier JP, Chansky K, Crowley JJ, Van Meerbeeck J, Goldstraw P. The impact of additional prognostic factors on survival and their relationship with the anatomical extent of disease expressed by the 6th Edition of the

- TNM Classification of Malignant Tumors and the proposals for the 7th Edition. *J Thorac Oncol*. 2008 May;3(5):457-66.
288. Warwick R, Shackcloth M, Mediratta N, Page R, McShane J, Shaw M, et al. Female sex and long-term survival post curative resection for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2013 Oct;44(4):624-30.
289. Sterlacci W, Tzankov A, Veits L, Oberaigner W, Schmid T, Hilbe W, et al. The prognostic impact of sex on surgically resected non-small cell lung cancer depends on clinicopathologic characteristics. *Am J Clin Pathol*. 2011 Apr;135(4):611-8.
290. Okami J, Higashiyama M, Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, et al. Pulmonary resection in patients aged 80 years or over with clinical stage I non-small cell lung cancer: prognostic factors for overall survival and risk factors for postoperative complications. *J Thorac Oncol*. 2009 Oct;4(10):1247-53.
291. Martini N, Rusch VW, Bains MS, Kris MG, Downey RJ, Flehinger BJ, et al. Factors influencing ten-year survival in resected stages I to IIIa non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 Jan;117(1):32-6.
292. Perez-Moreno P, Brambilla E, Thomas R, Soria JC. Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*. 2012 May 1;18(9):2443-51.
293. Cheng L, Alexander RE, Maclennan GT, Cummings OW, Montironi R, Lopez-Beltran A, et al. Molecular pathology of lung cancer: key to personalized medicine. *Mod Pathol*. 2012 Mar;25(3):347-69.
294. Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Prognostic impact of histology on early-stage non-small cell lung cancer. *Chest*. 2011 Jul;140(1):135-45.
295. Selvaggi G, Scagliotti GV. Histologic subtype in NSCLC: does it matter? *Oncology (Williston Park)*. 2009 Nov 30;23(13):1133-40.
296. Karlsson C, Bodin L, Piehl-Aulin K, Karlsson MG. Tissue microarray validation: a methodologic study with special reference to lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jul;18(7):2014-21.
297. Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*. 2009 Mar-Apr;29(2):123-7.
298. Anagnostou VK, Welsh AW, Giltane JM, Siddiqui S, Liceaga C, Gustavson M, et al. Analytic variability in immunohistochemistry biomarker studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010 Apr;19(4):982-91.
299. Baldi A, De Luca A, Esposito V, Campioni M, Spugnini EP, Citro G. Tumor suppressors and cell-cycle proteins in lung cancer. *Patholog Res Int*. 2011;2011:605042.
300. Yang TY, Chang GC, Chen KC, Hung HW, Hsu KH, Sheu GT, et al. Sustained activation of ERK and Cdk2/cyclin-A signaling pathway by pemetrexed leading to S-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Eur J Pharmacol*. 2011 Aug 1;663(1-3):17-26.
301. Kim DH, Park SE, Kim M, Ji YI, Kang MY, Jung EH, et al. A functional single nucleotide polymorphism at the promoter region of cyclin A2 is associated with increased risk of colon, liver, and lung cancers. *Cancer*. 2011 Sep 1;117(17):4080-91.
302. Kosacka M, Piesiak P, Porebska I, Korzeniewska A, Dyla T, Jankowska R. Cyclin A and Cyclin E expression in resected non-small cell lung cancer stage I-IIIa. *In Vivo*. 2009 Jul-Aug;23(4):519-25.
303. Esposito V, Deluca A, Baldi A, Daponte A, Cavallotti I, Meoli I, et al. Altered expression of p53 and Rb tumor suppressor genes in lung cancer. *Int J Oncol*. 1996 Sep;9(3):439-43.
304. Dworakowska D, Gozdz S, Jassem E, Badzio A, Kobierska G, Urbaniak A, et al. Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002 Jan;35(1):35-41.
305. Scoccianti C, Vesin A, Martel G, Olivier M, Brambilla E, Timsit JF, et al. Prognostic value of TP53, KRAS and EGFR mutations in nonsmall cell lung cancer: the EUELC cohort. *Eur Respir J*. 2012 Jul;40(1):177-84.
306. Han H, Landreneau RJ, Santucci TS, Tung MY, Macherey RS, Shackney SE, et al. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2002 Jan;33(1):105-10.
307. Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, Ro JY, Lee JJ, Tu N, et al. Expression of p53 oncoprotein in non-small-

- cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol*. 1995 Aug;13(8):1893-903.
308. Fukuse T, Hirata T, Naiki H, Hitomi S, Wada H. Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2000 Jan 15;60(2):242-4.
309. Dosaka-Akita H, Hommura F, Mishina T, Ogura S, Shimizu M, Katoh H, et al. A risk-stratification model of non-small cell lung cancers using cyclin E, Ki-67, and ras p21: different roles of G1 cyclins in cell proliferation and prognosis. *Cancer Res*. 2001 Mar 15;61(6):2500-4.
310. Yasmeen A, Berdel WE, Serve H, Muller-Tidow C. E- and A-type cyclins as markers for cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003 Sep;3(5):617-33.
311. Huang LN, Wang DS, Chen YQ, Li W, Hu FD, Gong BL, et al. Meta-analysis for cyclin E in lung cancer survival. *Clin Chim Acta*. 2012 Apr 11;413(7-8):663-8.
312. Lou-Qian Z, Rong Y, Ming L, Xin Y, Feng J, Lin X. The prognostic value of epigenetic silencing of p16 gene in NSCLC patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(1):e54970.
313. Sterlacci W, Tzankov A, Veits L, Zelger B, Bihl MP, Foerster A, et al. A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas. *J Thorac Oncol*. 2012 Oct;6(10):1649-57.
314. Jin M, Inoue S, Umemura T, Moriya J, Arakawa M, Nagashima K, et al. Cyclin D1, p16 and retinoblastoma gene product expression as a predictor for prognosis in non-small cell lung cancer at stages I and II. *Lung Cancer*. 2001 Nov;34(2):207-18.
315. Kamal NS, Soria JC, Mendiboure J, Planchard D, Olausson KA, Rousseau V, et al. MutS homologue 2 and the long-term benefit of adjuvant chemotherapy in lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 15;16(4):1206-15.
316. Zhuang Y, Yin HT, Yin XL, Wang J, Zhang DP. High p27 expression is associated with a better prognosis in East Asian non-small cell lung cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2011 Nov 20;412(23-24):2228-31.
317. Jo BG, Cho SR, BK C. Prognosis significance of cyclin E and p27 in stage I non small cell lung cancer. *Korean J Thorac and Cardiovasc Surg*. 2011(36):7-14.
318. Tsukamoto S, Sugio K, Sakada T, Ushijima C, Yamazaki K, Sugimachi K. Reduced expression of cell-cycle regulator p27(Kip1) correlates with a shortened survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001 Oct;34(1):83-90.
319. Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, et al. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol*. 1999 Aug;1(4):207-14.
320. Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, et al. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *Eur J Cancer*. 2003 Jun;39(9):1242-50.
321. Aikawa H, Sato M, Fujimura S, Takahashi H, Endo C, Sakurada A, et al. MDM2 expression is associated with progress of disease and WAF1 expression in resected lung cancer. *Int J Mol Med*. 2000 Jun;5(6):631-3.
322. Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, Peters B, Dziadziszko R, Zylicz M, et al. MDM2 gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*. 2004 Mar;43(3):285-95.
323. Jin Y, Li JP, Tang LY, Chen JN, Feng ZY, Liu Y, et al. Protein expression and significance of VEGF, EGFR and MMP-9 in non-small cell lung carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(6):1473-6.
324. Jantus-Lewintre E, Sirera R, Cabrera A, Blasco A, Caballero C, Iranzo V, et al. Analysis of the prognostic value of soluble epidermal growth factor receptor plasma concentration in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Clin Lung Cancer*. 2011 Sep;12(5):320-7.
325. McMillen E, Ye F, Li G, Wu Y, Yin G, Liu W. Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation and p-EGFR expression in resected non-small cell lung cancer. *Exp Lung Res*. 2010 Nov;36(9):531-7.
326. Lee HJ, Xu X, Choe G, Chung DH, Seo JW, Lee JH, et al. Protein overexpression and gene amplification of epidermal growth factor receptor in nonsmall cell lung carcinomas: Comparison of four commercially available antibodies by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization study. *Lung Cancer*. 2010 Jun;68(3):375-82.

327. Meert AP, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Mascaux C, Verdebout JM, et al. The role of HER-2/neu expression on the survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature. *Br J Cancer*. 2003 Sep 15;89(6):959-65.
328. Takenaka M, Hanagiri T, Shinohara S, Kuwata T, Chikaishi Y, Oka S, et al. The prognostic significance of HER2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2011 Dec;31(12):4631-6.
329. Xia Q, Zhu Z, Wang J, Situ D, Zhou N, Jang W. Expression and association of HER2 with prognosis in early-stage (T1-T2N0M0) non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2012 Oct;33(5):1719-25.
330. Lurje G, Lenz HJ. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*. 2009;77(6):400-10.
331. Lu HY, Zhang G, Cheng QY, Chen B, Cai JF, Wang XJ, et al. Expression and mutation of the c-kit gene and correlation with prognosis of small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2012 Jul;4(1):89-93.
332. Micke P, Hengstler JG, Albrecht H, Faldum A, Bittinger F, Becker K, et al. c-kit expression in adenocarcinomas of the lung. *Tumour Biol*. 2004 Sep-Dec;25(5-6):235-42.
333. Pelosi G, Barisella M, Pasini F, Leon ME, Veronesi G, Spaggiari L, et al. CD117 immunoreactivity in stage I adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: relevance to prognosis in a subset of adenocarcinoma patients. *Mod Pathol*. 2004 Jun;17(6):711-21.
334. Pore MM, Hiltermann TJ, Kruyt FA. Targeting apoptosis pathways in lung cancer. *Cancer Lett*. 2013 May 28;332(2):359-68.
335. Takata T, Tanaka F, Yamada T, Yanagihara K, Otake Y, Kawano Y, et al. Clinical significance of caspase-3 expression in pathologic-stage I, nonsmall-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2001;96 (Suppl):54-60.
336. Fan C, Lin X, Wang E. Clinicopathological significance of cathepsin D expression in non-small cell lung cancer is conditional on apoptosis-associated protein phenotype: an immunohistochemistry study. *Tumour Biol*. 2012 Aug;33(4):1045-52.
337. Skarda J, Fridman E, Plevova P, Hajduch M, Radova L, Ofek E, et al. Prognostic value of hMLH1 and hMSH2 immunohistochemical expression in non-small cell lung cancer. A tissue microarray study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2006 Nov;150(2):255-9.
338. Vageli DP, Zaravinos A, Daniil Z, Dahabreh J, Doukas SG, Spandidos DA, et al. hMSH2 and hMLH1 gene expression patterns differ between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: correlation with patient survival and response to adjuvant chemotherapy treatment. *Int J Biol Markers*. 2013 Oct-Dec;27(4):e400-4.
339. Cheng H, Sun N, Sun X, Chen B, Li F, Feng J, et al. Polymorphisms in hMSH2 and hMLH1 and response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer patients. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010 May 15;42(5):311-7.
340. Shih CM, Chen CY, Lee IH, Kao WT, Wang YC. A polymorphism in the hMLH1 gene (-93G-->A) associated with lung cancer susceptibility and prognosis. *Int J Mol Med*. 2010 Jan;25(1):165-70.
341. Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1192-205.
342. Kim H, Yoo SB, Sun P, Jin Y, Jheon S, Lee CT, et al. Alteration of the E-Cadherin/beta-Catenin Complex Is an Independent Poor Prognostic Factor in Lung Adenocarcinoma. *Korean J Pathol*. 2013 Feb;47(1):44-51.
343. Retera JM, Leers MP, Sulzer MA, Theunissen PH. The expression of beta-catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Pathol*. 1998 Dec;51(12):891-4.
344. Wu Y, Liu HB, Ding M, Liu JN, Zhan P, Fu XS, et al. The impact of E-cadherin expression on non-small cell lung cancer survival: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2012 Oct;39(10):9621-8.
345. Chen CH, Chuang SM, Yang MF, Liao JW, Yu SL, Chen JJ. A novel function of YWHAZ/beta-catenin axis in promoting epithelial-mesenchymal transition and lung cancer metastasis. *Mol Cancer Res*. 2012 Oct;10(10):1319-31.
346. Mei XD, Su H, Song J, Dong L. Prognostic significance of beta-catenin expression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Biosci Trends*. 2013 Feb;7(1):42-9.
347. Li XQ, Yang XL, Zhang G, Wu SP, Deng XB, Xiao SJ, et al. Nuclear beta-catenin accumulation is associated with increased expression of Nanog protein and predicts poor prognosis of non-small cell lung cancer. *J Transl*

Med. 2013;11:114.

348. Yoo J, Jung JH, Choi HJ, Kang SJ, Kang CS. The expression of c-myc, bcl-2 and p53 proteins in adenocarcinomas of lung. *Cancer Res Treat.* 2004 Apr;36(2):146-50.

349. Soucek L, Whitfield J, Martins CP, Finch AJ, Murphy DJ, Sodir NM, et al. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature.* 2008 Oct 2;455(7213):679-83.

350. Fukazawa T, Maeda Y, Matsuoka J, Yamatsuji T, Shigemitsu K, Morita I, et al. Inhibition of Myc effectively targets KRAS mutation-positive lung cancer expressing high levels of Myc. *Anticancer Res.* 2010 Oct;30(10):4193-200.

351. Erguden HC, Koksall D, Demirag F, Bayiz H, Mutluay N, Berktaş B, et al. The association of topoisomerase 2alpha expression with prognosis in surgically resected non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *J Thorac Dis.* 2012 Aug;4(4):352-7.

352. Yan S, Shun-Chang J, Li C, Jie L, Ya-Li L, Ling-Xiong W. Topoisomerase II alpha expression and the benefit of adjuvant chemotherapy for postoperative patients with non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:621.

353. Christoph DC, Asuncion BR, Hassan B, Tran C, Maltzman JD, O'Shannessy DJ, et al. Significance of folate receptor alpha and thymidylate synthase protein expression in patients with non-small-cell lung cancer treated with pemetrexed. *J Thorac Oncol.* 2013 Jan;8(1):19-30.

354. Kaira K, Ohde Y, Nakagawa K, Okumura T, Murakami H, Takahashi T, et al. Thymidylate synthase expression is closely associated with outcome in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Med Oncol.* 2012 Sep;29(3):1663-72.

355. Zheng Z, Li X, Schell MJ, Chen T, Boulware D, Robinson L, et al. Thymidylate synthase in situ protein expression and survival in stage I nonsmall-cell lung cancer. *Cancer.* 2008 Jun 15;112(12):2765-73.

356. Crino W, van Meerbeeck J. Early Stage and locally advanced (non-metastatic) non-small-cell lung cancer; ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010 May;21(Suppl 5):103-15.

357. Varlotto JM, Recht A, Nikolov M, Flickinger JC, Decamp MM. Extent of lymphadenectomy and outcome for patients with stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2009 Feb 15;115(4):851-8.

358. Ruffini E, Asioli S, Filosso PL, Buffoni L, Bruna MC, Mossetti C, et al. Significance of the presence of microscopic vascular invasion after complete resection of Stage I-II pT1-T2N0 non-small cell lung cancer and its relation with T-Size categories: did the 2009 7th edition of the TNM staging system miss something? *J Thorac Oncol.* 2011 Feb;6(2):319-26.

359. Maeda R, Yoshida J, Ishii G, Hishida T, Nishimura M, Nagai K. Poor prognostic factors in patients with stage IB non-small cell lung cancer according to the seventh edition TNM classification. *Chest.* 2011 Apr;139(4):855-61.

360. Sun Z, Yang P. Gene expression profiling on lung cancer outcome prediction: present clinical value and future premise. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Nov;15(11):2063-8.

361. Massuti BS, JM. Hernando, F. Karchaliou, N. Rosell, R. Are we ready to use biomarkers for staging, prognosis and treatment selection in early-stage non-small-cell lung cancer? *Transl Lung Cancer Res.* 2013;2(3):208-21.

362. Zhu CQ, Ding K, Strumpf D, Weir BA, Meyerson M, Pennell N, et al. Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 10;28(29):4417-24.

363. Bianchi F, Nuciforo P, Vecchi M, Bernard L, Tizzoni L, Marchetti A, et al. Survival prediction of stage I lung adenocarcinomas by expression of 10 genes. *J Clin Invest.* 2007 Nov;117(11):3436-44.

364. Kadara H, Behrens C, Yuan P, Solis L, Liu D, Gu X, et al. A five-gene and corresponding protein signature for stage-I lung adenocarcinoma prognosis. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 15;17(6):1490-501.

365. Roepman P, Jassem J, Smit EF, Muley T, Niklinski J, van de Velde T, et al. An immune response enriched 72-gene prognostic profile for early-stage non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 1;15(1):284-90.

366. Kratz JR, He J, Van Den Eeden SK, Zhu ZH, Gao W, Pham PT, et al. A practical molecular assay to predict

- survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet*. 2012 Mar 3;379(9818):823-32.
367. Boutros PC, Lau SK, Pintilie M, Liu N, Shepherd FA, Der SD, et al. Prognostic gene signatures for non-small-cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 24;106(8):2824-8.
368. Hernando-Trancho F, Sanz J, Jarabo J, Hernández S, López García-Asenjo J, Pérez-Villamil B, et al. A new genetic signature defining two prognosis groups among patients with completely resected early non-small cell lung cancer. 3rd European Lung Cancer Conference Geneve; 2012. The ASCO Post 2012 May;3(8):1-2
369. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006 Sep 7;355(10):983-91.
370. Pesta M, Kulda V, Fiala O, Safranek J, Topolcan O, Krakorova G, et al. Prognostic significance of ERCC1, RRM1 and BRCA1 in surgically-treated patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2012 Nov;32(11):5003-10.
371. Cobo M, Massuti B, Morán T, Rossel R. Spanish customized adjuvant trial (SCAT) based on BRCA1 mRNA levels. *American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2008*; 2008. p. 7533.
372. Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, Bepler G, Sanchez JJ, Camps C, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb 15;10(4):1318-25.
373. Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2007 Nov 7;2(11):e1129.
374. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med*. 1990 Aug 30;323(9):561-5.
375. Mascoux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, 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 Jan 17;92(1):131-9.
376. Seve P, Mackey J, Isaac S, Tredan O, Souquet PJ, Perol M, et al. Class III beta-tubulin expression in tumor cells predicts response and outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving paclitaxel. *Mol Cancer Ther*. 2005 Dec;4(12):2001-7.
377. Vansteenkiste J, De Ruysscher D, Eberhardt WE, Lim E, Senan S, Felip E, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013 Oct;24(Suppl 6):vi89-98.
378. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Eur J Cancer*. 2005 Aug;41(12):1690-6.
379. Subramanian J, Simon R. Gene expression-based prognostic signatures in lung cancer: ready for clinical use? *J Natl Cancer Inst*. 2010 Apr 7;102(7):464-74.
380. Sauerbruch F, Robinson S. III. Investigations Concerning the Technic of Lung Resection with the Application of Both Forms of Differential Pressure. *Ann Surg*. 1910 Mar;51(3):320-39.
381. Brauer L. Die Ausschaltung der Pneumothoraxfolgen met Hilfe des Uerdruckverfahrens. *Mitteilungen aus den Grenzgebieten der Medizin und Chirrgie*. 1904;13:483-500.
382. Davies H. Recent advances in the surgery of the lung and pleura. *Br J Surg*. 1912;1(228):1913-4.
383. Brunn H. Surgical principles underlying one stage lobectomy. *Arch Surg*. 1929;18:490.
384. Graham ES, Singer, JJ. Successful removal of the entire lung for carcinoma of the bronchus. *JAMA*. 1933(101):1371.
385. Archibald EW. Unilateral pneumonectomy. *Ann Surg*. 1934;100:796-8.
386. Rienhoff WF. Pneumonectomy: preliminary report of operative technique in two successful cases. *Bull J Hopkins Hosp* 1933;53:390-3.
387. Churchill ED. The surgical treatment of carcinoma of the lung. *J thorac Surg*. 1933;2(254).
388. Price-Thomas C. Conservathive resection of the bronchial tree. *J R Coll Surg Edinb*. 1956;1(169).

389. Paris Romeu F, Gonzalez Aragonese F. [Pionnering figures of Spanish chest surgery]. Arch Bronconeumol. 2002 Jan;38(1):37-48.
390. Gonzalez-Rivas D, Delgado M, Fieira E, Mendez L. Single-port video-assisted thoracoscopic lobectomy with pulmonary artery reconstruction. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2013 Nov;17(5):889-91.

ANEXOS



ANEXO I.

Reseña del origen y la evolución histórica de la Cirugía Torácica como disciplina y especialidad

La cirugía torácica en la actualidad tiene en el cáncer de pulmón uno de sus principales retos. Una alta proporción de los procedimientos quirúrgicos sobre el tórax tiene como finalidad la resección de un carcinoma broncogénico. Sin embargo, los inicios de la cirugía torácica, no ya como especialidad, que es relativamente reciente, sino como región anatómica a operar, encontraron su fundamento en las enfermedades supurativas del pulmón. El impacto epidemiológico que durante el siglo XIX tuvo la tuberculosis en Europa, junto a sus características fisiopatológicas y la ausencia de tratamiento específico, hizo de esta enfermedad uno de los grandes retos de la medicina de la época. La neumología se desarrolló para intentar prevenir y paliar los efectos de la enfermedad. Sin embargo, las importantes secuelas que dejaba sobre el tórax, con unos pulmones prácticamente destruidos por efecto de las micobacterias, llevaron a la implicación de los cirujanos para intentar tratar algunas de las manifestaciones de la enfermedad y las complicaciones derivadas de ella. Estaba naciendo la cirugía torácica.

El primer objetivo de la cirugía torácica en el tratamiento de la tuberculosis se basaba en la comprobación de que las cavidades tuberculosas, infestadas de micobacterias, mejoraban si eran colapsadas artificialmente. Era una forma mecánica de eliminar a los microorganismos. Así, en 1895 Forlanini provocó en un paciente el primer neumotórax artificial. Era el inicio de la colapsoterapia como herramienta terapéutica contra la tuberculosis. Le siguieron las toracoplastias, el neumotórax extrapleural, el *plombaje*, u ocupación del espacio pleural con distintos materiales, la sección del nervio frénico para elevar el hemidiafragma, o la cavernostomía. Podemos afirmar que estas técnicas fueron las primeras que realizaron cirujanos que ya podemos llamar torácicos.

Tenían así un volumen de pacientes muy importante, por la citada prevalencia que la tuberculosis presentaba ya desde la Revolución Industrial. Desde el punto de vista técnico, fue necesario implementar dos aspectos más:

1. Poder trabajar con la cavidad torácica abierta. La elasticidad del pulmón, que necesita de una presión negativa pleural para evitar su colapso, condicionaba el acceso quirúrgico a la cavidad torácica. La cámara de presión negativa de Sauerbruch, que presentó en 1904, creaba esos 5 – 10 mmHg negativos necesarios (380). La cámara de Brauer, por el contrario, era de alta presión, y buscaba insuflar aire en los pulmones a través de una mascarilla aplicada sobre la boca del paciente; la base, al fin y al cabo, de la ventilación mecánica actual. El complemento a estas técnicas fue el drenaje pleural y el fundamento del sello de agua que explicó Bülae en Hamburgo en 1891 (381).

2. El reto técnico quirúrgico de realizar resecciones pulmonares mediante la disección anatómica del hilio. Pese a las descripciones anatómicas que a lo largo de la historia iban precisando



cada vez más la morfología del organismo humano, y dentro de ella de forma especial la del tórax, no fue hasta 1912 cuando Davis pudo hacer una lobectomía con disección aislada de los elementos del hilio pulmonar (382). Sin embargo, tuvo poca repercusión, y pasaron varias décadas hasta que la lobectomía se entendiese como técnica de resección pulmonar estándar. De hecho, hubo que esperar a que Blades y Kent describieran en 1940 las técnicas de ligadura individualizada para una lobectomía inferior (se pensaba que la superior no era posible). Queda de manifiesto pues cómo desde el principio los cirujanos han tenido un enorme respeto al hilio pulmonar, por el tamaño y fragilidad de sus estructuras.

Hasta el citado desarrollo del drenaje pleural, las resecciones pulmonares se hacían en dos tiempos, ligando el hilio primero, y extirpando el pulmón necrótico resultante después, una vez que el resto del parénquima, debido al empiema resultante, se adhería y ya no se colapsaba. Es comprensible la alta mortalidad de estos procedimientos, que superaba el 40 %. La primera lobectomía en un tiempo la hizo Brunn en 1928 (383). Fue el primer paciente con un tubo de tórax conectado a un sello de agua. Como las primeras lobectomías en humanos de principios del siglo XX fueron catastróficas, la resección quirúrgica pulmonar se orientó hacia la neumonectomía. Nissen en 1931 y Haight en 1932 hicieron neumonectomías en dos tiempos con éxito. Y Graham en St. Louis en 1933 hace la primera neumonectomía en un tiempo con ligadura del hilio en bloque en un paciente con cáncer de pulmón (384). Tres meses más tarde, y casi a la par, Archibald en Montreal y Rienhoff en el Johns Hopkins, hacen sendas neumonectomías con disección individualizada del hilio pulmonar (385, 386).

Las resecciones pulmonares se constituyeron en una técnica más para el tratamiento de la tuberculosis. Más radical, con muchas complicaciones en ese momento, pero bastante resolutiva. Su generalización permitió que cuando llegó a su fin la epidemia de tuberculosis gracias al desarrollo de los antibióticos a mediados del siglo XX, los cirujanos tuviesen el bagaje necesario para afrontar la que sería desde entonces, y ya hasta la actualidad, nueva fuente de pacientes: el cáncer de pulmón. Patología que en los años 30 del siglo XX era tan infrecuente que ni siquiera estaba incluida en el Sistema de Clasificación Internacional de Enfermedades. No en vano la tasa de muertes por cáncer de pulmón era de cinco por cada 100.000 habitantes.



Las neumonectomías de Graham, Archibald y Rienhoff fueron en pacientes con cáncer de pulmón. La generalización del hábito tabáquico a partir de esa época dio lugar al incremento progresivo en la incidencia de esta enfermedad, hacia la que se orientó la cirugía torácica y que probablemente justifica el que naciera esta disciplina como especialidad. Fue la experiencia adquirida por Churchill después de realizar con éxito la primera lobectomía por cáncer de pulmón en 1950 la que convirtió a esta técnica en la cirugía estándar (387).

La resección segmentaria fue la técnica de elección en las resecciones pulmonares por tuberculosis en las dos últimas décadas de pico epidemiológico antes de la aparición de la estreptomycin. La descripción anatómica de las resecciones anatómicas de segmentos pulmonares data de en torno a 1940. A partir de los años 70, y en la actualidad con evidencia científica en cuanto a su pa-

pel oncológico, la resección segmentaria se convierte en una técnica factible en pacientes con cáncer de pulmón.

Desde mediados de siglo la cirugía evoluciona hacia la máxima radicalidad oncológica con las mínimas secuelas y respetando la mayor cantidad de parénquima sano posible. Así, una vez conocido el mayor riesgo postoperatorio de la neumonectomía, ésta pasó a intentar ser evitada. Y de esta manera surgen técnicas como la broncoplastia o resección en manguito, realizada por primera vez por Price Thomas en 1947 (388). La resección pulmonar se amplía asimismo a estructuras vecinas que el tumor infiltra por contigüidad y pueden ser reseca, como elementos de la pared torácica, el pericardio, estructuras vertebrales, vasculares, etc. A menudo estas grandes resecciones se complementan con reconstrucción de estructuras con materiales protésicos (mallas, prótesis vasculares, elementos biológicos, etc.).

No podemos dejar de mencionar aquí que en el desarrollo de la cirugía torácica la aportación de médicos españoles ha sido muy destacada (389). Así, ya en 1911, el doctor Ricardo Lozano había publicado dos monografías sobre la cirugía torácica. La primera lobectomía la hizo Antonio Caralps en Barcelona en 1935. Dos años después, en Madrid, Plácido González Duarte hacía la primera bilobectomía. Y en 1940, García Bencoechea comunica la primera neumonectomía.



Como hemos visto, la cirugía del cáncer de pulmón busca ser lo más radical posible, pero tratando de minimizar las secuelas sobre el paciente, de modo que su calidad de vida se vea afectada lo menos posible.

En los últimos años, en el abordaje del tórax se intenta ser lo menos mutilante posible. La toracoscopia comienza a ser vía de elección en muchos casos de cirugía de resección del cáncer de pulmón. La técnica la inició Jacobeus con fines terapéuticos hace más de un siglo. Sin embargo, su aplicación para las resecciones mayores pulmonares se remonta a las últimas dos décadas. En la actualidad, la aportación de cirujanos españoles en este sentido está siendo muy significativa (390).

En conclusión, aunque la cirugía torácica como especialidad es relativamente reciente (en España la especialidad está incluida en el sistema MIR desde 1978), la trayectoria de la patología quirúrgica torácica es larga y de gran riqueza. Sirvan estas líneas para acercar al lector el camino que ha llevado hasta la cirugía torácica actual.

ANEXO II

Protocolo de construcción y almacenamiento de Tissue-Arrays (Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas – CNIO)

1. Recogida de bloques y preparaciones:

Un técnico cualificado o patólogo recogerá la información necesaria de la base de datos referente a todos los casos requeridos para la confección del array. Se revisarán al microscopio todas las preparaciones de cada caso elegido.

Es importante seleccionar bloques de más de 2 mm de profundidad tisular y con adecuada preservación anti-génica en el proceso de fijación.

2. Recogida de bloques y preparaciones:

Teniendo las hematoxilinas de los bloques, se miran al microscopio y se selecciona el área en el porta, marcando con rotulador. Enfrentamos el porta de hematoxilina-eosina con el bloque correspondiente para marcar las áreas en el bloque.

3. Preparación del bloque receptor:

El receptor del array es un bloque de parafina normal. Es conveniente alisar el bloque antes de empezar a introducir los cilindros. Esto se hace desgastando un poco la parafina en el microtomo para que los cilindros tengan el mismo ángulo.

4. Diseño del array:

Hay que plantear el diámetro del cilindro (el número máximo de cilindros en el array), el número total de casos y el número de cilindros por caso (mínimo dos para que el tumor sea representativo). Finalmente se confecciona una plantilla en el ordenador, identificando todos los cilindros en el orden en que van a estar dispuestos en el array.

5. Construcción del array. Se siguen los siguientes pasos:

- a. Ajustar el bloque de parafina (receptor) en el portabloques imantado
- b. Ajustar a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y las columnas de los cilindros
- c. Elegir el juego de agujas apropiado. La aguja más pequeña de cada juego es la que hace el agujero en el bloque receptor; la más gruesa hace el cilindro del tejido donador.
- d. Ajustar la profundidad de bajada de las agujas, aproximadamente a 3 mm.
- e. Hacer primero el agujero en el bloque de parafina; a continuación se coloca el bloque de tejido donador sobre el puente y éste sobre el bloque de parafina. Cambiamos la posición de la aguja y pinchamos el tejido.
- f. Retirar el puente con el bloque donador y expulsar el cilindro de tejido exactamente encima del agujero hecho en la parafina, de forma que quede justo al nivel de la misma, sin hundirlo.
- g. Cambiar la medida del micrómetro para hacer el siguiente agujero.
- h. Una vez terminado el array meter el bloque en una estufa a 37 °C durante 15 minutos aproximadamente. Esto permitirá que los cilindros de tejido se adhieran mejor a la parafina en los agujeros del array.
- i. Sacar el bloque-array de la estufa y presionar sobre él con un porta para alisar la superficie.

6. Corte del array. Método tradicional (con baño) o con luz ultravioleta y cinta adhesiva.

Para el corte con cinta adhesiva se coloca el bloque en el microtomo y se aproxima. Cuando esté listo para el corte a 5 micras, se pone la cinta adhesiva sobre la superficie del bloque y se hace el corte despacio. Se vuelve a poner otro trozo de cinta y se hace otro corte, y así sucesivamente. Hay que tener cuidado de no dejar burbujas entre el bloque y la cinta. La cinta evita la posible distorsión y pérdida de cilindros debido al impacto de la cuchilla al cortar.

Cada corte se coloca sobre un porta especial, otra vez teniendo cuidado de no dejar burbujas. Estos portas están tratados para que, con luz ultravioleta, el tejido se fije mejor al cristal. Cada porta con la sección cortada del array se introduce en una lámpara UV durante 45 segundos.

A continuación hay que desprender la cinta adhesiva del porta, sumergiendo éste en un solvente orgánico aproximadamente durante 2 segundos. La cinta se retira con unas pinzas o con la mano. Si se deja más tiempo en el disolvente, puede adherirse más y se desprenderán cilindros con la cinta. Los portas, ya sin cinta, se dejan en xilol durante 1 minuto. Y después se dejan secar.

7. Almacenamiento de cortes:

Introducir los portas en parafina líquida, meter y sacar rápidamente. Dejar enfriar. Esto permite guardar los cortes durante bastante tiempo, protegiendo el tejido de la oxidación u otros daños y manteniendo la antigenicidad después del corte.

Para eliminar la parafina hay que introducir los portas en xilol, en estufa a 56 °C durante 15 a 30 minutos.

8. Factores a tener en cuenta:

- El cilindro de tejido no está perfectamente alineado con el agujero de parafina. Hay que tener cuidado de no mover la pieza basculante de las agujas mientras se introduce. Realinear las agujas a menudo, sobre todo cuando se han cambiado.
- Para evitar la variación en la distancia entre cilindros hay que asegurarse de que las agujas están bien colocadas. Si se aprecia cierta variación en dicha distancia es posible que la aguja se haya torcido al pinchar.
- Si el cilindro de tejido no sale de la aguja fácilmente puede que el borde afilado de la misma se haya mellado, por lo que sería necesario cambiarla.
- Si el cilindro de tejido lo introducimos demasiado en la parafina hay que retirar el cilindro con la aguja pequeña y reemplazarlo por un cilindro nuevo.
- Otras veces el cilindro de parafina para hacer el agujero se adhiere y no sale del bloque. Hay que presionar de nuevo y mover el émbolo con la aguja dentro del bloque para intentar condensar la parafina.
- Si hay problemas con el micrómetro puede ser necesario cambiar la pila. Si ha llegado al límite de su lectura antes de acabar el array, debemos dar la vuelta al bloque array y alinear de nuevo el array para que coincidan los cilindros con nuestra plantilla.

Cantidad máxima de cilindros según su diámetro:

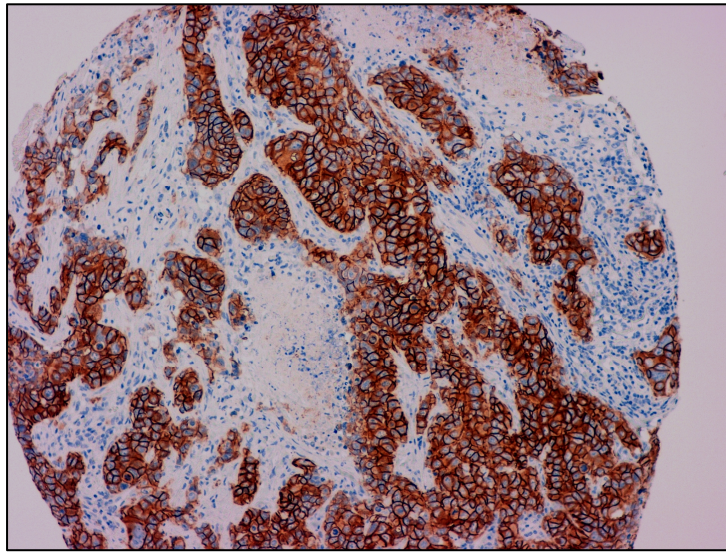
0,6 mm → 28 x 16 = 448 cilindros (1 mm de separación)

1 mm → 18 x 11 = 198 cilindros (1,5 mm de separación)

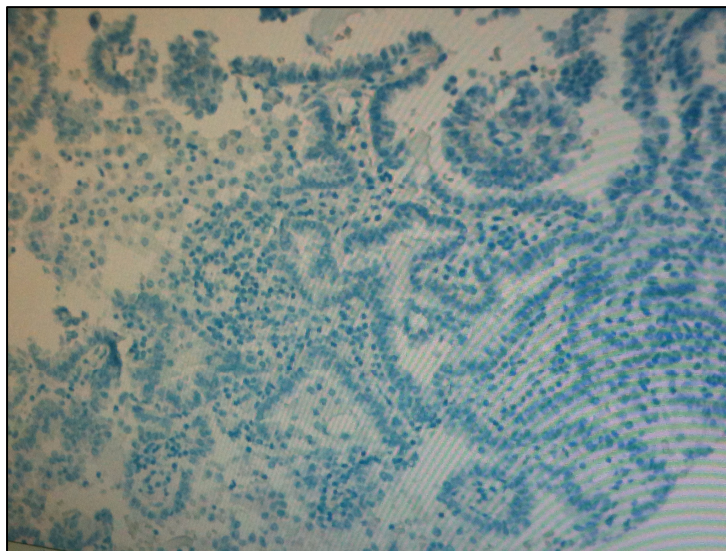
1,5 mm → 15 x 9 = 135 cilindros (2 mm de separación)

2 mm → 10 x 6 = 60 cilindros (3 mm de separación)

Inmunorreactividad positiva para c-erb2

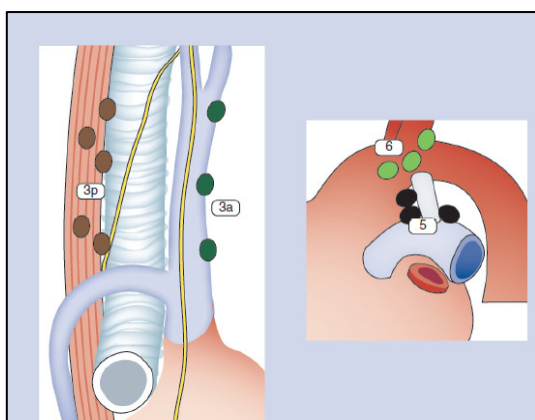
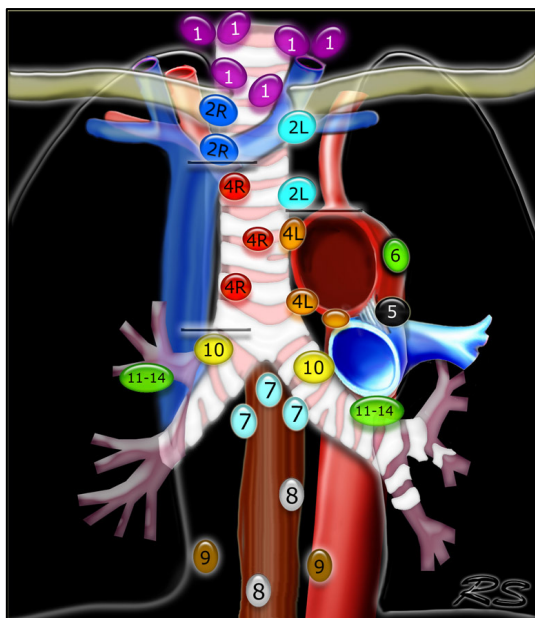


Inmunorreactividad negativa para c-erb2



ANEXO III

Mapa de los territorios ganglionares mediastínicos, base de la estadificación del factor N en el carcinoma broncogénico no microcítico. Desarrollado por el “Lung Cancer Staging Project” de la “International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)”



Supraclavicular zone

- 1. Low cervical, supraclavicular and sternal notch nodes

Superior mediastinal nodes

Upper zone

- 2R. Upper paratracheal (right)
- 2L. Upper paratracheal (left)
- 3a. Prevascular
- 3p. Retrotracheal
- 4R. Lower paratracheal (right)
- 4L. Lower paratracheal (left)

Aortic nodes

AP zone

- 5. Subaortic
- 6. Para-aortic (ascending aorta or phrenic)

Inferior mediastinal nodes

Subcarinal zone

- 7. Subcarinal

Lower zone

- 8. Paraesophageal (below carina)
- 9. Pulmonary ligament

N1 nodes

Hilar/Interlobar zone

- 10. Hilar
- 11. Interlobar

Peripheral zone

- 12. Lobar
- 13. Segmental
- 14. Subsegmental

ANEXO IV

Esquema de las vías oncogénicas del ciclo celular y la apoptosis.

Tomada de Wikipedia (libre de copyright)

