

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina I



**MODELO PRONÓSTICO MULTIDIMENSIONAL EN
CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO MICROCÍTICO
RESECADO**

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

Rodrigo Alonso Moralejo

Bajo la dirección de los doctores

Ángel E. López Encuentra
Carlos J. Álvarez Martínez
Ricardo García Luján

Madrid, 2013



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA

MODELO PRONÓSTICO MULTIDIMENSIONAL
EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO
MICROCÍTICO RESECADO

Rodrigo Alonso Moralejo
Madrid Mayo de 2012

INFORME DEL DIRECTOR/ES DE LA TESIS

Fecha _____	Fecha _____	Fecha _____
Firma _____	Firma _____	Firma _____
D.N.I. _____	D.N.I. _____	D.N.I. _____

EVALUADORES ESPECIALISTAS EN LA MATERIA (7)

artº. 4.9 b y 4.9 c de la Normativa de desarrollo del R.D. 1393/2007 (Deberá indicarse cual de los especialistas está incluido en el programa de Doctorado)

Nombre	<input type="checkbox"/> INTERNO	D.N.I
Centro		
Nombre		D.N.I
Centro		
Nombre		D.N.I
Centro		

APROBACIÓN DEL ÓRGANO RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE POSTGRADO (3)

(Se deberá reflejar la aprobación de la admisión a trámite por el Órgano Responsable del Programa de Postgrado, acompañando a este impreso los informes señalados en el art. 4.6, y los emitidos por los especialistas señalados en el apartado anterior, de acuerdo con la Normativa de Desarrollo de la UCM, del R.D. 1393/2007, por el que se establece la ordenación de las enseñanzas universitarias oficiales.

Fecha _____ Firma _____

Ángel E. López Encuentra, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA

Que D. Rodrigo Alonso Moralejo, Licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “**MODELO PRONÓSTICO MULTIDIMENSIONAL EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO MICROCÍTICO RESECADO**” .Tras examinar y revisar dicho trabajo considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a de dos mil doce

Fdo.: Dr. López Encuentra

D. Carlos J. Álvarez Martínez, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA

Que D. Rodrigo Alonso Moralejo, Licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “**MODELO PRONÓSTICO MULTIDIMENSIONAL EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO MICROCÍTICO RESECADO**” .Tras examinar y revisar dicho trabajo considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a de dos mil doce

Fdo.: Dr. Álvarez Martínez

D. Ricardo García Luján, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Asociado de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA

Que D. Rodrigo Alonso Moralejo, Licenciado en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “**MODELO PRONÓSTICO MULTIDIMENSIONAL EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO MICROCÍTICO RESECADO**”. Tras examinar y revisar dicho trabajo considero que reúne los criterios de originalidad, rigor científico y calidad, por lo que doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a de dos mil doce

Fdo.: Dr. García Luján

A Belén,

AGRADECIMIENTOS:

Son muchas las personas a las que quiero agradecer su ayuda y conocimiento para conseguir terminar esta tesis. A todas ellas querría expresarles mi agradecimiento más sincero:

A mis co-directores de tesis, a los Dres. García Luján y Álvarez Martínez, sin su ayuda y paciencia, éste proyecto seguiría en el limbo de lo teórico y posiblemente aún en fase de redacción.

Al Dr. López Encuentra, alma de ésta tesis, sin su tenacidad, su dirección sutil e implicación en la transmisión de los elementos más básicos de esta patología, hubiese resultado imposible llegar a buen puerto.

A los anatomopatólogos Dra. Enguita Valls, Dr. R.Peralto, Dr. López Ríos y Dra. Conde Gallego, sin su trabajo actual y pasado, un clínico habría capitulado ante los misterios de la biología molecular.

Al profesor Cuezva, con sus entrevistas y generosidad en la difusión del conocimiento, con sus participaciones en nuestros cursos y con sus ánimos permanentes, ha permitido encajar las diversas piezas de este puzzle.

A los miembros del Instituto de Investigación Sanitaria i+12, Dr. David López y Dr.

Gómez de la Cámara que han empleado su valioso tiempo en iluminar un mar de dudas.

A mis compañeros de servicio, sin su formación durante el periodo de la residencia y su confianza en mi trabajo, no sería la persona que soy ahora, ni se hubiese despertado el gusanillo de saber más y porqué ocurren las cosas. Mencionando especialmente a Javier, Eduardo y Fefa que además de su apoyo profesional, han convertido en un placer el ir a trabajar cada mañana.

A mi familia, mis padres y mi hermana, que en los momentos malos creyeron en mí y en mis posibilidades, dedicándome cariño, apoyo incondicional y disciplina, además de los valores necesarios para ser persona y médico.

A la próxima generación, a Javier y a Nacho, que son presente y futuro.

A Belén, anima mea, compañera y amiga, sin tu amor y alegría, sería mucho más difícil y aburrido terminar con estos retos.

A Juan, Borja M., Enrique, Blanca, Ricardo, Raquel, Tolkien, Fernando, Borja A., Almu, amigos de la infancia, compañeros de la vida, colegas de viaje, gracias por dejar vuestro sello indeleble en mi persona y trabajo.

Glosario de abreviaturas

ACC: Acetil Coenzima A Carboxilasa.

AJCC: American Journal Cancer Committee.

AKTp: Proteina Kinasa Activada Fosforilada.

ATS: American Thoracic Society.

BM: Biología Molecular.

β -F1-ATPasa: subunidad catalítica β del complejo H^+ -ATP-sintetasa.

CB: Carcinoma Broncogénico.

CBM: Carcinoma Broncogénico Microcítico.

CBNM: Carcinoma Broncogénico No Microcítico.

CDK2: Ciclina Dependiente de Kinasa 2.

CDK6: Ciclina Dependiente de Kinasa 6.

COX2: Ciclooxygenasa 2.

DS: Desviación estándar.

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.

ENS: Encuesta Nacional de Salud.

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

ERS: European Respiratory Society.

GADPH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa.

GCCB-S: Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de SEPAR.

IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer.

IHQ: Inmunohistoquímica.

Hsp60: Heat shock proteins 60.

L-R: Test de Log rank.

MSC: Ministerio de Sanidad y Consumo.

MTe: Matrices de Tejido.

MM-MTe: Marcadores Moleculares de Matrices de Tejido.

NV: No Valorable.

OMS: Organización Mundial de Salud.

OR: Odds Ratio.

PK: Piruvatokinasa.

RB: Retinoblastoma.

RR: Riesgo Relativo.

Rx: Radiografía de Tórax.

SEPAR: Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica.

TAC: Tomografía Axial Computarizada.

TC-LD: Tomografía Computarizada de Baja Radiación.

TTF1: Factor de Transcripción Tiroideo 1.

TNMc: Clasificación TNM clínica.

TNMp: Clasificación TNM quirúrgico-patológica.

UE: Unión Europea.

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer.

W-G: Test de Wilcoxon-Gehan.

Índice:

A. RESUMEN.....	15
B. INTRODUCCIÓN.....	18
1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	18
1.1 PREVALENCIA.....	19
1.2 MORTALIDAD.....	20
2. CLASIFICACIÓN ANATOMO-PATOLÓGICA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	21
3. CLASIFICACIÓN TNM DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	23
3.1 CLASIFICACIÓN CLÍNICA	23
3.2 CLASIFICACION QUIRÚRGICO-PATOLÓGICA.....	24
4. BIOLOGÍA MOLECULAR Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	25
4.1 ASPECTOS BÁSICOS DE LA CARCINOGENESIS.....	25
4.2 GENES RELEVANTES EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	26
4.2.1 CLASIFICACIÓN SEGÚN CARACTERÍSTICAS MUTACIONALES Y SU FUNCIÓN BIOLÓGICA.....	26
4.2.1.1 ONCOGENES	26
4.2.1.2 GENES SUPRESORES TUMORALES.....	27
4.2.2 CLASIFICACIÓN SEGÚN VIA BIOQUÍMICA.....	28
4.3 MARCADORES MOLECULARES E HISTOLOGÍA.....	29
4.4 MARCADORES MOLECULARES Y PRONÓSTICO.....	29
5. FACTORES MOLECULARES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y PRONÓSTICO EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	33
6. MATRICES DE TEJIDO.....	35
6.1 CONSTRUCCIÓN DE MATRICES DE TEJIDO.....	35
6.2 UTILIDADES Y APLICACIONES EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	36
7. FACTORES PRONÓSTICOS EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO...36	36
7.1 FACTORES RELACIONADOS CON LA EXTENSIÓN ANATÓMICA (TNM).....	37
7.2 FACTORES CLÍNICOS.....	38
7.3 FACTORES MOLECULARES.....	38
8. CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE O DE LA TERAPIA EN SU RELACIÓN CON CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	39
8.1 TABACO Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	39
8.1.1 FACTOR DE RIESGO.....	39
8.1.2 BIOLOGÍA MOLECULAR.....	40
8.1.3 FACTOR PRONÓSTICO.....	41
8.2 ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	42
8.2.1 INCIDENCIA.....	42
8.2.2 FACTOR DE RIESGO.....	42
8.2.3 FACTOR PRONÓSTICO.....	43

8.3	EDAD Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO.....	43
8.3.1	FACTOR DE MORBI-MORTALIDAD PERIOPERATORIA.....	43
8.3.2	FACTOR PRONÓSTICO.....	44
8.4	DEMORA QUIRÚRGICA COMO FACTOR PRONÓSTICO.....	44
C.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	46
D.	DISEÑO, POBLACIÓN Y MÉTODOS.....	47
1.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	47
2.	POBLACIÓN ELEGIBLE.....	47
3.	MÉTODOS.....	47
3.1	MÉTODOS CLASIFICATORIOS DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO NO MICROCÍTICO (CBNM.....	47
3.2	REALIZACIÓN DE LAS MATRICES DE TEJIDO (MTe).....	48
3.3	VALORACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	49
3.4	ELABORACIÓN DE BASES DE DATOS.....	50
3.5	VARIABLES MOLECULARES MITOCONDRIALES.....	50
3.6	ANÁLISIS PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES DE EXTENSIÓN ANATÓMICA DEL TUMOR, CLÍNICAS Y ANALÍTICAS.....	52
3.7	ANÁLISIS PRONÓSTICO LOS MARCADORES MOLECULARES.....	52
3.8	ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.....	53
3.9	ELABORACIÓN DE MODELO PRONÓSTICO MULTIDIMENSIONAL.....	53
E.	RESULTADOS.....	56
1.	POBLACIÓN DEL ESTUDIO.....	56
2.	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON LA EXTENSIÓN TUMORAL.....	56
3.	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DEL PACIENTE.....	56
4.	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE MARCADORES MOLECULARES.....	56
5.	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LOS FACTORES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.....	57
6.	ANÁLISIS PRONÓSTICO UNIVARIANTE.....	57
6.1	VARIABLES RELACIONADAS CON LA EXTENSIÓN ANATÓMICA TUMORAL Y LA ESTIRPE.....	57
6.2	VARIABLES RELACIONADAS CON EL PACIENTE.....	58
6.3	MARCADORES MOLECULARES.....	58
6.4	FACTORES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.....	59
7.	ANÁLISIS MULTIVARIANTE POR PARTICIÓN RECURSIVA.....	60
F.	DISCUSIÓN.....	63
1.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON LA EXTENSIÓN ANATÓMICA DEL TUMOR.....	63

2.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS.....	64
3.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LOS MARCADORES MOLECULARES.....	66
4.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LOS FACTORES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL	68
5.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO MULTIVARIANTE POR PARTICIÓN RECURSIVA	69
G.	CONCLUSIONES	73
1.	GENERALES.....	73
2.	ESPECÍFICAS POR HIPÓTESIS.....	75
H.	TABLAS	77
I.	FIGURAS	110
J.	BIBLIOGRAFÍA	117

A) RESUMEN

Introducción

En la célula tumoral existen cambios en la vía del metabolismo energético, participando en la célula eucariota la mitocondria de forma fundamental. En la actualidad se considera que la estimación de la supervivencia en el Carcinoma Broncogénico (CB) está basada fundamentalmente en los descriptores de extensión anatómica (clasificación TNM), aunque existen otras variables que también influyen en la valoración pronóstica.

Objetivo:

El objetivo del estudio actual es determinar el valor pronóstico de la expresión de los marcadores de la firma bioenergética mitocondrial (β -F1-ATPasa) en una población de pacientes con carcinoma broncogénico no microcítico (CBNM) reseado, así como elaborar un modelo pronóstico de supervivencia que integre factores anatómicos, de acuerdo con la estadificación TNM del año 2010, junto con marcadores clínicos, marcadores moleculares y factores de expresión mitocondrial.

Hipótesis:

En CBNM, el análisis conjunto de factores pronósticos múltiples (clasificación TNM, marcadores moleculares, factores mitocondriales y variables clínicas) aporta mejoras, biológica y clínicamente relevantes, y estadísticamente significativas, en la predicción de la supervivencia sobre los métodos clásicos, basados únicamente en la extensión anatómica del tumor (clasificación TNM).

Población y métodos:

Estudio prospectivo y longitudinal de pacientes con CBNM en estadios I-IIp (estadificación TNM de 2010) intervenidos con resección completa en el Hospital Universitario 12 de Octubre entre el 01/10/1993 y el 30/09/1997. Las variables TN patológicas (Grupo A), clínicas (Grupo B), analíticas (Grupo C), marcadores moleculares (grupo D) y factores mitocondriales (grupo E) fueron recogidas en 134 pacientes. La capacidad de discriminación pronóstica de cada grupo de variables, y su conjunto, se determinó mediante el cálculo del área bajo la curva ROC o C-índice.

Resultados

El 90% de la población son varones, con una edad media de 66,8 años (DE: 8), siendo el 66% tumores epidermoides. No se ha objetivado que exista una relación estadísticamente significativa entre la intensidad de expresión de β -F1-ATPasa y la supervivencia, aunque los casos con mayor intensidad de expresión muestran una tendencia a una mejor supervivencia clínicamente relevante (53% de supervivencia a 5 años vs 36%; $p=0,14$).

El valor pronóstico de los distintos factores analizados y agrupados presentan las siguientes áreas bajo la curva ROC (C-índice): 0,58 (Grupo A), 0,68 (Grupo B), 0,61 (Grupo C), 0,66 (Grupo D) y 0,58 (Grupo E). En el modelo pronóstico multidimensional, considerando de forma conjunta las variables seleccionadas para los cinco grupos el C-índice fue de 0,72 (IC 95% 0,63 – 0,81), con diferencias estadísticamente significativas al compararse con los grupos de variables individuales A, C y E (desde $p=0,005$ a $p=0,05$). Las variables con mayor discriminación pronóstica son la existencia de diabetes mellitus, el tamaño tumoral, la expresión molecular del marcador del ciclo celular p27 y la demora temporal entre diagnóstico y cirugía.

Considerando los patrones obtenidos en cada rama del árbol pronóstico del modelo conjunto, la supervivencia global a cinco años fue calculada para cada nodo terminal. Dada la similitud (o semejanza) pronóstica de alguna de las ramas, éstas fueron combinadas de acuerdo a su probabilidad de supervivencia a 5 años en tres grupos: Grupo 1 ($n=55$) con una probabilidad de supervivencia a 5 años que abarca entre el 67% y el 72,4%; Grupo 2 ($n=33$) con una supervivencia del 40,5% y el grupo 3 ($n=45$) con una supervivencia del 24,5%

Conclusiones:

En esta serie de pacientes con estadios iniciales de CBNM reseca los casos con mayor intensidad de expresión de la proteína mitocondrial β -F1-ATPasa tienen una mayor supervivencia, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

En pacientes con carcinoma broncogénico no microcítico en estadios iniciales, la integración de factores anatómicos, clínicos y moleculares en un modelo conjunto discrimina el pronóstico más eficazmente que el uso exclusivo de la clasificación TNM.

B) INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO

El carcinoma broncogénico (CB) es el tumor que da lugar a la mayor mortalidad por cáncer, tanto a nivel mundial como en España¹.

En el comienzo del siglo XX el CB era una enfermedad rara, con el incremento del consumo de tabaco a lo largo del siglo, su incidencia aumentó de tal modo que ha constituido una epidemia de dimensión internacional, que ha afectado tanto a países desarrollados, como en vías de desarrollo, y ya bien entrado el siglo XXI se trata de una entidad muy prevalente y sin perspectiva de disminuir.

En España se dispone de datos de la mortalidad relacionada con el CB desde 1951². Desde 1990, las enfermedades cardiovasculares han sido superadas por el cáncer como primera causa de muerte en España³.

Este aumento se debe fundamentalmente a la generalización del consumo de tabaco, de forma que la tasa de muerte por CB ha aumentado en los últimos 30 años un 224% en varones y un 331% en mujeres, reemplazando desde 1985 en éstas últimas al cáncer de mama como primera causa de muerte por cáncer en EEUU⁴. Estudios pronósticos demuestran que en las próximas dos décadas el CB se incrementará un 2,7% en mujeres, mientras que en varones decrecerá un 1,3%^{5,6}

Entre los hombres, el CB es la principal causa de muerte por cáncer en España⁷, suponiendo el 27,5% del total de fallecimientos por neoplasia, seguido por el de próstata (9,1%) y el de colon (12,3%)

Entre las mujeres españolas la mortalidad por CB pasó de 3,3 por 100.000 habitantes en 1973 a 6,4 en 1997⁸, con un incremento del 1,5% desde 1988⁹, ocupando el sexto lugar en mortalidad por cáncer. Sin embargo, el gran incremento de mujeres fumadoras del 17% en 1978 al 27% en 1997¹⁰ presagia un claro aumento de la incidencia en los próximos años. En los últimos años se ha descrito una estabilización con un ligero descenso de la mortalidad por CB en varones (-0,8%) y un aumento en mujeres (6,3%)¹¹

1.1 PREVALENCIA

Los registros españoles, junto con otros registros europeos, han constituido la Red Europea de Registros de Cáncer (*European Network of Cancer Registries, ENCR*) que recoge la información sobre prevalencia y mortalidad por cáncer en la Unión Europea (UE).

Las fuentes proceden habitualmente de los servicios de documentación clínica y anatomía patológica así como de los registros de mortalidad. Hay algunas limitaciones que podrían justificar la falta de exactitud de los datos existentes, como la falta de exhaustividad en la recogida de datos, su deficiente clasificación y la falta de precisión en las variables.

La tasa de prevalencia de CB en España en 2006 fue de 68,3 casos/100.000 habitantes en varones frente a los 71,8 casos/100.000 habitantes en la UE, y de 13,8 casos/100.000 habitantes en mujeres frente a los 21,7 casos/100.000 de la UE¹². Según las estimaciones de prevalencia en la UE, el CB fue el tumor más frecuente en los hombres tanto en España como en el resto de sus países; sin embargo, en mujeres mientras que en la UE ocupaba el tercer lugar, en las españolas ocupaba el duodécimo¹³. El porcentaje de cambio anual en la mayor parte de los países de Europa Occidental era de -2% -4%, mientras que en mujeres, éste porcentaje variaba entre el -0,6% de Inglaterra y un aumento entre 2-6%, siendo el país con mayor crecimiento el nuestro.¹⁴

15

Respecto a la histología, en España, aún continua predominando los CB de estirpe epidermoide seguidos de adenocarcinomas y tumores de células pequeñas en los varones, mientras que en mujeres son más frecuentes los adenocarcinomas¹⁶, pero esta distribución se está modificando en dirección similar a la de otros países europeos, detectándose un incremento significativo en el porcentaje de adenocarcinomas y descenso de la estirpe epidermoide.¹⁷

Esta distribución, aunque aún es diferente a la de otros países donde son más frecuentes los adenocarcinomas^{18, 19}, es probable que con el tiempo y relacionado con los cambios en los hábitos de consumo de tabaco, vaya disminuyendo la frecuencia de CB epidermoides y aumentando la de adenocarcinomas.

1.2 MORTALIDAD

Dada la escasa supervivencia de los pacientes que padecen un CB, las tasas de incidencia y mortalidad, mantienen una relación estable y próxima a la unidad en todos los países. Respecto a la mortalidad, ésta varía según los diferentes estudios, siendo para España de 49,2 muertes/100000 habitantes y en mujeres 4,7 muertes/100000 habitantes en 2002^{1,4}.

La tasa de mortalidad por esta neoplasia en España se ha incrementado en los últimos 25 años de forma muy significativa pasando del 31,4 por 100.000 habitantes en 1973 al 58,6 en 1997⁹. Respecto a la relación con otros países del entorno, nuestro país se encuentra en una posición intermedia en cuanto a la mortalidad, siendo mayor en varones en países como Hungría y Bélgica e inferior en países nórdicos como Suecia o Islandia. En mujeres también la tasa de mortalidad mayor es en Hungría, y Polonia, y la menor en países nórdicos²⁰

Dentro de nuestro país existen también diferencias notables siendo regiones como Asturias y Extremadura las de mayor mortalidad en varones y las de menor las Islas Canarias¹⁶

2. CLASIFICACIÓN ANATOMO-PATOLÓGICA DEL CARCINOMA BRONCOGÉNICO

La primera clasificación histológica del Cáncer de pulmón data de 1924 y la última, que fue propiciada por la *OMS* y la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (*IASLC*), fue publicada 1999, y actualizada en 2004 ²¹estableciendo algunas diferencias con las anteriores:

- 1) En esta clasificación se hace referencia a técnicas especiales no orientadas a la investigación, sino al diagnóstico rutinario, como por ejemplo la inmunohistoquímica (IHQ), microscopía electrónica y biología molecular (BM).
- 2) Se avanza en la sistematización de las lesiones preinvasivas.
- 3) Se establecen criterios definidos para el diagnóstico diferencial de los distintos tipos de tumores neuroendocrinos.
- 4) Se sistematizan las formas de carcinomas de células grandes, combinados y pleomórficos, y se incluyen las entidades nuevas reconocidas en los últimos años.

El número de variantes histológicas de cáncer de pulmón se eleva a 46, de las que el 95% son de tipo epitelial (carcinomas), por lo que en general, los distintos subgrupos se reducen en 5 tipos principales: escamoso o epidermoide, células pequeñas, adenocarcinoma, células grandes o tumor carcinoide. El CB incluye los 4 primeros y sus combinaciones.

A pesar de los avances que ha supuesto esta nueva clasificación, sigue existiendo una gran dificultad diagnóstica y un importante confusión terminológica en diferentes aspectos:

- Los carcinomas neuroendocrinos se engloban en un gran grupo, aunque existen tumores con un abanico de agresividad muy diferente.
- Hay una utilización excesiva del diagnóstico genérico “carcinoma de células grandes”, al ser un diagnóstico de exclusión.
- Existe una gran heterogeneidad histológica en los carcinomas epidermoides, no siendo infrecuente la existencia de carcinomas epidermoides típicos que presentan áreas de atipia y pleomorfismo.

Recientemente se ha publicado^{22, 23} una nueva clasificación internacional para el estudio del adenocarcinoma pulmonar que ha supuesto una modificación respecto a las previas:

- Desaparece el término carcinoma bronquioloalveolar y el adenocarcinoma mixto.
- Para las muestras de tejido resecado se introducen conceptos como el adenocarcinoma *in situ*, el adenocarcinoma mínimamente invasivo y el adenocarcinoma invasivo con cinco variantes histológicas (tabla I).
- En muestras de pequeño tamaño o citológicas se establece la necesidad de clasificar como escamoso y adenocarcinoma o en caso de no poderse definir con certeza, por no presentar características histológicas definitivas, clasificarlos como CB “no células pequeñas” (CBNCP) con probabilidad de adenocarcinoma o CBNCP con probabilidad de escamoso, basados en estudios inmunohistoquímicos. Los restantes se clasificarán como CBNCP no específicos.
- Así mismo se considera la necesidad de tipificar la mutación EGFR en los adenocarcinomas extendidos y aquellos CBNCP no específicos también extendidos, debido a su implicación terapéutica.

El empleo de técnicas de biología molecular (BM) es muy importante en el desarrollo de esta clasificación histológica ya que, por un lado, permite confirmar la heterogeneidad del CB y por otro permitirá renovar esta clasificación en el futuro^{24, 25}.

3. CLASIFICACION TNM DEL CARCINOMA BRONCOGENICO

La clasificación del CB está basada en su extensión anatómica, y utiliza tres parámetros (T, N, M) para describir la extensión tumoral. Los objetivos de esta clasificación serían:

- a) Seleccionar el tratamiento.
- b) Estimar el pronóstico.
- c) Evaluar los resultados del tratamiento.
- d) Permitir el intercambio de información entre diferentes grupos de trabajo.
- e) Contribuir a la investigación de los tumores.

La última edición de la clasificación TNM es la aparecida en 2010²⁶, que es idéntica para la Unión Internacional contra el Cáncer (UICC) y para el Comité Americano Contra el Cáncer (AJCC). Esta clasificación ha sido reconocida por la American Thoracic Society (ATS), la European Respiratory Society (ERS) y la SEPAR.

La unificación de estas clasificaciones permite homogeneizar las series y favorece los objetivos de la clasificación. Esta clasificación se basa en 3 parámetros anatómicos (tabla II):

- a) Extensión del tumor primario (T): se define por el tamaño tumoral, localización endobronquial del tumor y estructuras locales afectadas.
- b) Ausencia o presencia de metástasis regionales (N): define la ausencia o presencia de afectación ganglionar, y si está existe, el grado de extensión.
- c) Ausencia o presencia de metástasis a distancia (M).

Una vez clasificados esos 3 parámetros los tumores se agrupan en diferentes estadios tumorales de similar extensión anatómica y parecido pronóstico, que permite simplificar las múltiples categorías del TNM en unos pocos estadios (tabla III- IV).

La clasificación del cáncer de pulmón puede realizarse en diferentes momentos de la enfermedad. En general se distinguen dos tipos de clasificaciones:

3.1) Clasificación clínica (TNMc)

Es la realizada antes del tratamiento y su objetivo es establecer la extensión tumoral para adjudicar el mejor tratamiento a cada paciente. En la práctica es útil para seleccionar aquellos casos que serían candidatos a tratamiento quirúrgico.

Las pruebas necesarias para esta clasificación responden a diferentes grados de certeza, existiendo diferentes guías o recomendaciones que orientan sobre el modo de indicar las pruebas necesarias para la estadificación clínica entre las que se encuentra la de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)²⁷.

3.2) Clasificación quirúrgico-patológica (TNMp)

Es la que se realiza tras el acto quirúrgico en los tumores resecaos y que se basa en los datos de la clasificación clínica, los obtenidos en el acto quirúrgico y los del estudio anatómo-patológico de la pieza reseca.

Tiene la ventaja de que es más fiable a la hora de establecer el pronóstico del paciente pero el inconveniente de que sólo entre el 18-20% de los CB son intervenidos. En décadas previas se publicaron distintos trabajos que comparaban las clasificaciones clínicas y patológicas del cáncer de pulmón, encontrándose acuerdos que oscilaban entre el 47 y 55% de los casos^{28, 29}.

En un estudio del Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (GCCB-S)³⁰, de los 2337 casos en los que se pudo efectuar la comparación clínica-patológica, en 1108 casos (47%) coincidían las 2 estadificaciones. Este índice era mayor (75%) en los estadios más precoces (IA y IB), siendo muy escaso en estadios más avanzados (8-23%) (Estadios IIB al IIIB).

En la determinación de la clasificación quirúrgico-patológica resulta esencial la evaluación de la afectación ganglionar regional (N). La mejor forma de clasificar la resección pulmonar es la estadificación ganglionar intraoperatoria. El impacto de la afectación ganglionar en el pronóstico facilita la toma de decisiones sobre la indicación de tratamientos adyuvantes. Se considera un elemento clave para considerar una cirugía completa y un requerimiento esencial en el control de calidad de la cirugía³¹ La extensión de la evaluación ganglionar dependerá de las implicaciones pronósticas, de la posible inclusión en tratamientos complementarios, incluso de la posibilidad de recidiva local de la enfermedad.

Por tanto, la clasificación anatómica de la extensión tumoral tiene la ventaja de que es un método consistente y reproducible para establecer el pronóstico del cáncer de pulmón, aunque no es el único elemento que juega un papel pronóstico importante en el CB.

4. BIOLOGIA MOLECULAR Y CARCINOMA BRONCOGENICO

El actual sistema de estadificación es insuficiente para predecir con certeza la evolución ante un tratamiento y el pronóstico en un paciente individual. Los marcadores moleculares pueden aportar información adicional respecto al pronóstico de supervivencia y pueden predecir que pacientes se van a beneficiar de un tratamiento quimioterápico dirigido, ya sea basado en el platino o en otros fármacos específicos^{32, 33}

Muchos marcadores presentan utilidad en la predicción de supervivencia independientemente de la estadificación TNM, incluyendo oncogenes^{34, 35, 36, 37} (*K-ras*, *BclII*, *Her2/neu*, *EGFR*), genes supresores tumorales (*p53*, *RB*, *p16*, *p27*), moduladores del ciclo celular (ciclinas), moléculas relacionadas con la invasión tumoral (CD44), moléculas relacionadas con la angiogénesis y factores de actividad mitocondrial^{38, 39}.

En los últimos años se ha producido un gran avance en los conocimientos acerca de la identificación de las diversas alteraciones genéticas relacionadas con el cáncer y en especial con el desarrollo del CB⁴⁰⁻⁴³.

4.1 ASPECTOS BÁSICOS DE LA CARCINOGENESIS

Hay que considerar algunos aspectos básicos en la carcinogénesis del CB, así como los principales genes y vías moleculares relacionadas, y el papel de los marcadores moleculares como factor pronóstico en el CB⁴²⁻⁴³.

Generalmente los genes cuyas mutaciones se encuentran relacionadas con el cáncer se dividen en dos grandes grupos en base a sus características mutacionales y a su función biológica:

1) Oncogenes: son genes cuya función biológica conlleva la activación de vías que promueven el crecimiento y la división celular. Son genéticamente dominantes y es suficiente la variación de un alelo para desarrollar la alteración reproductora celular.

Sus alteraciones genéticas dan lugar a un aumento de la función de la proteína para la que codifican. Las principales anomalías genéticas son mutaciones puntuales, amplificación génica y traslocaciones cromosómicas.

2) Genes supresores tumorales: estos genes regulan de forma negativa los procesos que conllevan un crecimiento y división celular. Son genes recesivos, es decir,

para su disfunción requieren la mutación de los dos alelos. La inactivación bialélica de estos genes se suele producir mediante la mutación de un alelo y la pérdida (LOH, *Loss of Heterozygosity*) del otro.

Gracias a las mutaciones en estos genes, la célula adquiere una serie de actividades que permiten el crecimiento y desarrollo del tumor que incluyen: capacidad de generar sus propias señales mitogénicas, resistencia a la influencia de señales inhibitorias, evasión de la apoptosis, capacidad ilimitada de proliferación, capacidad para desarrollar una red vascular propia y capacidad para invadir tejidos.

4.2 GENES RELEVANTES EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO.

Hasta la actualidad se han descrito algunos genes y proteínas claramente relacionados con la carcinogénesis de los tumores pulmonares (figura 1). Estos genes pueden clasificarse de diferentes maneras.

4.2.1 CLASIFICACIÓN SEGÚN CARACTERÍSTICAS MUTACIONALES Y SU FUNCIÓN BIOLÓGICA

Según esta clasificación hay 2 tipos de genes:

4.2.1.1) ONCOGENES:

1. *Oncogen K-RAS*: Pertenece a la familia de genes *RAS*, si bien el 90% de las mutaciones encontradas en el CB pertenecen al *KRAS*. Se encuentra predominantemente en el CBNM especialmente adenocarcinomas (entre el 29% al 57% casos) ^{44,45}. La mayoría de mutaciones consisten en un cambio del aminoácido guanina por timina y está claramente relacionado con los carcinógenos del tabaco.

Las mutaciones K-ras se han relacionado con la baja respuesta a tratamiento con inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y baja respuesta a quimioterapia sistémica⁴⁶.

2. *Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)*: pertenece a la familia *erbB* (en la que también se incluye el *C-erbB-2* también llamado *HER2/neu*). Ambos son receptores tirosina quinasa.

Influye en la activación de la proteína RAS y por tanto en la división celular y apoptosis. Está presente en un 25% de CBNM en población caucásica, siendo más frecuente en carcinomas epidermoides y carcinomas bronquioloalveolares y se presenta

más frecuentemente en no fumadores^{47, 48,49}. En población oriental este porcentaje es significativamente mayor, especialmente en adenocarcinomas de pacientes no fumadores.^{50, 51}

Las mutaciones del *EGFR* y del *KRAS* tienen la misma consecuencia biológica ya que participan en la misma cascada de señales y por tanto son mutuamente excluyentes.

3. Familia MYC: la alteración suele consistir en la amplificación génica y son mucho más frecuentes en el carcinoma broncogénico microcítico (CBM) o de células pequeñas (40% frente al 20% de CBNM)^{52,53}. Su función es activar la transcripción de genes relacionados con el crecimiento celular como la *B-Catenina*.

4. Oncogen BCL-2: se encuentra más frecuentemente en el CBNM (95% frente a 75% en el CBM) y se encuentra aumentado en las células basales del epitelio peritumoral⁵⁴.

4.2.1.2) GENES SUPRESORES TUMORALES

1 Gen supresor p53: es el gen más frecuentemente mutado en todos los cánceres y también en el CB^{55, 56,57} siendo más frecuente en el CBM que en el CBNM (70% frente a 50%), y dentro de éstos últimos más frecuentemente en la estirpe epidermoide. Su inactivación está relacionada con el tabaco^{58, 59}. Regula la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, apoptosis y reparación celular destacando entre ellos el *p21* y el *MDM2*.

2 Genes supresores p16 y Retinoblastoma (RB): son genes implicados en el ciclo celular. Las alteraciones del gen *p16* son más frecuentes en el CBNM mientras que las del *RB* lo es en el CBM⁶⁰.

Se inactivan por mutaciones puntuales o hipermetilación del DNA. El gen *p16* es un inhibidor de proteínas quinasas dependientes de ciclinas (*CDK2- ciclina E*, *CDK4- ciclina D*) que permiten la progresión del ciclo celular. Su alteración permite el paso de la célula de fase de reposo a replicación de DNA.

3 Genes supresores LKB1 y PTEN: El gen *LKB1* suele alterarse por mutaciones puntuales y es típico de pacientes fumadores con histotipo de adenocarcinoma⁶¹. Es capaz de inhibir directamente a la proteína mTORp que está directamente implicada en el crecimiento celular e inhibición de la apoptosis. Está mutado en el 30% de los CBNM y parece tener un papel prominente en el desarrollo de metástasis⁶².

El gen *PTEN* se encuentra alterado fundamentalmente en el CBM y promueve el crecimiento también a través de la vía del *mTORp*.

4.2.2 CLASIFICACIÓN SEGÚN LA VÍA BIOQUÍMICA

Clasificándose según la vía en la que intervienen, e incluyendo sólo aquellos marcadores relevantes en CB incluidos en nuestro estudio, se dividen en diferentes subgrupos (tabla V).

1) Ciclo celular: (figura 2) incluye la familia de las *ciclinas* (*A*, *B1*, *D1*, *E*)^{63,64} *Ciclinas* *kinasa dependientes 2 y 6* (*CDK2* y *CDK6*), *oncogén myc*, *gen supresor p16*⁶⁵, *gen p21*, *gen p27*, *gen Ki-67*, *gen supresor RB*, y *Cdc6*.

2) Vía del p53: incluyen el *gen supresor p53* y el *gen MDM2*⁶⁶.

3) Apoptosis (muerte celular programada): (figura 3) *oncogén BCL-2*, receptor *FAS* (sus niveles se reducen en los CB adenocarcinomas escapando de la apoptosis)⁶⁷, *caspara 3* (efector final de la apoptosis con actividad proteasa)⁶⁸, *Survivina* y *Factor de Transcripción NF-KB*.

4) Reparación del DNA

5) Moléculas de adhesión: *Beta- Catenina*, *E- cadherina*^{69,70}.

6) Factores de crecimiento y receptores que permiten la transducción de señales: proteína Kinasa p activada (*AKTp*), *EGFR*, *oncogén c-erbB2*, *proteína mTORp*, *p-Acetil- coenzima A carboxilasa (ACC)*, *proteína S6 (PS6)* y *gen supresor tumoral LKB1*.

7) Marcadores de células epiteliales.

8) Detoxificadores.

9) Relacionados con la angiogénesis.

10) Hormonas.

11) Otras: *Ciclooxigenasa 2 (COX-2)*, *p63*, *Factor de Transcripción del tiroides 1 (TTF-1)* y *alpha-CP4*.

En general en un tumor no se encuentra una única alteración de un solo marcador, sino que suelen existir alteraciones genéticas simultáneas en distintos oncogenes y genes supresores tumorales.

4.3 MARCADORES MOLECULARES E HISTOLOGÍA

No todas las alteraciones génicas se encuentran igualmente representadas en los diferentes tipos de tumores. En la tabla VI se resumen las alteraciones moleculares más importantes según la estirpe histológica de CB en la que es más frecuente que se presenten, si bien la mayor parte de los marcadores se han encontrado, salvo excepciones, en casi todas las estirpes histológicas de CB.

Un caso excepcional es el del *gen supresor p53* que es la mutación más frecuente en CB y que tiene una distribución muy similar entre las diferentes estirpes histológicas, ya que se da en un porcentaje similar en el CBM y en CBNM.

4.4 MARCADORES MOLECULARES Y PRONÓSTICO

Se está realizando un gran esfuerzo para analizar el papel que podrían jugar los marcadores moleculares en el pronóstico del CB, de forma que se pudieran añadir a los factores pronósticos derivados de la estadificación anatómica (TNM) y a otras variables clínicas con significado pronóstico.

En los últimos veinte años cientos de artículos han aparecido proponiendo diferentes biomarcadores moleculares que puedan tener un significado pronóstico en el carcinoma broncogénico no microcítico. Actualmente existen marcadores que se han descrito como factores pronósticos independientes, como la Ciclina E, la Ciclina B1, p21, p27, p16, survivina, colágeno XVIII y el EGFR⁷¹; en otros no se ha encontrado un significado pronóstico al incluirlos en análisis multivariante^{72,73}.

Esta disparidad de resultados se debe, entre otras causas, a la complejidad clínica e histológica del CB. Probablemente, más que estudiar una sola alteración debe considerarse un conjunto de alteraciones moleculares o un enfoque multidimensional.

Los diferentes resultados que se obtienen entre los estudios podrían explicarse por diferentes causas⁷⁴:

- 1.- Los estudios están basados en series pequeñas.
- 2.- Los seguimientos de la supervivencia se realizan a corto plazo.
- 3.- Hay problemas en la selección de las variables en los estudios multivariantes, ya que se pueden excluir variables que hayan demostrado tener una significación pronóstica.
- 4.- Existen diferencias en la determinación de las variables moleculares (técnicas y valores).

La necesidad de aplicar unos estándares de calidad en la publicación de artículos de marcadores tumorales pronósticos desembocó en la publicación de las llamadas normas REMARK⁷⁴ a mediados de la década pasada. En una revisión bibliográfica posterior encaminada a la determinación de la aplicación de dichas normas⁷⁵ demuestra, una escasa adherencia a las mismas encontrando que en menos de la mitad de las publicaciones evaluadas se reflejaba adecuadamente los ítems recomendados en dichas normativas. A pesar de ello existen bastantes estudios que hacen mención a alteraciones de factores moleculares individuales, que parecen condicionar el pronóstico del CB.

Se analizan los datos existentes en la literatura para cada uno de los marcadores incluidos en nuestro estudio, de forma individual, y posteriormente los datos existentes según la estirpe histológica expresando en cada caso si se trata de un factor predictor positivo (mejor pronóstico) o negativo (peor pronóstico) para la supervivencia en CB.

Estos estudios hacen referencia en su mayor parte a pacientes con CBNM resecaado y por tanto en estadios precoces. En la mayoría de ellos el estudio del marcador se realiza en muestra de tejido tumoral resecaado y el análisis del marcador se obtiene, en general, mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ).

A continuación se reflejan los datos pronósticos existentes para cada marcador molecular incluido en nuestro estudio (tabla VII), ordenados según la vía bioquímica en la que intervienen (tabla V):

1) Marcadores del ciclo celular:

- **Ciclina A:** su expresión parece estar asociada a peor pronóstico en todos los subtipos histológicos⁷⁶.

- **Ciclina B1:** su expresión está asociada a peor supervivencia en pacientes con CB resecaados en estadio clínico I, especialmente en los carcinomas epidermoides^{77, 78}.

- **Ciclina D1:** su expresión se asocia a peor supervivencia. Este resultado afecta fundamentalmente a la estirpe adenocarcinoma^{79, 80, 81, 82}.

- **Ciclina E:** existen estudios en los que su expresión se asocia a peor supervivencia en CBNM resecaados en adenocarcinoma y en combinación con expresión negativa de p27^{83, 84, 85}.

- **CDK2 y CDK6:** su expresión también está relacionada con una peor supervivencia fundamentalmente en carcinomas epidermoides, que es donde se expresan más frecuentemente⁸⁶.

- **p16:** En CB escamoso en estadios iniciales su sobreexpresión se asocia a mejor pronóstico⁸⁷.

- **p21 y p27:** la sobreexpresión del gen p21 especialmente asociada a la expresión de EGFR^{88,89} y la sobreexpresión de p27 indican mejor pronóstico^{90,91}

- **RB:** la pérdida o inactivación de este gen se asocia a peor pronóstico tanto en carcinomas epidermoides como en adenocarcinomas⁹², mientras que la sobreexpresión parece relacionarse con un mejor pronóstico⁹³.

- **Ki-67:** es una proteína nuclear involucrada en la regulación de la proliferación celular. La expresión de este marcador predice peor pronóstico en CBNM^{93,94}.

- **Cdc6:** no hay datos que lo relacionen con la supervivencia.

2) Vía del p53:

- **p53:** el valor pronóstico de las mutaciones en este gen es controvertido si bien en general se le adjudica un factor pronóstico adverso^{95,96} especialmente en adenocarcinomas⁹⁷. Existen otros trabajos que no han demostrado diferencias en la supervivencia⁹⁸

- **MDM2:** su expresión parece relacionarse con una peor supervivencia en CBNM reseca⁹⁹, especialmente asociado en forma de índice apoptótico con otros marcadores moleculares.¹⁰⁰

3) Apoptosis celular

- **BCL-2:** Su sobreexpresión se ha descrito como factor adverso¹⁰¹ en CBM; en CBNM hay estudios que no demuestran influencia en la supervivencia⁷⁹ mientras que otros describen como favorable su expresión en CBNM reseca¹⁰².

- **Caspasa 3:** Varios estudios lo relacionan con un mejor pronóstico¹⁰³.

- **Survivina N:** su expresión parece asociarse con peor pronóstico¹⁰⁴

- **Factor de transcripción NFκB:** no hay datos que lo relacionen con la supervivencia

- **Receptor FAS:** los pacientes con CBNM que expresan este receptor tienen mejor supervivencia que los que no lo expresan¹⁰⁵, especialmente en CBNM en estadios avanzados.

4) Moléculas de adhesión:

- **Beta-catenina:** el incremento en su expresión parece predecir un mejor pronóstico¹⁰⁶.

- **E-cadherina:** por un lado hay datos que relacionan su expresión con un mejor pronóstico en CBNM resecado¹⁰⁷ por otro, hay estudios que relacionan su falta de expresión con un mayor poder metastático y tendencia a la escasa diferenciación celular¹⁰⁸

5) Factores de crecimiento y receptores que permiten la transducción de señales:

- **AKT α :** su sobreexpresión se asocia con un pronóstico favorable fundamentalmente en epidermoides¹⁰⁹.

- **mTOR α :** Existen datos contradictorios, por un lado su sobreexpresión está relacionada con peor pronóstico¹¹⁰ mientras que otros artículos defienden que en adenocarcinomas se relaciona con mejor pronóstico.¹¹¹

- **EGFR:** hay datos que relacionan su expresión con un peor pronóstico en CBNM resecados^{112, 113} y muchos estudios demuestran asociación entre mutaciones del EGFR y la respuesta al tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa en adenocarcinomas, con mejoría de la supervivencia.¹¹⁴

La expresión de mutaciones de EGFR también se ha visto incrementada en aquellos pacientes con adenocarcinoma que desarrollan derrame pleural asociado, en comparación a los que no (68,5 vs 50%).¹¹⁵

- **c-erbB2:** su sobreexpresión se asocia con peor pronóstico en CBNM en estadios III-IV¹¹⁶ y en adenocarcinomas¹¹⁷.

- **ACC:** no hay datos que lo relacionen con la supervivencia.

- **PS6:** no hay datos que lo relacionen con la supervivencia.

- **LKB1:** no hay datos que lo relacionen con la supervivencia.

6) Otras

- **COX-2:** parece jugar un papel en la angiogénesis del CB si bien este papel no está muy aclarado. Hay estudios que informan de que su expresión tiene un papel pronóstico negativo en el CBNM resecado¹¹⁸.

- **TTF 1:** parece que los pacientes con CBNM resecados que expresan TTF1 tienen un mejor pronóstico que los que no lo tienen¹¹⁹.

- **p63:** su expresión parece asociarse con mejor pronóstico en CBNM en especial en la estirpe epidermoide¹²⁰.

- **γ CP4:** no hay datos que lo relacionen con la supervivencia.

5. FACTORES MOLECULARES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y PRONÓSTICO EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO.

La mitocondria ocupa un papel central por su implicación en la génesis y progresión de patologías humanas muy diversas como son el cáncer¹²¹ y las enfermedades neurodegenerativas¹²². La mitocondria es el orgánulo sensor y ejecutor del programa de apoptosis¹²³. La mitocondria en respuesta a distintos estímulos de muerte libera al citoplasma proteínas que son esenciales para la ejecución y el desmantelamiento ordenado de la célula. Se ha demostrado que alteraciones de la función apoptótica de la mitocondria contribuye a la progresión del cáncer¹²⁴.

La relación de la mitocondria y del metabolismo energético en la etiología – patogenicia del cáncer ha sido un tema poco desarrollado. Recientemente, se ha producido un renacimiento de la mitocondria en la biología del cáncer motivado por la relevancia observada en la ejecución de la muerte celular. En este sentido se ha demostrado que los cambios en el metabolismo energético de la célula tumoral son una característica fenotípica que comparten la inmensa mayoría de los tumores de hígado, mama, colon, pulmón, riñón, esófago y estómago¹²⁵⁻¹²⁸. Estos cambios consisten en la represión selectiva de la expresión de la proteína "cuello de botella" de fosforilación oxidativa de la mitocondria (subunidad β -F1-ATPasa del complejo H⁺-ATP sintasa) con la consiguiente inducción de enzimas del metabolismo glucolítico, con aumento en la expresión de sus marcadores gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y Piruvato Quinasa (PK) a medida que se produce la progresión del tumor¹²⁵⁻¹²⁹.

Este cambio fenotípico de la célula tumoral tiene importantes aplicaciones clínicas desde el punto de vista del diagnóstico y del pronóstico de los pacientes^{38,125, 127, 128} y, previsiblemente, para el diseño de futuras pautas de tratamiento del CBNM. Así la represión selectiva de la expresión de la proteína β -F1-ATPasa en la célula tumoral se ejerce mediante control de la traducción de su mRNA (β -mRNA)¹³⁰.

Hace ya más de 80 años, Warburg sugirió que la alta glucolisis aeróbica que caracteriza a la mayoría de las células tumorales debía ser el resultado de la alteración de la función productora de energía de sus mitocondrias¹³¹. La denominada hipótesis de Warburg ha sido considerada durante mucho tiempo como un epifenómeno del cáncer aunque resultados recientes de varios grupos de investigación han contribuido a su revitalización¹³² siendo variadas las hipótesis que se han propuesto para explicar el fenotipo glucolítico de los tumores¹³³. Una primera evidencia experimental demostró la

alteración del proteoma de la mitocondria en tumores humanos, así como su potencial utilidad en clínica^{125, 128}, que fue posteriormente confirmada por otros autores¹³⁴⁻¹³⁸. Esta alteración mitocondrial ocurre de forma pareja a la inducción de marcadores glucolíticos en el tumor¹²⁵⁻¹²⁸, lo que apoya la hipótesis original de Warburg y aporta una base sólida para contemplar la posibilidad de que la alteración de la función productora de energía de la mitocondria esté íntimamente ligada a la progresión tumoral. Hay que resaltar como la expresión de β -F1-ATPasa, así como de otros índices proteómicos que expresan la actividad mitocondrial de la célula y que hemos venido en denominar como “la huella bioenergética y/o mitocondrial del cáncer”, tienen un gran valor como marcadores de la supervivencia global y libre de enfermedad en pacientes con carcinomas de colon¹²⁵.

Más recientemente se ha demostrado la gran sensibilidad de estos marcadores (>97%) para el diagnóstico y el pronóstico de pacientes con carcinomas de pulmón¹²⁷ y de mama¹²⁸. Es previsible que la “huella bioenergética” del tumor tenga además valor para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas así como para la predicción de la respuesta al tratamiento en los pacientes oncológicos. En este sentido, otros autores¹³⁹ han realizado la primera aportación que indica que la expresión de las proteínas que definen “la huella mitocondrial del cáncer” constituyen marcadores predictivos de la respuesta al tratamiento con 5-fluorouracilo.

Finalmente, la importancia del metabolismo energético en la progresión del cáncer está avalada por la constatación de que la ejecución de la apoptosis está molecular y funcionalmente ligada al metabolismo energético de la célula constituyendo, muy posiblemente, dos caras de una misma moneda^{123,124}.

Los parámetros de estudio de la actividad mitocondrial mencionados (β -F1-ATPasa, GAPDH) se complementan con el estudio de la expresión de Hsp60 y de la piruvato kinasa (PK), permitiendo el cálculo de diversos índices que interrelacionan la actividad de fosforilación oxidativa con la vía glucolítica. A partir de los marcadores de actividad de fosforilación oxidativa y glucolítica, se han descrito diferentes índices metabólicos que sirven para determinar la actividad bioenergética de estas células tumorales, siendo los más empleados el cociente β -F1-ATPasaX/Hsp60X (ICBB) y el índice bioenergético celular (BEC). El ICBB relaciona la actividad de las proteínas mitocondriales β -F1-ATPasa (proteína fundamental en la fosforilación oxidativa) y Hsp-60 (proteína estructural mitocondrial), mientras que el índice BEC relaciona las proteínas mitocondriales β -F1-ATPasa y Hsp60 con el marcador de glucolisis GADPH.

6. MATRICES DE TEJIDO

La idea de estudiar muchos tejidos simultáneamente en una única sección surge en los años 1980. Sin embargo, la técnica de las matrices de tejido (MTe) o *arrays* tisulares no fue descrita con detalle hasta 1998 y permite estudiar de manera rápida y precisa una gran cantidad de cilindros histológicos en una sola sección histológica. Los beneficios de ésta técnica son la rapidez, la estandarización (las mismas condiciones experimentales se aplican a todas las muestras), y debido al gran número de muestras usualmente incluidos, generalmente son útiles para determinar asociaciones genotípicas-fenotípicas con alto poder estadístico.^{140, 141}

6.1 CONSTRUCCIÓN DE MATRICES DE TEJIDO

Las MTe permiten el análisis de cientos de marcadores tumorales (usando fundamentalmente técnicas de IHQ o hibridación *in situ*) en secciones consecutivas de un bloque tumoral, con un mínimo requerimiento de tejido, permitiendo la homogeneidad de las muestras.

Los pasos necesarios para su construcción son los siguientes:

- 1) Seleccionar áreas de interés en los sucesivos bloques de parafina obtenidos del tejido tumoral (“bloques donantes”).
- 2) Obtención de cilindros de tejido mediante sondas de aproximadamente 0,6 mm de diámetro de esos bloques.
- 3) Construcción de un bloque de parafina que actuará como receptor (“bloque receptor”) y posterior realización de huecos cilíndricos para poder albergar los cilindros de tejido donante.
- 4) Se traslada el cilindro del bloque donador al receptor con lo que se acaba el bloque de la matriz (*array*).
- 5) Corte del bloque de la matriz con el microtomo.
- 6) Depósito de las secciones en portas.

El único problema que podría plantear esta técnica es que la propia heterogeneidad del tumor influyera en los resultados de los análisis, pero esto no suele suceder ya que, como regla general, cada tumor debe ser incluido al menos en duplicado y en un primer paso se realiza una selección muy cuidadosa de las áreas de tumor que van a ser muestreadas.

6.2 UTILIDADES Y APLICACIONES EN CARCINOMA BRONCOGENICO

Los estudios de MTe tienen dos utilidades fundamentales en CB:

- 1- Validación conjunta de marcadores individuales publicados previamente: es la aplicación más inmediata de las matrices de tejido, ya que permite estudiar una gran cantidad de proteínas de forma conjunta en muestras de diferentes pacientes con CB¹⁴⁰.
- 2- Confirmación de la información procedente de matrices de DNA, de forma que los genes identificados puedan validarse, en su expresión proteica, con matrices de tejido¹⁴².

Por otra parte desde el punto de vista clínico las principales aplicaciones de las MTe son similares a los de la expresión génica:

- 1- Correlación de marcadores moleculares con datos clínicos, en especial con la supervivencia, de manera que se puedan identificar marcadores con valor pronóstico¹⁴³.
- 2- Correlación de los marcadores moleculares con datos clínicos como la recurrencia de la enfermedad.¹⁴⁴
- 3- Diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos histológicos de CB.
- 4- Diagnóstico diferencial entre neoplasia y tejido pulmonar sano.
- 5- Correlación con otros datos moleculares o genéticos.

7. FACTORES PRONÓSTICOS EN CARCINOMA BRONCOGÉNICO.

En los pacientes con CB existen varios desenlaces de interés como pueden ser el de supervivencia global, el de supervivencia específica por cáncer, el de calidad de vida o el de respuesta o resistencia terapéutica, pero los más estudiados son el de supervivencia global o específica para CB.

En general, los factores pronósticos de supervivencia en CB pueden englobarse en tres grandes grupos: anatómicos (TNM), clínicos y moleculares.

7.1 FACTORES RELACIONADOS CON LA EXTENSIÓN ANATÓMICA (TNM).

La clasificación TNM es una escala clasificatoria en la que se recogen elementos individuales del tumor. Actualmente está activa la última clasificación TNM del año 2010, resultado de la evaluación de una base de datos de más de 80.000 pacientes, y cuyas diferencias principales fueron reflejadas anteriormente. Esta clasificación ofrece muchas ventajas pero también plantea una serie de limitaciones:

- la estadificación más exacta a nivel pronóstico es la quirúrgica, existiendo el problema de que sólo se consigue extirpar aproximadamente un 20% de los CB diagnosticados; la estadificación TNMc tiene una baja certeza clasificatoria si se compara con la estadificación TNMp^{30, 145}.

- otras limitaciones son secundarias a la duda sobre el valor pronóstico de otros descriptores de la clasificación T (neumonitis obstructiva, afectación a más o menos de 2 cm de carina, derrame pleural, etc.).

En los estadios iniciales I-II, el tratamiento es quirúrgico, siempre y cuando el paciente cumpliera criterios de operabilidad. A pesar de esto, cuando se analizan supervivencias a largo plazo en CB, se detectan grandes diferencias entre pacientes con estadios similares; por ejemplo, en CBNM T1N0M0 se han observado supervivencias que oscilan entre el 68 y 93% a 5 años¹⁴⁶. Esto implica que deben existir otros factores con significado pronóstico, dentro y fuera de la propia clasificación que justifiquen esas diferencias.

Hay estudios de CBNM resecao, en los que en análisis multivariante se ha demostrado el peso del tamaño tumoral como factor independiente en el pronóstico^{147,148}. El problema fundamental radica en que se han establecido diferentes puntos de corte con significación pronóstica entre los diferentes estudios. Hay estudios que establecen el punto de corte pronóstico en el valor TNM clásico de los 3 cms¹⁴⁹. Según otros estudios habría que establecer 3 puntos de corte: < 3 cm; 3-5 cm; > 5cm¹⁵⁰, subdividiendo por tanto el estrato T2. Los estudios publicados por el Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (GCCB-S)¹⁵¹ no han encontrado diferencias pronosticas cuando establecen el punto de corte en 3 cm.

7.2 FACTORES CLÍNICOS.

Existen muchos estudios en los que se observa que hay numerosos factores clínicos que podrían influir de forma independiente en el pronóstico del CB, y hay además de los factores pronósticos relacionados con el tumor, otros factores dependientes del propio paciente.

Dentro de estos factores se incluirían las determinaciones de laboratorio (calcio, Hemoglobina, LDH o albúmina) y los datos clínicos: pérdida de peso, estado clínico general (*performance status*), edad, sexo, tabaco, estado marital, comorbilidad, EPOC, tabaquismo, calidad de vida o presencia de síntomas^{152, 153, 154, 155}.

Existen trabajos en los que se elaboran “índices de comorbilidad” en los que se incluyen diferentes enfermedades asociadas como factor pronóstico independiente en CB^{156, 157}. Se describen factores como la cardiopatía isquémica, la edad y la pobre función pulmonar como factores predictores del éxito de una cirugía curativa¹⁵⁸.

Cuando se han elaborado métodos multivariantes con los factores de extensión TNM y los factores clínicos¹⁵⁹, se ha demostrado que el área bajo la curva ROC para predecir el pronóstico a 5 años no es mayor de 0,7, por lo que existiría un margen para la mejora predictiva en el CB. Es en este sentido donde los factores moleculares y los factores de actividad mitocondriales podrían jugar una labor pronóstica, lo que permitiría incrementar esa capacidad predictiva mejorando el área bajo la curva.

7.3 FACTORES MOLECULARES.

Este apartado se expone en el capítulo previo de biología molecular y cáncer. Existen datos que afirman que hay determinados marcadores que parecen jugar un papel independiente en la predicción del pronóstico de supervivencia en CB. Sin embargo, en ocasiones los datos no son concluyentes, y en otros contradictorios.

Es por esta razón que probablemente sean necesarios estudios que, en lugar de dirigirse a un marcador o un pequeño grupo de marcadores, engloben conjuntos de alteraciones moleculares más amplias. Por tanto, es fundamental en el CB una buena interrelación entre las bases de datos clínicas, que incluyen la supervivencia a largo plazo de pacientes no seleccionados, y las técnicas de análisis masivos de genes o de proteínas.

8. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL PACIENTE O DE LA TERAPIA EN SU RELACIÓN CON EL CB.

8.1 TABACO y CARCINOMA BRONCOGENICO

8.1.1 FACTOR DE RIESGO

El consumo de tabaco es responsable de unos 4,8 millones de muertes anualmente en el mundo y la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2030 esa cifra pueda ascender a 10 millones de personas, lo que hará del tabaco la principal causa de muerte global¹⁶⁰. En países de nuestro entorno se considera causa atribuible de la muerte en el 19% de los fallecimientos (27% en varones y 11% en mujeres)¹⁶¹.

Es conocido que el consumo de tabaco es la principal causa de CB¹⁶², siendo sus productos tóxicos los responsables del 90% de tumores en varones y del 60-80% en mujeres⁴. Dado que sólo el 10-15% de los pacientes fumadores acaban desarrollando la enfermedad y que aparezca en personas no expuestas al humo, sugiere que debe existir algún componente de susceptibilidad genética. A éste respecto existen casos muy raros de síndromes de herencia mendeliana asociadas a un CB. Se ha estimado que el riesgo relativo de padecer un CB, cuando se tenía familiares afectos, era de 1,8; si el familiar lo padecía antes de los 60 años ese riesgo era de 2,6¹⁶³. Entre los genes posiblemente implicados existen diversos polimorfismos de los que se encargan de modular la respuesta del organismo frente a sustancias cancerígenas (genes CYP, Citocromo p450). En definitiva, la combinación de una predisposición genética con la exposición a carcinógenos ambientales conducen al desarrollo de un CB.

Existen diversos estudios epidemiológicos prospectivos que demuestran el papel que juega el tabaquismo en la génesis del cáncer ya que el riesgo relativo (RR) de padecer CB oscila entre 15-30 veces en relación con los no fumadores¹⁶⁴.

El tabaco contiene un gran número de agentes cancerígenos, demostrados o potenciales; al menos 55 de los más de 2000 componentes del tabaco tienen ese potencial¹⁶⁵.

No parecen existir diferencias en cuanto al sexo¹⁶⁶ como factor de riesgo individual, en cuanto a la predisposición de desarrollar CB entre los fumadores, y las diferencias en incidencia parecen estar en relación con las características del consumo.

Algo similar sucede en relación con la raza, en que la diferencia de incidencia entre ellas también parece relacionarse con los hábitos del consumo y no con factores biológicos.

La tendencia creciente del consumo de tabaco en la población española se refleja en la Encuesta Nacional de Salud (ENS) del Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC) de 2006, en la que se establece el porcentaje de fumadores en la población adulta en un 26% (32% en varones y 21,2% en mujeres).¹⁶⁷

En este sentido hay una clara tendencia en el sexo masculino a reducir la prevalencia del consumo de tabaco (en 1972 era el 70%) y en el sexo femenino a incrementarla (en 1972 era del 15%). Entre el 89 al 95% de los pacientes diagnosticados de CB son fumadores activos o exfumadores¹⁶.

El 50% de los CB se diagnostican en pacientes ex fumadores, lo que supone un dato importante, ya que en las futuras estrategias de cribado poblacional se deberían incluir probablemente tanto fumadores como ex fumadores. En la última ENS del MSC del año 2006 sólo el 20% de la población se declara ex fumadora¹⁶⁷.

En cuanto al tabaquismo pasivo el RR de desarrollar carcinoma broncogénico no microcítico (CBNM) oscila entre 1,24 y 1,48 en relación con los que no tienen contacto habitual con personas fumadoras^{168,169}.

8.1.2 BIOLOGIA MOLECULAR

Existen diversos estudios que demuestran la diferente expresión génica en CB de pacientes no fumadores y fumadores.

De todas las diferencias encontradas hay 3 familias de genes en las que existen diferencias en relación con la exposición al tabaco:

a) Factores moleculares relacionados con fumadores

- Mutaciones del *oncogén K-RAS*: se ha demostrado que son más frecuentes en los tumores de pacientes fumadores (presente en un 30-50%) que en los no fumadores^{170, 171,172, 173}. Existe una mutación con una conversión de una guanina por una timina, vista exclusivamente en pacientes con adenocarcinomas asociadas al consumo de tabaco, comparando con pacientes nunca fumadores (43% vs 0%)^{174, 175}

Tiene la peculiaridad de que estas mutaciones son también más frecuentes en ex fumadores de más de 15 años desde su supresión que en no fumadores, lo que hace suponer que se trataría de mutaciones irreversibles.

- Mutaciones del *gen supresor p53*: los pacientes fumadores tienen un riesgo tres veces superior a los no fumadores de mutaciones de este gen. Se han descrito mutaciones de éste gen en el 70% del CBCP y en el 50% del CBNCP¹⁷³.

Gran cantidad de estudios han detectado transversiones de guanina - citosina por timina - adenosina, típicamente en pacientes con CB de no fumadores^{176, 177}.

b) Factores moleculares relacionados con no fumadores

- Mutaciones del *EGFR*: se han demostrado más frecuentemente en individuos no fumadores que en fumadores^{178, 179, 180}, generalmente cuando aparecen, no suele existir mutación K-ras asociada, y como se ha dicho antes más frecuentemente en mujeres y estirpe adenocarcinoma.

8.1.3 FACTOR PRONÓSTICO

En relación al valor pronóstico del hábito tabáquico en la supervivencia del CBNM, existen estudios que demuestran que el tabaquismo activo es un factor independiente de mal pronóstico en CB; así los pacientes fumadores tienen peor pronóstico que los ex fumadores y que los no fumadores, tanto en supervivencia global como en tiempo libre de enfermedad¹⁸¹. Un meta-análisis del año 2005¹⁸², asegura que el beneficio del cese del hábito tabáquico en pacientes con CB en fases iniciales, genera un beneficio en la supervivencia, más por disminución de la progresión del CB, que por reducción del número de muertes por causa cardiorrespiratoria.

Existen otros estudios en los que aunque la mediana de supervivencia es mayor en los no fumadores que en los fumadores, esta diferencia no llega a tener significación estadística¹⁸³.

En un análisis retrospectivo de 400 casos con CBNM con estadios extendidos¹⁸⁴ se ha objetivado que el tratamiento con quimioterapia en los pacientes no fumadores, o que tienen un índice de paquetes/año < 10, consigue mejor supervivencia que en pacientes que tienen un mayor índice acumulado de carga tabáquica.

8.2. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO

8.2.1 INCIDENCIA

La asociación entre CB y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es bastante frecuente. Existen series quirúrgicas en los que la aparición de ambas entidades ocurre en el 50% de los casos¹⁸⁵, lógicamente ya que el tabaco es el principal agente etiológico de ambas enfermedades. Aunque la relación causal entre ambas entidades no es completamente conocida, algunos estudios¹⁸⁶ sugieren que puedan coexistir en ambas entidades la inflamación crónica, una disfunción inmunológica, la alteración de la activación de los NF-KB, la alteración de las señales de adhesión o la degradación de la matriz extracelular.

Existen varios trabajos que reflejan la mayor incidencia de CBNM en pacientes con diagnóstico de EPOC y que la presencia de EPOC es un factor de riesgo independiente del tabaco para desarrollar CB^{187, 188}. En éste último estudio¹⁸⁸, realizado con pacientes con alta carga tabáquica, la existencia de enfisema radiológico en tomografía computerizada de baja dosis, actuaba también como factor de riesgo independiente para el desarrollo de ésta enfermedad.

Los pacientes con EPOC tienen una mayor frecuencia de CB de la estirpe epidermoide^{189, 190}, y muchas veces esta enfermedad puede modificar la terapéutica del CBNM, bien haciendo al paciente inoperable u obligando a realizar cirugías de resección menores. Estudios recientes¹⁹¹ establecen guías de manejo ligeramente distintas a la evaluación pulmonar preoperatoria clásica, incluyendo de forma sistemática el uso de rehabilitación pulmonar, cese del hábito tabáquico y evaluación individualizada en aquellos casos con áreas de enfisema pulmonar, con el fin de ofrecer cirugías oncológicas útiles a éstos pacientes.

8.2.2 FACTOR DE RIESGO

En cuanto a la posible inclusión de pacientes EPOC en políticas de detección precoz, existen algunos trabajos que afirman que en el seguimiento de pacientes con el diagnóstico de EPOC es más frecuente el hallazgo incidental de cáncer de pulmón, en relación con la población general¹⁹². Por otra parte, parece que el hallazgo incidental de CB estaría relacionado directamente con el grado de obstrucción (FEV1%), incluso en

seguimiento de pacientes a corto plazo (1 a 3 años), y que la incidencia de CB aumenta cuanto mayor es el grado de EPOC medido en términos de FEV1%¹⁹³.

Estos datos son bastante relevantes ya que van a favor de incluir los pacientes con EPOC, sobre todo los moderados - graves, en las políticas de cribado de CB.

8.2.3 FACTOR PRONÓSTICO

La EPOC tiene un papel adverso en la morbi - mortalidad operatoria del CB, y este papel está en relación directa con el grado de obstrucción. Trabajos recientes demuestran mayor porcentaje de complicaciones en aquellos pacientes con EPOC estadios Gold III y IV comparándolos con otros pacientes con estadios menores¹⁹⁴. También el bajo FEV1 postoperatorio se relaciona con mayor tasa de eventos cardiovasculares en pacientes con CB operados¹⁹⁵, con mayor probabilidad de desarrollo de taquicardias supraventriculares, generalmente en pacientes sometidos a una resección quirúrgica mas extensa¹⁹⁶. Se ha relacionado el grado de obstrucción de la EPOC, por tanto el FEV1, bien en términos absolutos¹⁹⁷o en porcentaje del teórico¹⁹⁸ con la morbi-mortalidad perioperatoria.

Existe cierta controversia respecto al factor pronóstico de la EPOC. Existen grupos que afirman que la EPOC es un factor pronóstico negativo en la supervivencia global condicionada a partir de los 2 años en los casos de CBNM resecaado y que existe una correlación entre el grado de alteración del FEV1% en EPOC y el pronóstico¹⁹⁹.En el sentido contrario hay otros estudios en los que no se han encontrado diferencias significativas en la supervivencia a los 5 años entre el grupo de pacientes de CB con EPOC²⁰⁰.Por último es ampliamente conocido que el FEV1 es uno de los principales factores pronósticos en la EPOC²⁰¹.

8.3. EDAD Y CARCINOMA BRONCOGÉNICO

Se está incrementando la mediana de edad de la población mundial, y en España¹⁸⁵ el CB es una enfermedad típica de edades por encima de los 64-68 años.

8.3.1 FACTOR DE MORBI-MORTALIDAD PERIOPERATORIA

Se ha demostrado en análisis multivariante el papel de la edad avanzada como factor de riesgo de morbi-mortalidad perioperatoria en CBNM resecaado²⁰².

Además, en la práctica clínica habitual, el tipo de cirugía, al igual que sucedía con la comorbilidad con la EPOC, puede estar condicionado por la edad avanzada del paciente, con una menor frecuencia de neumonectomías y mayor de lobectomías; en cualquier caso estudios de series de pacientes operados no demuestran diferencia de supervivencia cuando se comparan con jóvenes, siendo el único factor pronóstico en el análisis multivariante el tamaño del tumor²⁰³.

8.3.2 FACTOR PRONÓSTICO

El papel que tiene la edad en la supervivencia a largo plazo de los casos de CBNM resecaado ha sido ampliamente estudiado y los datos existentes son también contradictorios.

Existen publicaciones que no han demostrado diferencias en la supervivencia a 5 años en pacientes con CBNM resecaado por encima de 70 años²⁰⁴. Es secundario, probablemente, a la selección exhaustiva que se realiza en los pacientes de mayor edad, usando criterios muy restrictivos a la hora de indicar la cirugía, excluyendo aquellos casos con peor función pulmonar o con comorbilidad asociada.

Sin embargo, existen otros artículos que demuestran que la edad juega un papel independiente en el pronóstico a largo plazo de casos con CBNM en estadios quirúrgicos¹⁴⁷.

Respecto al tratamiento quimioterápico estudios recientes demuestran que en pacientes ancianos, éste es tan seguro como en jóvenes, y la supervivencia y evolución similar a la de éstos²⁰⁵. Respecto a la radioterapia adyuvante postcirugía existen dudas respecto a su beneficio en éstos pacientes, por lo que se debe limitar su uso a casos individualizados²⁰⁶.

8.4. DEMORA QUIRÚRGICA COMO FACTOR PRONÓSTICO

Uno de los problemas éticos y sociales que afrontan los sistemas públicos de salud es el de la demora quirúrgica entre el diagnóstico y la fecha del tratamiento de los tumores malignos. Es conocido, y respaldado por ciertas publicaciones, que ésta demora tiene importancia en patología tumoral diferente del cáncer de pulmón, especialmente en el cáncer de mama²⁰⁷, suponiendo un mal pronóstico y peor supervivencia en ésta patología.

La demora quirúrgica media para ser sometido a una toracotomía en el GCCB-S en España es aproximadamente de 45 días²⁰⁸. Respecto al cáncer de pulmón existe una

mayoría de trabajos publicados ^{209,210,211,212} en los que ésta demora no parece tener relevancia respecto a la supervivencia y el tiempo libre de enfermedad posterior a la cirugía, con la única excepción de una serie²¹³ dónde existe peor supervivencia en pacientes con mayor demora quirúrgica.

C) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

En CBNM el análisis conjunto de factores pronósticos múltiples (clasificación TNM, factores clínicos, marcadores moleculares y factores de actividad mitocondrial) aporta mejoras, biológica y clínicamente relevantes, y estadísticamente significativas, en la predicción de la supervivencia sobre los métodos clásicos, basados únicamente en la extensión anatómica del tumor (clasificación TNM).

Objetivos:

- Determinar el valor pronóstico de la expresión de los factores mitocondriales de la firma bioenergética celular β -F1-ATPasa en una población de pacientes con carcinoma broncogénico no microcítico resecaado.
- Elaborar un modelo pronóstico de supervivencia que integre factores anatómicos, de acuerdo con la estadificación TNM del año 2010, junto con variables clínicas, marcadores moleculares y factores de expresión mitocondrial.

D) DISEÑO, POBLACION Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio observacional, de cohorte, concurrente y con muestreo desde el diagnóstico de enfermedad.

2. POBLACION ELEGIBLE

Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían un CBNM en estadios iniciales, cumplían criterios de reseabilidad y operabilidad y en todos ellos se realizó una toracotomía con intención curativa.

Se incluyen todos aquellos pacientes recogidos de forma prospectiva que fueron tratados quirúrgicamente en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid entre el 1 de Octubre de 1993 y el 30 de Septiembre de 1997. Por definición se trata de pacientes con CBNM en estadios iniciales de la enfermedad (IAp, IBp, IIAp y IIBp) con resección pulmonar considerada completa. Se trata de una cohorte total de 136 pacientes con un seguimiento por un espacio de 10 años.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: cuando se realizó terapia de inducción, cirugía incompleta, toracotomía exploradora o casos de mortalidad operatoria definida como todas aquellas muertes directamente relacionadas con el acto quirúrgico independientemente del momento y lugar en que se produjera.

3. METODOS

3.1 MÉTODOS CLASIFICATORIOS DEL CBNM

Los criterios de operabilidad funcional del paciente y de operabilidad oncológica del tumor son los descritos en la Pauta de CB del Grupo Cooperativo Médico-Quirúrgico del Hospital Universitario 12 de Octubre²¹⁴ y del Grupo Cooperativo de CB de SEPAR²¹⁵.

El grado de certeza de la clasificación TNM depende de los métodos diagnósticos empleados. En este sentido, y de acuerdo con las organizaciones internacionales de clasificación tumoral (Unión Internacional contra el Cáncer; UICC)

el mayor grado corresponde con los estudios necrópsicos y el menor a los hallazgos clínicos.

La clasificación quirúrgico-patológica N0p precisa de disección ganglionar de al menos 4 áreas linfáticas (áreas 2, 4, 7 y 10 ipsilaterales al tumor), y además no deben existir en la ventana aortopulmonar ni en el área mediastínica anterior (regiones ganglionares 5 y 6) si el tumor afectaba el bronquio principal izquierdo o lóbulo superior izquierdo.

Como método de estadificación quirúrgica ganglionar (Np) se ha utilizado en esta serie el muestreo ganglionar sistemático. Estos requerimientos (muestreo ganglionar sistemático o disección ganglionar sistemática) son imprescindibles para clasificar un tumor como N0p. Durante el periodo de reclutamiento prospectivo de los casos de esta serie (1993-7) no se disponía de tomografía de emisión de positrones ni de ultrasonografía endobronquial.

Se utilizó la 7ª edición de la clasificación TNM para la estadificación del tumor.²¹⁶

3.2. REALIZACIÓN DE LAS MATRICES DE TEJIDO (MTe)

3.2.1.- Selección del material

A) Selección de las preparaciones histológicas

De cada uno de los casos se evaluaron todas las preparaciones histológicas de la pieza quirúrgica contenidas en el archivo de patología de nuestro hospital, seleccionando sólo aquellas que contuviesen una cantidad óptima de tumor, representativa de toda la lesión. Se excluyeron para el estudio aquellas áreas de tumor que tuvieran necrosis, inflamación o queratinización extensa.

B) Selección de los bloques donantes

Se selecciona de cada uno de los casos y los controles el bloque con la mejor relación grosor-representatividad tumoral.

C) Selección de la zona a pinchar en el bloque

D) Diseño de las matrices de tejido

El diseño incluye los siguientes puntos:

- N° total de casos: 136.
- N° total de controles: 15 pulmón no tumoral y 3 amígdalas

3.2.2 Realización del bloque receptor

Para su realización se empleó un arrayer de la marca Beecham Instruments (Hackensack, USA), dotado de medición digital micrométrica.

El proceso de realización del bloque receptor se realizó en una serie de pasos que describimos a continuación

- *PASO 1*: Se toma una “biopsia” de la zona marcada en el bloque donante con una aguja de centro hueco.

- *PASO 2*: Con otra aguja similar a la anterior pero de calibre más fino, se extrae un molde de parafina del bloque receptor.

- *PASO 3*: Se introduce el cilindro tomado del bloque donante en el hueco del bloque receptor.

- *PASO 4*: Se fija el bloque receptor a una temperatura de 37° C.

3.2.3 Corte de las MTe: se realiza mediante microtomía.

3.2.4 Almacenamiento de los cortes: se almacenaron en parafina líquida.

3.2.5 Protocolo del método inmunohistoquímico (IHQ): Los marcadores moleculares en matrices de tejidos (MM-MTe) se estudian con anticuerpos específicos comercializados mediante la técnica de visualización LSAB (Labelled streptavidin-biotin) y el método DAKO EnVision.

3.3 VALORACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se consideran tres categorías en los resultados inmunohistoquímicos de los **marcadores moleculares no mitocondriales**: “positivo” (valor 1), “negativo” (valor 0) y “no valorable (NV)” (valor 6), basándonos en criterios establecidos en la literatura para 29 de los 32 anticuerpos utilizados o por criterios basados en la correlación entre la expresión proteica y el estado genético en los restantes 3 marcadores (*LKB1*, *ACC* y *PS6*).

Todas las preparaciones de IHQ fueron evaluadas independientemente por dos patólogos, quienes valoraron en cada cilindro, de forma semicuantitativa, la intensidad de la expresión proteica y el porcentaje de células positivas. La valoración se hizo sin tener conocimiento de ningún dato clínico, así como tampoco se conocía la distribución de los cilindros del mismo caso dentro de la MTe.

Respecto a **los factores de actividad mitocondrial**, la creación de las matrices tisulares (*tissue microarrays*) se efectuó a partir de la adecuada selección de las

porciones tumorales más representativas de la pieza tumoral resecada. Posteriormente se realizó el análisis de la expresión de las proteínas mitocondriales (β -F1-ATPasa y Hsp60), y de la vía glucolítica (GADPH y Piruvato Quinasa) mediante técnicas de inmunohistoquímica.

La intensidad de expresión de cada proteína se definió como: débil (1); moderada (2); fuerte (3); no valorable (NV). Se estableció un límite, que fue el resultado de la media de los valores de expresión observados en los tejidos normales control. También se estimó el porcentaje de células que expresaban cada uno de los marcadores. En todos los casos el análisis inmunohistoquímico se realizó por la unidad de inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre. Los casos se valoraron primero de forma independiente por dos observadores, y posteriormente se estudiaron de forma conjunta, analizando el grado de consistencia intraobservador. Cualquier discrepancia entre los patólogos, se resolvió via consenso en el momento de la evaluación.

Para el análisis de la supervivencia se excluyeron los casos considerados como no valorables para cada marcador.

3.4 ELABORACIÓN DE BASES DE DATOS

Por diseño, se estableció la existencia de dos bases de datos independientes, la clínica y la patológico-molecular.

Durante todo el proceso, las bases de datos clínicas (datos TNM, características del paciente, tipo de terapia) y las de estirpe con los datos moleculares se rellenaron de forma independiente, con desconocimiento por ambos grupos de investigadores de los resultados de la base de datos que no disponían de los datos conjuntos hasta la fase final con los resultados de los análisis.

Además se mantiene oculta la filiación de los casos durante todo el estudio y para ambas bases de datos. Se realiza la fusión informática de las dos bases de datos mediante un código alfanumérico único por caso.

3.5 VARIABLES MOLECULARES MITOCONDRIALES:

Se crearon cuatro nuevas variables consistentes cada una de ellas en el producto de la intensidad de expresión de las proteínas mitocondriales (β -F1-ATPasa y Hsp60) y de los marcadores glucolíticos (GADPH y PK) por el porcentaje de células que lo

expresan (β -F1-ATPasaX; Hsp60X; GADPHX; PK X). Se realizó el cálculo de los índices metabólicos; ICBB e índice bioenergético celular (BEC) definidos como:

$$- \text{ICBB} = \frac{\beta\text{-F1-ATPasaX}}{\text{Hsp60X}}$$

$$- \text{BEC} = \frac{\beta\text{-F1-ATPasaX} / \text{Hsp60X}}{\text{GADPHX}}$$

Las variables moleculares mitocondriales en estudio son:

- **β -F1-ATPasa i**: intensidad de expresión de β -F1-ATPasa.
- **β -F1-ATPasaX**: producto de intensidad de expresión por el porcentaje de células que la expresan.
- **Hsp60 i**: intensidad de expresión de Hsp60.
- **Hsp60X**: producto de intensidad de expresión por el porcentaje de células que la expresan.
- **GADPH i**: intensidad de expresión de GADPH.
- **GADPHX**: producto de intensidad de expresión por el porcentaje de células que la expresan.
- **PK i**: intensidad de expresión de piruvato quinasa.
- **PK X**: producto de intensidad de expresión por el porcentaje de células que la expresan.
- **ICBB**.
- **Índice BEC**.

3.6 ANÁLISIS PRONÓSTICO DE LAS VARIABLES DE EXTENSIÓN ANATÓMICA DEL TUMOR, CLÍNICAS Y ANALÍTICAS:

Se realiza un análisis bivalente de pronóstico de cada factor relacionado con el paciente y con el tumor, en relación con la supervivencia a 5 años tras la resección. La supervivencia global considera el evento muerte como mortalidad por todas las causas a 5 años tras la resección.

Se decide que estos factores tienen un significado pronóstico cuando presentan una diferencia significativa en supervivencia a un nivel de $p \leq 0,05$ entre los casos con el evento o sin éste por cualquiera de los dos métodos de análisis efectuados:

- Test de Wilcoxon – Gehan.
- Test de Log rank.

3.7 ANÁLISIS PRONÓSTICO DE CADA MARCADOR MOLECULAR.

Se realiza un análisis bivalente de pronóstico de cada MM-MTe, en relación con la supervivencia a 5 años tras la resección. La supervivencia global considera el evento muerte como mortalidad por todas las causas a 5 años tras la resección.

Para el análisis de cada MM-MTe se excluyen aquellos casos con valores no concluyentes para cada marcador, y comparamos la supervivencia entre los casos con marcador ausente o presente.

Se considera que los MM-MTe tienen un significado pronóstico cuando presentan una diferencia significativa en supervivencia a un nivel de $p \leq 0,05$ entre los casos con expresión de MM y los casos sin ella por cualquiera de los dos métodos de análisis efectuados:

- Test de Wilcoxon – Gehan.
- Test de Log rank.

El sentido pronóstico en cada marcador fue considerado de 3 formas:

- a) **Positivo:** Mayor supervivencia cuando el MM-MTe está expresado.
- b) **Negativo:** Menor supervivencia cuando el MM-MTe está expresado.
- c) **No significativo:** No diferencias de supervivencia.

3.8 ANÁLISIS PRONÓSTICO DE LOS FACTORES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.

Para analizar el valor pronóstico de las variables se utilizó el método de Kaplan-Meier para las curvas de supervivencia, y el test de Log Rank para su comparación, considerando $p < 0,05$ como valor estadísticamente significativo.

Para el estudio pronóstico de las variables de intensidad de cada marcador se agruparon los casos de intensidad débil y moderada, y se compararon con intensidad fuerte.

Para el análisis pronóstico de las variables resultado del producto de intensidad de expresión por el porcentaje de células que la expresan se calculó inicialmente la mediana para cada variable y posteriormente se comparó la supervivencia de los casos con valores por debajo y los casos con valores por encima o igual a la mediana.

En los índices metabólicos se calculó la mediana de cada uno de ellos y se dividió en dos grupos, por debajo y por encima o igual a la mediana, estudiando su valor pronóstico mediante los test anteriormente mencionados.

3.9 ELABORACIÓN MODELO PRONÓSTICO MULTIDIMENSIONAL

Las variables iniciales (más de 200) fueron divididas en 5 grupos. Grupo A con las variables relacionadas con el tumor, en el que se incluyen variables cuantitativas y cualitativas que define cada categoría T-N de los estadios I-II, así como el subtipo histológico, Grupo B o grupo de variables clínicas, Grupo C donde se incluyen parámetros analíticos del paciente, Grupo D o grupo de marcadores moleculares con la determinación de la expresión de 32 marcadores que exploran distintas vías bioquímicas de la carcinogénesis y finalmente el Grupo E o grupo de factores de actividad mitocondrial.

Se siguieron distintas fases de análisis para construir el modelo pronóstico:

1. **Primera fase.** En primer lugar se realizó separadamente en cada Grupo (A, B, C, D, E) un análisis univariante mediante el método de Kaplan Meyer, para seleccionar las variables pronósticas con significación estadística. Se eligió un valor $p < 0,3$ como límite para su selección.
2. **Segunda fase.** A continuación, con las variables seleccionadas de cada Grupo se construyó un árbol de clasificación pronóstica elaborado mediante un sistema de partición recursiva usando el algoritmo supervisado de clasificación C4.5²¹⁷ del Interfaz

R de Weca. Se consideraba el estado vital tras un seguimiento de 5 años como una variable dependiente de cada nodo terminal del árbol de clasificación. Paralelamente se retuvieron todas las variables con un valor $p < 0,3$ para el análisis de la tercera fase.

3. **Tercera fase.** El Grupo final del modelo pronóstico multidimensional consideraba conjuntamente todas las variables de todos los Grupos seleccionadas previamente en el análisis multivariante por Grupo (ver segunda fase previa). Se construyó un árbol de clasificación pronóstica elaborado mediante un sistema de partición recursiva tal y como se ha descrito antes.

4. **Cuarta fase.** Con los datos pronósticos de los nodos terminales del árbol de clasificación final del modelo pronóstico multidimensional se calculó la probabilidad de supervivencia a 5 años con el método de Kaplan-Meier²¹⁸

5. **Quinta fase.** La habilidad del modelo para discriminar entre pacientes con o sin el evento se evaluaba mediante el cálculo del área bajo la curva característica operacional (ROC) y midiendo el índice de concordancia (C-index)²¹⁹, y su capacidad predictiva global, con el coeficiente de determinación usando el parámetro R^2 de Nargelkerke, que expresa la variabilidad en los resultados que pueden ser explicados por las variables predictivas seleccionadas²²⁰. El programa STATA se utilizó para el resto de resultados²²¹.

Éste método de partición recursiva se ha usado para el análisis multivariante debido a su habilidad para identificar grupos con similar pronóstico, colocando los distintos grupos de forma jerárquica, y demostrando la relación entre ellos. El sistema de partición recursiva puede reutilizar la misma variable en los distintos segmentos del árbol. En cada segmento se elige el punto de corte más conveniente que optimiza el criterio de partición. Las variables continuas son dicotomizadas para crear dos grupos con diferente probabilidad de ocurrir el evento. Las variables ordinales y continuas, se separaron en $X < c$ versus $X \geq c$.

El árbol de clasificación se realizó con las siguientes condiciones: en el caso de que un nodo esté amplificado, debe haber solamente dos ramas por nodo; el número mínimo de individuos por rama debe de ser mayor de diez; los factores de confianza usados para la selección de variables fue de 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25. (así valores más pequeños provocan menor profundidad del árbol, lo que asocia menos variables al modelo). El árbol que combina menor complejidad (menor número de perfiles) y mayor capacidad discriminatoria (mayor área bajo la curva) es el seleccionado. No se utilizó un contraste estadístico para seleccionar el árbol.

La validez interna del modelo multidimensional fue realizada mediante la técnica “bootstrap”. Esta técnica consiste en obtener múltiples muestras a partir de la muestra original donde se desarrolla el modelo mediante un muestreo aleatorio de casos, con remplazamiento, de la muestra original. En cada una de las submuestras se aplica el mismo método empleado para el desarrollo original del modelo, obteniéndose tantos modelos como submuestras “bootstrap” tengamos. Cada uno de los modelos obtenido en las sub-muestras “bootstrap”, se evalúa en la muestra original. La diferencia entre el promedio de los estimadores en los modelos obtenidos en las muestras bootstrap y el promedio de los mismos en la evaluación de los modelos bootstrap sobre la muestra original nos permite conocer el optimismo de nuestro modelo. El optimismo nos indica cuanto más estamos sobrevalorando el modelo desarrollado, y nos ofrece una estimación de la bondad del modelo cuando se aplica en una nueva muestra ajena a la muestra original.

En nuestra base de datos se detectó una distribución de la medida del tamaño tumoral en centímetros con preferencia de dígito. Por ello, la variable tamaño tumoral fue categorizada usando el procedimiento Schönfeld²²².

E) RESULTADOS:

1. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio inicial incluye 136 pacientes que son todos los casos con CBNM en los que se realizó una toracotomía con intención curativa, en estadios iniciales (IAp, IBp, IIAp y IIBp), recogidos de forma prospectiva en el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid entre Octubre de 1993 y Septiembre de 1997, y una vez excluidos en los que se realizó terapia de inducción o que presentaron mortalidad perioperatoria.

De estos 136 casos, 2 se excluyen del estudio por ausencia de bloque parafinado de material tumoral en el archivo de patología. Por tanto, la población final de nuestro estudio es de 134 casos.

2. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE VARIABLES RELACIONADAS CON LA EXTENSIÓN TUMORAL

El análisis descriptivo de éstas variables está reflejado en la tabla VIII. Se trata de una población con una mayoría de pacientes en estadio I (82%), con un predominio de la estirpe escamosa (66%), seguido de adenocarcinomas (22%), un predominio de tumores con clasificación T2 (76%), mayor cantidad de N0 (82%) y un 77% de los casos con poca o moderada diferenciación celular.

3. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS DEL PACIENTE

El análisis descriptivo de éste conjunto de variables se detalla en la tabla IX. Existe una mayoría de varones 123 (90%) frente a 11 mujeres (8%), una mayoría de no fumadores en el momento del diagnóstico (50%), frente a un 48% de pacientes fumadores, un 30% de pacientes que padecen EPOC, y un 60% que presentan otras comorbilidades.

4. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE MARCADORES MOLECULARES

El análisis descriptivo de éstas variables está sintetizado en la tabla X. En casi todos los marcadores a excepción del NFK β y COX-2, el porcentaje de casos no valorable no supera el 10% del total de casos.

El MM-MTe que estuvo menos presente en las muestras de tumor de CBNM resecado fue el Survivina C y el que más el COX2. Los datos definitivos de cada MM-MTe se obtuvieron tras la lectura independiente de dos patólogos. El acuerdo interobservador supero el 95% en todos los MM-MTe; en el resto, el resultado final se obtuvo por consenso.

5. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE FACTORES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

El análisis descriptivo de estos factores está sintetizado en la Tabla XI. En todos los factores, a excepción de la medida de la intensidad de GADPH, el porcentaje de casos no valorables no supera el 15% del total de casos. El marcador de actividad mitocondrial que tuvo menos intensidad de expresión en las muestras de tumor de CBNM resecado fue la GADPH: en el 64% de los casos. Los datos definitivos de cada factor se obtuvieron tras el acuerdo entre dos patólogos. Cuando existía discrepancia el resultado final se obtuvo por consenso.

6. ANÁLISIS PRONÓSTICO UNIVARIANTE

6.1. Variables relacionadas con la extensión anatómica tumoral y la estirpe

Los resultados de éste análisis están resumidos en la tabla XII. El análisis pronóstico univariante realizado muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a la probabilidad de supervivencia a 5 años (test log Rank) en las siguientes variables:

- Respecto a la escala TNM, presentan mayor probabilidad de supervivencia en 5 años aquellos casos con menor T ($p=0,046$).
- Respecto al tamaño tumoral agrupado en estratos, aquellos con menor tamaño tumoral presenta mayor probabilidad de supervivencia a cinco años ($p=0,04$).
- La ausencia de afectación de la pleura visceral se asocia a mejor pronóstico ($p=0,02$).

En éste análisis pronóstico también objetivamos otras variables relacionadas con el tumor que presentan una probabilidad de supervivencia a los 5 años aumentada, sin alcanzar significación estadística, pero si con relevancia clínica. Estas variables son las siguientes: Estadio clínico, factor Nq, histología, diferenciación celular. Todas ellas tienen una $p<0,3$, y se seleccionaron para el posterior análisis multivariante.

6.2 Variables relacionadas con el paciente

Los resultados de éste análisis están resumidos en la tabla XIII. El análisis pronóstico univariante realizado muestra diferencias estadísticamente significativas respecto a la probabilidad de supervivencia a 5 años (test log Rank) en las siguientes variables:

- La demora diagnóstico – terapéutica, agrupada en menor o igual – mayor que la mediana: los pacientes con menor demora presentan mayor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,003$).
- La existencia de hipertensión arterial sistémica (HTA) se asocia a peor pronóstico ($p=0,007$).
- La EPOC se asocia a peor pronóstico ($p=0,021$).
- La existencia de leucocitosis, agrupada en menor o igual – mayor que la mediana: los que tienen menor leucocitosis tienen mayor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,029$).
- El valor de la albúmina, agrupada en menor que la mediana o igual – mayor que la mediana: aquellos con menor albúmina plasmática tienen peor supervivencia ($p=0,042$).

En éste análisis pronóstico también se objetivan otras variables relacionadas con el paciente que presentan relevancia clínica respecto a la probabilidad de supervivencia a los 5 años, sin alcanzar significación estadística. Éstas variables son las siguientes: Comorbilidad, edad, presencia de tumor previo o diabetes, sexo y valor de la hemoglobina- Todas ellas tienen una $p<0,3$, por lo que se seleccionan para el análisis multivariante.

6.3 Marcadores moleculares

Los resultados de éste análisis están resumidos en la tabla XIV. El análisis pronóstico univariante detecta diferencias estadísticamente significativas respecto a la probabilidad de supervivencia a 5 años (test log Rank) en las siguientes variables:

- La expresión de p16 presenta menor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,017$).
- La expresión de RB presenta mayor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,048$).

En éste análisis pronóstico también se objetivan otras variables asociadas a la probabilidad de supervivencia a los 5 años, sin alcanzar significación estadística pero con una $p < 0,3$, seleccionadas por tanto para el posterior análisis multivariante. Estas variables son las siguientes: la expresión molecular de Cdk2, p27, Ki67, Caspasa 3, Fas, mTORp y PS6.

6.4 Factores de actividad mitocondrial

Los resultados de éste análisis están resumidos en la tabla XV. No se encuentran diferencias significativas respecto a la probabilidad de supervivencia a 5 años (test log Rank) en las variables analizadas.

La expresión de β -F1-ATPasa, agrupada en intensidad leve y moderada vs intensidad fuerte, tiene un potencial valor pronóstico. Aquellos tumores con mayor expresión presentan mayor probabilidad de supervivencia a 5 años (53% vs 36%) ($p=0,14$), que es clínicamente relevante, incluyéndose ésta variable en el posterior análisis multivariante.

7. ANÁLISIS MULTIVARIANTE POR PARTICIÓN RECURSIVA

Las variables seleccionadas para la realización del análisis multivariante con $p < 0,3$ en el análisis univariante fueron 28. Distribuidas por cada Grupo se detallan en la tabla XVI.

El análisis multivariante por cada Grupo selecciona diferentes variables pronósticas independientes. Las variables pronósticas seleccionadas permiten generar múltiples árboles de clasificación. La selección de estos árboles se realizó con las siguientes condiciones: los nodos deben tener el menor número de ramas, preferiblemente dos; el número de individuos por rama debe de ser mayor de diez; los factores de confianza usados para la selección de variables oscilaba entre 0,05 y 0,25, prefiriéndose valores menores si mantenía igual capacidad pronóstica. (valores más pequeños generan menor profundidad en el árbol, y menor número de variables en el modelo final de árbol de clasificación).

De los diferentes árboles clasificatorios se eligieron las variables que generaban mayor capacidad pronóstica. En los grupos A, C y E, la mayor capacidad discriminatoria venía determinada por una sola variable: en el Grupo A por el tamaño tumoral, en el Grupo C por la mediana de leucocitos, y en el grupo E por la intensidad de expresión de BF1 ATPasa. En el Grupo B (variables clínicas) se obtuvieron dos árboles clasificatorios distintos eligiendo aquel que generaba mayor profundidad y capacidad pronóstica, donde las variables con mayor influencia eran la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la presencia de EPOC, la demora quirúrgica y la edad. En el Grupo D (marcadores moleculares), también se generaron dos árboles clasificatorios diferentes, eligiéndose en base a los mismos criterios que el previo; en éste caso las variables con mayor capacidad pronóstica fueron la expresión del Rb, la expresión de ki67, la expresión de p27, y la expresión de cdK2.

La tabla XVII describe dicha selección, por grupos, mostrando el C-índice de discriminación pronóstica y los valores extremos de probabilidad de supervivencia a 5 años.

El valor pronóstico de los distintos factores analizados y agrupados presentan las siguientes áreas bajo la curva ROC C-índice (CI 95%). Ordenadas de mayor a menor capacidad de discriminación pronóstica: Grupo B (variables clínicas) 0,68 (0,58-0,77); Grupo D (marcadores moleculares) 0,66 (0,56-0,75); Grupo C (variables analíticas)

0,60 (0,51-0,68); Grupo A (variables relacionadas con el tumor) 0,58 (0,50-0,66); Grupo E (marcadores de actividad mitocondrial) 0,57 (0,48-0,65).

En el Modelo Multidimensional, considerando de forma conjunta las 28 variables seleccionadas por los cinco grupos, el C-Índex fue de 0,72 (CI 95%, 0,64-0,81), con diferencias estadísticamente significativas (desde $p=0.005$ a $p=0.05$). La comparación del C-índex del modelo conjunto frente a los grupos de variables individuales se muestra en la tabla XVIII y en la figura 4.

No es significativa la diferencia entre el C-índex del Modelo Multidimensional y las variables del Grupo B (clínicas) ($p=0,32$) ni con las del Grupo D (marcadores moleculares no mitocondriales) ($p=0,077$). El coeficiente de determinación R^2 del Modelo Multidimensional fue de 0,20.

El espectro de probabilidad de supervivencia a 5 años también aumenta con el modelo conjunto; entre 0,25 y 0,72; una diferencia entre extremos del 47%.

Las variables con mayor discriminación pronóstica en el Modelo Multidimensional son la existencia de diabetes mellitus, el tamaño mayor de 3 cm, la expresión molecular del marcador del ciclo celular p27 y la demora temporal diagnóstico – terapéutica.

En la figura 5 se muestra el árbol pronóstico final del Modelo Multidimensional tras el análisis multivariante por partición recursiva considerando todas las variables de todos los grupos. Las mayores supervivencias se detectan en el subgrupo de pacientes ($n=14$) con diabetes mellitus (supervivencia a 5 años del 71%), independientemente de las demás variables del modelo. En caso de NO estar presente la diabetes, y dependiendo del tamaño tumoral y de la expresión de la proteína p27 ($n=22$), la probabilidad de supervivir 5 años también es elevada (72%). Finalmente, en la rama restante, dependiendo de la demora diagnóstico – terapéutica y del tamaño tumoral hay un subgrupo de pacientes ($n=19$) con una supervivencia del 67% a los 5 años.

Dada la similitud pronóstica de alguna de las ramas, éstas fueron combinadas de acuerdo a su probabilidad de supervivencia a 5 años en tres grupos: Grupo 1 ($n=55$) con una probabilidad de supervivencia a 5 años que abarca entre el 67% y el 72%, en éste grupo se incluyen la presencia de diabetes mellitus, la NO expresión de p27, y el tamaño 3-5cm; Grupo 2 ($n=33$) con una supervivencia del 40,5%, en éste grupo se incluyen la expresión de p27 y el tamaño tumoral > 5 cm, y el grupo 3 ($n=45$) con una supervivencia del 25,5% (figura 6), que corresponde a los pacientes con mayor demora mediana.

La validación interna del modelo multidimensional se realizó calculando el optimismo mediante la técnica de muestreo “bootstrap”, y sus resultados vienen reflejados en la Tabla XX.

F) DISCUSIÓN

Este trabajo seleccionó, por diseño, la población de CBNM con más probabilidades de que los resultados pronósticos pudieran generalizarse a poblaciones similares. Por ello se ha controlado que se recogieran todos los casos de estadios iniciales operados consecutivamente durante un periodo de estudio dado que es esa la población que universalmente accede a la cirugía con intentos curativos. Además que tuviera un suficiente tiempo de observación (más de 10 años) al ser un estudio pronóstico. Los casos deberían tener la máxima certeza clasificatoria en la estadificación (la realizada con la pieza quirúrgica y con disección ganglionar apropiada) y ser tratados con la máxima potencia curativa (resección completa). Para evitar que la estadificación patológica no estuviera artefactada por tratamientos previos se descartaron los pocos casos con terapia de inducción o neoadyuvante. Dado que el evento en estudio es la mortalidad a medio – largo plazo y por todas las causas, se excluyeron los pocos casos de mortalidad perioperatoria. Todas las variables en análisis fueron recogidas prospectivamente en el momento del diagnóstico y de la terapia quirúrgica, salvo las de biología molecular que se realizaron en un tiempo posterior sobre los bloques de parafina archivados en el banco de tumores del Hospital.

1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LAS VARIABLES RELACIONADAS CON LA EXTENSIÓN ANATÓMICA DEL TUMOR

En nuestra población la mayoría de pacientes tienen estadio Ip (82%), hay un predominio de tumores con estadio T2p (76%), mayor frecuencia de N0p (82%) y de estirpe escamosa (66%), seguido de adenocarcinomas (22%). Estos datos son similares a los descritos en las series nacionales, entre los que los tumores epidermoides¹⁶ son, con diferencia, los más frecuentes, pero diferente a la de otros países en las que la histología más prevalente es el adenocarcinoma^{17, 18, 223}.

Aunque podría interpretarse que una de las limitaciones de éste estudio radica en que el análisis se ha hecho considerando la mortalidad a 5 años por todas las causas y no exclusivamente la mortalidad relacionada con el CB es necesario subrayar que en un análisis multidimensional del pronóstico tanto los factores pronósticos como las causas de los fallecimientos pueden no estar relacionados directamente con el CB. En este

sentido en algunos trabajos la mortalidad por CB puede suponer el 85% del total²²⁴, si bien este porcentaje disminuye si se trata, como sucede en nuestro estudio, de pacientes con CBNM reseca²²⁵.

El análisis pronóstico univariante realizado aporta información significativa, respecto a la probabilidad de supervivencia a 5 años. Similar a lo detectado en otras series de casos¹⁴⁶, los casos con menor T presentan mayor probabilidad de supervivencia a 5 años en relación a los más avanzados ($p=0,046$),

También se objetiva que aquellos casos con menor tamaño tumoral presentan mayor probabilidad de supervivencia a cinco años ($p=0,04$), en concordancia con lo publicado por otros autores¹⁴⁸.

La afectación de la pleura visceral presenta también significación pronóstica ($p=0,02$), con mayor supervivencia a los 5 años de los casos que no la tenían afecta, concordante con la información publicada por otros grupos^{226, 227}.

En éste análisis pronóstico otras variables relacionadas con la extensión tumoral se asociaban al pronóstico aunque sin alcanzar significación estadística, como el estadio TNM, factor Nq, diferenciación celular, que son factores con influencia pronóstica comprobada en la literatura^{148,228,229} Fueron incorporadas al análisis multivariable al superar el nivel prefijado de asociación ($<0,3$).

2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LAS VARIABLES CLÍNICAS Y ANALÍTICAS

En nuestra población destaca un claro predominio de varones ($n=123$; 90%), en concordancia con otras series españolas^{16, 17} lo que no refleja el aumento de incidencia de CB en mujeres que se está produciendo en los últimos años, en similar dirección a lo descrito en otras series¹⁸.

La edad media de ésta serie es avanzada (66,7 años) que coincide con datos de otras series¹⁸⁵.

Existe una mayoría de no fumadores en el momento del diagnóstico (50%), la mayoría ex fumadores, frente a un 48% de pacientes fumadores activos, al igual que en otros trabajos de nuestro entorno, dónde el porcentaje de tabaquismo es del 50%¹⁶.

Existe un 30% de pacientes que padecen EPOC; en otras series éste porcentaje alcanza casi el 50%¹⁸⁵. Estos datos confirman la relación CB y EPOC^{187, 188}. Recientemente se ha descrito el seguimiento de una serie de pacientes con EPOC

durante 5 años detectando una densidad de incidencia de CB de 16,7/1000 persona-año afectando más a pacientes con clasificación GOLD de la EPOC grados 1 y 2 con difusión alterada²³⁰. Existe comorbilidad (cualquiera) en un 60% de los pacientes de nuestra serie, similar a lo ya comunicado (64%)²³¹.

El análisis pronóstico univariante realizado encuentra diferencias significativas en algunas de las variables analizadas. Así, a menor demora diagnóstico – terapéutica hay mayor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,003$). En éste caso la literatura consultada presenta cierta controversia, pues existen artículos que demuestran que no tiene impacto en la supervivencia^{209, 210, 211,212}, mientras que otros²¹³ indican que si la tendría.

La existencia de HTA sistémica parece tener relación pronóstica en ésta población. Aquellos que padecen HTA tienen menor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,007$). Hasta el extremo de mi conocimiento, no existe literatura, que determine que la HTA pueda presentar influencia pronóstica en el CB. La existencia de distintas comorbilidades en el momento del diagnóstico del CB está documentado²³¹, y el acumulo de éstas parecen tener influencia pronóstica negativa en los pacientes con CB^{156, 157}.

En nuestra serie, los pacientes con EPOC tienen menor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,021$). Existe controversia respecto a la EPOC como factor pronóstico. En una población de CBNM operados la EPOC es un factor pronóstico negativo en la supervivencia global condicionada a partir de los 2 años desde la cirugía en los casos de CBNM resecaado, existiendo una asociación entre el grado de alteración del FEV1% en EPOC y el pronóstico¹⁹⁹. En el sentido contrario hay otros estudios en los que no se han encontrado diferencias significativas en la supervivencia a los 5 años entre el grupo de pacientes de CB con EPOC²⁰⁰.

La existencia de leucocitosis parece tener relación pronóstica en ésta población. Los casos que tienen mayor leucocitosis tienen menor probabilidad de supervivencia a 5 los años. ($p=0,029$). En otras series²³², éste parámetro parece tener también influencia negativa en la supervivencia, ya sea en el análisis univariante o en el multivariante asociado a otras discrasias sanguíneas, como la anemia y la trombocitosis.

Los pacientes de esta serie con cifras más bajas de albúmina plasmática tienen peor supervivencia ($p=0,042$); éste hecho está descrito en diversos artículos^{233, 234}. En uno de ellos²³³, se revisan 54 trabajos relacionados con el pronóstico en cáncer de diferentes orígenes en estadios extendidos, entre ellos el CB, estando la

hipoalbuminemia asociada a peor pronóstico. Ésta hipoalbuminemia parece estar relacionada con el índice de masa corporal, pérdida de peso e incremento de proteína C reactiva²³⁵.

3. ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LOS MARCADORES MOLECULARES

La selección de los marcadores moleculares estudiados con matrices tisulares (MM-MTe) es clásicamente uno de los puntos más delicados siendo este apartado donde se encuentran algunas de las principales limitaciones de éste estudio:

- No existe un acuerdo acerca de los MM-MTe que deben estudiarse en los casos de CBNM resecado. De esta forma existen gran cantidad de artículos de proteínas expresadas en CB, la mayoría de los cuales hace referencia exclusivamente a uno o unos pocos marcadores.
- Tampoco existe unanimidad en las técnicas de estudio de matrices tisulares en CB si bien en la gran mayoría de casos se emplean como método las de inmunohistoquímica.
- Para un mismo MM-MTe pueden existir diferentes anticuerpos pertenecientes a diferentes casas comerciales.
- Aún empleando un mismo anticuerpo, la positividad o negatividad de expresión de un determinado MM-MTe en la muestra de tumor resecado depende en la gran mayoría de casos del porcentaje de células tumorales que lo expresan y de la intensidad con que lo hacen, siendo ambas variables muy difíciles de cuantificar, lo que denota en gran medida la posible falta de exactitud de la interpretación final.
- Por último, el hecho de aceptar los resultados de la expresión de un determinado MM-MTe como una variable dicotómica (positivo / negativo), aunque simplifica en gran medida la interpretación de los datos, no es aceptado por un gran número de expertos en este tipo de estudios.

Teniendo en cuenta todas estas limitaciones, la selección de los marcadores moleculares de éste estudio se efectuó tras una revisión de la literatura teniendo en cuenta tres factores fundamentales:

- a) Existencia de datos en la literatura que apoyaban el papel de cada MM-Mte en estudios de CB.

- b) Disponibilidad de anticuerpos específicos homologados para ese marcador.
- c) Existencia de una indicación para su empleo en material parafinado, ya que la muestra de tejido tumoral resecado fue conservada en parafina en el banco de tumores de nuestro hospital.

Finalmente se eligieron 32 MM-MTe (tabla V) de distintas vías bioquímicas de la carcinogénesis.

Utilizando matrices de tejidos, 8 de los 32 marcadores estudiados se expresaron en más del 50% de los casos (tabla X): COX2, LKB1, CiclinaA, RB, CDK2, Ki67, NFK β y p53, representando a la mayoría de las cinco vías bioquímicas exploradas.

El porcentaje de los casos no valorables para los diferentes marcadores no superó el 10% de los casos, a excepción de dos MM-MTe (tabla X): NFK β y COX-2 lo que refleja la escasa pérdida de casos por marcador.

El análisis pronóstico univariante de estos marcadores en nuestra serie encuentra asociaciones estadísticamente significativas en las siguientes variables:

- La expresión de p16: Aquellos tumores que lo expresan presentan menor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,017$), lo cual es contrario a otros artículos publicados⁸⁷
- La expresión de RB: Los tumores que lo expresan presentan mayor probabilidad de supervivencia a 5 años ($p=0,048$), similar a otros trabajos revisados^{92,93}

En éste análisis pronóstico también se objetivan otros siete marcadores moleculares con significación pronóstica ($p<0,2$ en test Wilcoxon-Gehan o Log Rank). De estos, el sentido pronóstico fue positivo (mejor supervivencia) en tres marcadores (Caspasa 3, mTORp, PS6) y negativo en otros cuatro (p27, Ki67, BCL-2 y Fas).

Comparando éstos datos con los de los estudios publicados para cada MM-MTe los resultados serían los siguientes:

- en un marcador Fas¹⁰⁵ los datos no coinciden con los existentes en la literatura.
- en los marcadores Ki67^{93,94} y la Caspasa 3¹⁰³ los datos son coherentes con los estudios publicados
- en los restantes cuatro marcadores o no hay datos o los que existen hasta la actualidad son contradictorios: BCL-2^{101,102}, mTORp^{110,111}, p27^{90, 91,93} y PS6.

4. ANÁLISIS DESCRIPTIVO Y PRONÓSTICO UNIVARIANTE DE LOS FACTORES DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

Los cambios en el metabolismo energético de la célula tumoral consisten en una represión de la expresión de la subunidad catalítica β del complejo H^+ -ATP-sintetasa (β -F1-ATPasa), que es el “cuello de botella” de la fosforilación oxidativa mitocondrial, con el consiguiente aumento de la glucólisis (piruvato quinasa y GADPH), siendo este hecho caracterizado como la “firma bioenergética” del cáncer. Esta disminución de la expresión de la β -F1-ATPasa se ha documentado tanto en modelo animal²³⁶, como en tumores humanos de hígado, colon, riñón, mama, estómago, pulmón y esófago^{38, 125, 128}. En éste estudio se ha objetivado la existencia de dicha relación entre la expresión de la proteína β -F1-ATPasa y la mayor supervivencia de los pacientes.

Respecto a la proteína mitocondrial Hsp-60 no se ha observado cambios en su intensidad de expresión en las células tumorales, salvo en el cáncer de hígado, en el que se ha documentado una disminución en las células tumorales¹²⁵. En nuestro estudio no hemos observado que la intensidad de expresión de la Hsp-60 tenga un valor pronóstico estadísticamente significativo.

El valor pronóstico de estos factores se ha investigado en diversos estudios, demostrándose que los pacientes con cáncer de colon que mostraron niveles mayores de β -F1-ATPasa presentan una mayor supervivencia¹²⁴; y en cáncer de pulmón la β -F1-ATPasa es un marcador de supervivencia independiente del tamaño tumoral y con una relación inversa entre las unidades SUV de la PET y el ratio β -F1-ATPasa/GADPH²³⁷. En nuestro estudio no hemos encontrado que la intensidad de expresión de la proteína de actividad mitocondrial β -F1-ATPasa tenga un valor pronóstico estadísticamente significativo (p: 0,14), aunque los casos con mayor intensidad de expresión de β -F1-ATPasa tienen una mayor supervivencia clínicamente relevante. Esa ausencia de significación estadística puede ser explicada porque el número de casos incluidos en el estudio sea inferior al necesario.

La represión de la β -F1-ATPasa en la célula tumoral llevaría a un aumento de la captación de glucosa, junto con un aumento de la glucólisis y de sus marcadores GADPH y piruvato quinasa. En nuestro estudio no hemos encontrado que exista una relación de supervivencia entre los marcadores de glucólisis, GADPH y piruvato quinasa, al igual que en otros estudios realizados¹²⁵.

A partir de los mencionados marcadores de la firma bioenergética se han elaborado índices bioenergéticos, siendo el más importante de ellos el índice

bioenergético celular (BEC). En un estudio de pacientes con adenocarcinoma de pulmón se observa que el BEC es mayor en adenocarcinoma que en tejido pulmonar normal, que es mayor en tumores bien diferenciados, en tumores T1 y en estadio IA; y además que un índice BEC mayor predice mejor supervivencia a largo plazo sin que se influya por el tamaño tumoral o la afectación ganglionar³⁸. En el presente estudio no hemos encontrado que el índice BEC tenga un valor pronóstico estadísticamente significativo.

5. ANÁLISIS MULTIVARIANTE POR PARTICIÓN RECURSIVA

Este análisis pronóstico multidimensional de 134 pacientes con CBNM, seleccionó diferentes variables TN (tamaño tumoral), clínicas (diabetes, demora) y moleculares (p27), consiguiendo un incremento significativo en la capacidad discriminativa, en comparación con la mayoría de los grupos de factores analizados de forma separada.

La integración conjunta de todas las variables de todos los grupos en un modelo multidimensional alcanzó un área bajo la curva de 0,72 (IC 95% 0,64-0,81) y un coeficiente r^2 de 0,20. Estos datos sugieren que es necesario buscar más variables pronósticas en el CBNM para mejorar los modelos de predicción.

El espectro de probabilidad de supervivencia a 5 años también aumenta con el modelo conjunto con unos extremos entre 0,25 y 0,72. Una diferencia entre ambos del 47%. Ésta diferencia es superior a la descrita por la IASCL / International Union against Cancer / American Joint Committee on Cancer, en los valores más extremos de supervivencia a 5 años entre el estadio Ia y el IIBp, población objeto de nuestro estudio, con una diferencia del 37%²³⁸. La nueva clasificación TNM de 2010, tiene un coeficiente de determinación r^2 menor del 0,30²³⁹, a pesar de la certeza que ofrece en el pronóstico el introducir CB con estadios IIIB y IV dado su alto nivel de letalidad.

En los últimos años se ha demostrado, que los modelos mixtos, basados en la combinación de elementos anatómicos, proteómica y biología molecular incrementan la discriminación pronóstica en comparación con elementos individuales^{240, 241,242}.

Diversas publicaciones, con diferentes poblaciones y tipos de CBNM, han comunicado diferentes C-índice, con valores entre 0,58-0,75^{241, 242,243}. En subpoblaciones determinadas se han descrito valores superiores^{240, 243}. El valor de nuestro C-índice (0,72; IC 95% 0,64-0,81) ésta en el rango de lo publicado.

Para el pronóstico en CB, la suma de variables clínicas mejora el *hazard ratio* de la expresión génica, hasta el punto de hacerlas estadísticamente significativas²⁴⁴, llegándose a sugerir que la recogida de las variables clínicas debía ser efectuadas con el mismo cuidado que la obtención de las moleculares²⁴⁴. En ese trabajo, el C-índice comunicado para estadios iniciales está entre 0,51 y 0,80, con un espectro de supervivencia pronóstica a cinco años (extremos) del 50%²⁴⁴.

El espectro de probabilidad de supervivencia a 5 años del 47% alcanzado en nuestro modelo multidimensional es similar al comunicado por otras publicaciones^{241, 243,244}, e inferior a otras (80%)²⁴⁰. Aunque, lamentablemente, los autores de este último trabajo se han retractado públicamente de sus resultados por demostrar ausencia de reproductibilidad²⁴⁵ invalidando, por tanto, aquellos datos.

En relación al valor pronóstico de las variables incluidas en el modelo (diabetes mellitus, tamaño tumoral, expresión del marcador molecular p27, y la demora quirúrgica), todas ya han sido consideradas por su influencia en la supervivencia de CBNM (ver previamente). La única variable no comentada, e incluida en éste modelo, es la existencia de diabetes mellitus. De forma llamativa en éste modelo pronóstico, aquellos pacientes con diabetes mellitus presentan mejor supervivencia que aquellos que no la presentan. El peso de ésta variable en cuanto a la supervivencia asociada al CBNM es controvertida, y su relevancia de forma individual se ha contemplado en escasas series. Así en trabajos con escaso número de efectivos (<100), se ha reportado la existencia de éste factor clínico como negativo en la supervivencia a cinco años²⁴⁶, en otros aparece o asociado a un incremento de las recidivas pero sin impacto en la supervivencia²⁴⁷, o integrado en diversos índices conjuntos de comorbilidades dónde el peso real de la misma queda oscurecido²⁴⁸. Por el contrario en otros estudios la diabetes mellitus está asociada a mejor supervivencia en cáncer de pulmón²⁴⁹, así en este estudio en una cohorte de pacientes en tratamiento quimioterápico, la supervivencia a 3 años era significativamente mejor en el grupo de pacientes con diabetes. Éste fenómeno podría explicarse, no por la diabetes, sino por el efecto de la metformina en la supervivencia del cáncer. Así diversos trabajos^{250, 251} recientemente publicados indican, que la supervivencia en pacientes con diabetes, cáncer de pulmón y tratamiento con metformina presentan mejor supervivencia que aquellos tratados con sulfonilureas e insulina. La causa de estos hallazgos epidemiológicos, podrían estar en relación, a que el tratamiento con metformina podría incrementar la apoptosis celular e inhibir el

crecimiento celular. Hecho revelado experimentalmente en células humanas tumorales de pulmón, con una inhibición del crecimiento celular, tiempo y dosis dependiente²⁵².

Éste modelo pronóstico multivariante y multidimensional es negativo y positivo a la vez. Es negativo por la relativamente escasa capacidad discriminativa del modelo C-index (0,72), y es positivo porque demuestra que todas las variables implicadas ya sean clínicas, anatómicas, o moleculares, tienen importancia pronóstica, sumando información a la hora de determinar el pronóstico en el CBNM.

Este estudio tiene algunas limitaciones que se discuten a continuación: el principal desenlace de la evolución, la supervivencia global, incluye la muerte por cualquier causa, lo cual puede minusvalorar los factores moleculares asociados al CBNM u otros dependientes exclusivamente del tumor.

La selección de la muestra establece una población diana definida: pacientes con carcinoma broncogénico con resección completa. Esta población supone un 20% del total de pacientes con CBNM, pues los restantes tienen un estadio extendido no susceptible de tratamiento quirúrgico. Por tanto, los estimadores pronósticos obtenidos en este estudio serían aplicables exclusivamente a pacientes con carcinoma broncogénico reseccionado.

El elevado porcentaje de varones, podría suponer otra limitación, y aunque en España ya se observa un aumento de incidencia de CB entre mujeres, aún no alcanzamos las proporciones de Norteamérica u otras localizaciones. Éste mismo efecto geográfico afecta al tipo histológico más frecuente, pues el tumor epidermoide es claramente más frecuente que el adenocarcinoma.

Otra limitación relevante, es que no se ha determinado la reproductibilidad del modelo en una muestra independiente. Se ha realizado un proceso de validación interna con la técnica de muestreo “bootstrap”, que permite corregir el sobre-optimismo del modelo. El C-index menos optimista obtenido, 0,65, está en el rango de lo publicado.

El tamaño muestral (n=134), supone una limitación cuando la muestra se subdivide en subgrupos.

Entre las fortalezas de éste estudio destacar, diversos elementos:

- Existe una recogida concurrente y prospectiva de la información.
- La definición de las variables es precisa y concreta, tanto las variables clínicas, anatómicas como las moleculares.
- Los criterios diagnósticos y de estadificación están basados en algoritmos fundamentados en la evidencia científica, y dado el corto

periodo de reclutamiento, estos criterios apenas varían a lo largo del periodo de estudio.

- Los estadios de extensión tienen máxima certeza clasificatoria, utilizando la estadificación quirúrgico patológica (son todos estadios I-IIp), y con una adecuada estadificación quirúrgico-patológica de la extensión ganglionar mediastínica. La población es homogénea, facilitando su potencial reproductibilidad en otras poblaciones y también son homogéneos los criterios de operabilidad y reseccabilidad en la indicación quirúrgica, y en la clasificación de la cirugía (completa, incompleta).

G) CONCLUSIONES.

1. CONCLUSIONES GENERALES:

Este estudio sobre pronóstico de supervivencia se ha efectuado con una población de Carcinoma Broncogénico no microcítico (CBNM) en estadios patológicos iniciales (I-IIp) con resección completa, recogidos prospectivamente y seguidos durante más de 10 años.

Las conclusiones son:

1- El 90% de los pacientes son varones, siendo fumadores activos en el momento del diagnóstico el 48% de ellos; un 60% padecen otras comorbilidades siendo el 30%, la EPOC. La edad media es de 67 años.

2- La mayoría (82%) de los pacientes con carcinoma broncogénico no microcítico incluidos están en el estadio Ip, con sólo un 18% de N1p, son de estirpe escamosa (66%) y con poca o moderada diferenciación celular (77%).

3- Los estudios inmunohistoquímicos de las matrices de tejidos de los 32 marcadores moleculares fueron considerados como valorables en la mayoría de ellos. Salvo en dos marcadores (NF-KB-N, COX-2), en el resto fueron valorables en más del 90% de los casos.

4- El estudio de los diferentes factores de activación mitocondrial fueron considerados como valorables en la mayoría de ellos. Salvo en un marcador (GADPH), en el resto fueron valorables en más del 85% de los casos.

5- En el Grupo de variables relacionadas con la extensión anatómica del tumor y la estirpe (Grupo A), las variables seleccionadas con valor pronóstico ($p < 0,3$) son: factor T, tamaño tumoral, afectación pleura visceral, estadio clínico, factor Nq, histología y diferenciación celular.

6- En el Grupo de variables clínicas (Grupo B), las variables seleccionadas con valor pronóstico ($p < 0,3$) son: la demora diagnóstico – terapéutica, hipertensión arterial, EPOC, comorbilidad, edad, presencia de tumor previo, diabetes y el sexo.

7- En el Grupo de variables analíticas (Grupo C), las variables seleccionadas con valor pronóstico ($p < 0,3$) son: leucocitosis, nivel de albúmina y de hemoglobina.

8- En el Grupo de marcadores moleculares (Grupo D), las variables seleccionadas con valor pronóstico ($p < 0,3$) son: p16, Rb, Cdk2, p27, Ki67, Caspasa 3, Fas, mTORp y Ps6

9- En el Grupo de factores de actividad mitocondrial (Grupo E), las variables seleccionadas con valor pronóstico ($p < 0,3$) es β -F1-ATPasa.

10- En el análisis multivariante por partición recursiva de cada Grupo de variables de forma separada se obtuvieron las siguientes áreas bajo la curva ROC (C-índice): 0,68 Grupo B (variables clínicas), 0,66 Grupo D (marcadores moleculares), 0,60 Grupo C (variables analíticas), 0,58 Grupo A (variables TNM) y 0,57 Grupo E (variables relacionadas con la actividad mitocondrial).

11- El Modelo Multidimensional obtenido con el análisis multivariante por partición recursiva utilizando todas las variables de todos los grupos mejora el C-índice (0,72; IC 95% 0,64-0,81) de forma significativa (desde $p=0.005$ a $p=0.05$) al ser comparado con cada Grupo de variables consideradas separadamente. El espectro de probabilidad de supervivencia a 5 años también aumenta con el modelo conjunto; entre 0,25 y 0,72; una diferencia entre extremos del 47%.

12- Las variables con mayor discriminación pronóstica son la existencia de diabetes mellitus, el tamaño tumoral, la expresión molecular del marcador del ciclo celular p27 y la demora temporal diagnóstico – terapéutica.

2. CONCLUSIONES ESPECÍFICAS POR HIPÓTESIS

-En esta serie de pacientes con estadios iniciales de CBNM resecado los casos con mayor intensidad de expresión de la proteína mitocondrial β -F1-ATPasa tienen mayor supervivencia aunque no alcanzaron el nivel prefijado de significación ($p = 0,14$).

- Éste estudio demuestra que en pacientes con carcinoma broncogénico no microcítico en estadios iniciales, la integración de factores anatómicos, clínicos y moleculares en un modelo conjunto pronóstico multidimensional discrimina el pronóstico más eficazmente que el uso exclusivo de la clasificación TNM.

H) TABLAS:

Tabla I

Clasificación de Adenocarcinoma 2011

International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society

Lesiones preinvasivas.

Hiperplasia adenomatosa atípica.

Adenocarcinoma in situ (<3 cm, anteriormente carcinoma bronquioloalveolar CBA solitario).

No mucinoso

Mucinoso

Mixto mucinoso/no mucinoso

Adenocarcinoma mínimamente invasivo(<3 cm, tumor predominantemente lepidicocon<5 mm de invasión)

No mucinoso

Mucinoso

Mixto mucinoso/no mucinoso

Adenocarcinoma invasivo

Predominantemente lepidico (anteriormente CBA de patrón no mucinoso con >5 mmde invasión)

Predominantemente panacinar

Predominantemente papilar

Predominantementemicropapilar

Predominantemente sólido

Variantes de adenocarcinoma invasivo

Adenocarcinoma mucinoso invasivo (incluye al anterior CBA mucinoso)

Coloide

Tabla II

Estadificación 2010 TNM-estadios Carcinoma Broncogénico IASLC – UICC – AJCC

Descriptores T, N y M

T (Tumor Primario)

- TX Tumor primario que no puede ser evaluado, o tumor probado por la presencia de células malignas en el esputo o en el aspirado bronquial pero no visible por imagen o por broncoscopia.
- T0 No evidencia de tumor primario
- Tis Carcinoma *in situ*
- T1 Tumor < 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (p.ej.: no en el bronquio principal)
 - T1a Tumor < 2 cm en su diámetro mayor [a]
 - T1b Tumor >2 cm pero < 3 cm en su diámetro mayor
- T2 Tumor >3 cm pero < 7 cm o tumor con cualquiera de las siguientes características [b]:
 - Afectación del bronquio principal > 2 cm distal a la carina
 - Invasión de la pleura visceral
 - Asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la zona hilar pero no afecta al pulmón entero
 - T2a Tumor > 3 cm pero < 5 cm en su diámetro mayor
 - T2b Tumor > 5 cm pero < 7 cm en su diámetro mayor
- T3 Tumor > 7 cm o que invade directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo tumor del *sulcus* superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal o tumor en el bronquio principal < 2 cm distal a la carina [a] pero sin afectación de la carina, o atelectasia o neumonitis obstructiva asociada del pulmón entero o un nódulo/s tumoral/es separado/s en el mismo lóbulo que el primario
- T4 Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de lo siguiente: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina o presencia de un nódulo/s tumoral/es separado/s en un lóbulo diferente homolateral

Tabla II (continuación)

Estadificación 2010 TNM-estadios Carcinoma Broncogénico

IASLC – UICC – AJCC

N (Adenopatías Regionales)

- NX No puede evaluarse
- N0 Ausencia de metástasis ganglionares regionales
- N1 Metástasis en ganglios homolaterales intrapulmonares, peribronquiales y/o hiliares, incluyendo afectación por extensión directa
- N2 Metástasis en ganglios mediastínicos homolaterales y/o subcarínicos
- N3 Metástasis en ganglios hiliares o mediastínicos contralaterales, o escalénicas homo- o contralaterales o supraclaviculares homo- o contralaterales

M (Metástasis)

- M0 No metástasis a distancia
- M1 Metástasis a distancia
- M1a Nódulo/s tumoral/es contralateral/es o tumor con nódulos pleurales o derrame pleural o pericárdico maligno [c]
- M1b Metástasis a distancia

[a] El infrecuente tumor con extensión superficial de cualquier tamaño con el componente invasivo limitado a la pared bronquial, que se puede extender proximalmente al bronquio principal, también se clasifica como T1.

[b] Los tumores T2 con estas características se clasifican T2a si el tamaño tumoral es <5 cm o si no puede ser calculado, y como T2b si son >5 cm pero < 7 cm

[c] La mayoría de los derrames pleurales o pericárdicos asociados con el cáncer de pulmón se deben al tumor. Sin embargo, hay algunos pacientes en quienes múltiples estudios citopatológicos del líquido pleural o pericárdico son negativos para tumor y el líquido no es hemático y no es un exudado. Cuando estos elementos y el juicio clínico indican que el derrame no se relaciona con el tumor, se debería excluir el derrame como elemento de clasificación, y el paciente debería ser considerado como M0.

Tabla III

Estadificación 2010 TNM
Estadios Carcinoma Broncogénico
IASLC – UICC – AJCC

Estadios TNM	
Carcinoma oculto	TX N0 M0
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio IA	T1a, b N0 M0
Estadio IB	T2a N0 M0
Estadio IIA	T1a, b N1 M0 T2a N1 M0 T2b N0 M0
Estadio IIB	T2b N1 M0 T3 N0 M0
Estadio IIIA	T1, T2 N2 M0 T3 N1, N2 M0 T4 N0, N1 M0
Estadio IIIB	T4 N2 M0 Cualquier T N3 M0
Estadio IV	Cualquier T Cualquier N M1a, b

Tabla IV

TNM-Estadios 2010 IASLC – UICC – AJCC

Comparación con la estadificación TNM 1997 UICC – AJCC

No se modifica la clasificación ganglionar (N)

Descriptor T-M UICC-1997	Propuesta ISC-IASLC Apartados T-M	N0	N1	N2	N3
T1 (<=2 cm)	T1a	IA	IIA	IIIA	IIIB
T1 (<2-3 cm)	T1b	IA	IIA	IIIA	IIIB
T2 (<=5 cm)	T2a	IB	IIA	IIIA	IIIB
T2 (>5-7 cm)	T2b	IIA	IIIB	IIIA	IIIB
T2 (>7 cm)	T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T3 (invasión)	T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (nódulo ipsilobar)	T3	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB
T4 (extensión)	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
M1 (pulmón ipsilateral)	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
T4 (derrame pleural)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (pulmón contralateral)	M1a	IV	IV	IV	IV
M1 (distancia)	M1b	IV	IV	IV	IV

Modificado de Goldstraw P. J Thorac Oncol; 2007; 2 (supp 4): 142s-143s

Tabla V

Marcadores moleculares y via bioquímica

1	CICLO CELULAR	<i>ciclina A</i>
		<i>ciclina B1</i>
		<i>ciclina D1</i>
		<i>ciclina E</i>
		<i>CDK2</i>
		<i>CDK6</i>
		<i>p16</i>
		<i>p21</i>
		<i>p27</i>
		<i>RB</i>
		<i>Ki-67</i>
		<i>Cdc6</i>
2	VÍA DEL p53	<i>p53</i>
		<i>MDM2</i>
3	APOPTOSIS	<i>BCL-2</i>
		<i>caspara-3</i>
		<i>survivina</i>
		<i>NF-KBc (p65)</i>
		<i>FAS (CD95)</i>
4	MOLECULAS ADHESION	<i>Beta-catenina N / Mb</i>
		<i>E-cadherina</i>
5	RECEPTORES/ TRANSDUCCION SEÑALES	<i>AKTp</i>
		<i>mTORp</i>
		<i>EGFR</i>
		<i>c-erbB2/Neu / Herceptest</i>
		<i>p-Acetyl-CoA Carboxylase (ACC)</i>
		<i>PS6</i>
		<i>LKB1</i>
6	OTROS	<i>COX-2</i>
		<i>TTF-1</i>
		<i>p63</i>
		<i>alpha-CP4</i>

Tabla VI

Expresión de marcadores moleculares según histología

Histología	Marcador
1) Microcítico	
	BCL-2
	RB ⁴²
	PTEN
	E Cadherina ^{69,70}
2) No microcítico	
Adenocarcinoma	KRAS ^{44,45}
	c-erbB2
	FAS ⁶⁷
	B-catenina
	NFKβ c
	LKB1
	TTF-1
Epidermoide	AKTp
	p16
	CDK2
	CDK6
	Ciclina A
	Ciclina B1
	Ciclina D1 ^{64,79}
	Ciclina E ⁶⁴
	p63
	Survivina N
	EGFR

Tabla VII

Dirección pronóstica de marcadores moleculares en CBNM

Vía Bioquímica (tabla V)	Marcador	Significado pronóstico
1	Ciclina A	Peor pronóstico ^{76,}
1	Ciclina B1	Peor pronóstico ^{77,78}
1	Ciclina D1	Peor pronóstico ^{80,81,82}
1	Ciclina E	Peor pronóstico ^{83,84,85}
1	CDK2	Peor pronóstico ⁸⁶
1	CDK6	Peor pronóstico ⁸⁶
1	p16	Mejor pronóstico ⁸⁷
1	p21	Mejor pronóstico ^{88,89}
1	p27	Datos contradictorios ^{90,91,93}
1	RB	Mejor pronóstico ^{92,93}
1	Ki67	Peor pronóstico ^{93,94}
1	CDC6	No hay datos suficientes
2	p53	Peor pronóstico ^{95,96,97}
2	MDM2	Peor pronóstico ^{99,100}
3	BCL-2	Datos contradictorios ^{101,102}
3	Caspasa 3	Mejor pronóstico ¹⁰³
3	Survivina N	Peor pronóstico ¹⁰⁴
3	NFKβ	No hay datos suficientes
3	FAS	Mejor pronóstico ¹⁰⁵
4	B-catenina N	Mejor pronóstico ¹⁰⁶
4	E-cadherina	Mejor pronóstico ^{107,108}
5	AKTp	Mejor pronóstico ¹⁰⁹
5	mTORp	Datos contradictorios ^{110,111}
5	EGFR	Peor pronóstico ^{112,113}
5	c-erbB2 o Herceptest	Peor pronóstico ^{115,117}
5	ACC	No hay datos suficientes
5	PS6	No hay datos suficientes

Tabla VII (continuación)

Dirección pronóstica de marcadores moleculares en CBNM

5	LKB1	No hay datos suficientes
6	<i>COX- 2</i>	Peor pronóstico ¹¹⁸
6	<i>TTF-1</i>	Mejor pronóstico ¹¹⁹
6	<i>P63</i>	Mejor pronóstico ¹²⁰
6	γ CP4	No hay datos suficientes

Tabla VIII**Análisis descriptivo de variables TNMp y otras variables relacionadas con el tumor**

VARIABLE		n (%)
Estadio TNM	Ia	25 (18,6)
	Ib	87 (64,9)
	IIa	5 (3,7)
	IIb	17 (12,6)
Factor T	T1p	30 (22,3)
	T2p	104 (77,6)
Histología	Escamoso	90 (67,1)
	Adenocarcinoma	30 (22,3)
	Células grandes	10(7,4)
	Pleomórfico	4 (2,9)
Tamaño tumoral	0-2 cm	11 (8,2)
	2-3 cm	31(23,1)
	3-5 cm	53(39,5)
	5-7 cm	25(18,6)
	> 7 cm	14 (10,4)
Tamaño tumoral agrupado	0-3 cm	42(31,3)
	3-5 cm	53 (39,5)
	> 5 cm	39 (29,2)

Tabla VIII (continuación)**Análisis descriptivo de variables TNMp y otras variables relacionadas con el tumor**

VARIABLE		n (%)
Diferenciación celular	Poca y moderada diferenciación celular	105 (78,3)
	Gran diferenciación celular	29(21,6)
Afectación de pleura visceral	Ausente	101 (75,4)
	Presente	33 (24,6)
Clasificación Nq	N0p	112 (83,5)
	N1p	22 (16,5)
Afectación de vena pulmonar (extrapericárdica)	Ausente	128 (95,5)
	Presente	6 (4,5)
Derrame pleural (no tumoral)	Ausente	132 (98,5)
	Presente	2 (1,5)
Derrame pericárdico (no tumoral)	Ausente	133 (99,2)
	Presente	1 (0,8)

Tabla VIII (continuación)

Análisis descriptivo de variables TNMp y otras variables relacionadas con el tumor

VARIABLE		n (%)
Atelectasia/neumonitis obstructiva parcial	Ausente	106 (79,1)
	Presente	27 (20,1)
	Perdidos	1 (0,8)
Arteria pulmonar (extrapericárdica)	Ausente	131 (97,7)
	Presente	3(2,3)

Tabla IX**Análisis descriptivo de variables clínicas y analíticas del paciente**

Variable		n (%)
Sexo	Varón	123 (91, 8)
	Mujer	11 (8,2)
Diabetes	Ausente	120 (89,5)
	Presente	14 (10,5)
Comorbilidad	Ausente	55 (41)
	Presente	79 (59)
Morbilidad postoperatoria	Ausente	79 (59)
	Presente	55 (41)
Tumor previo	Ausente	108 (80,6)
	Presente	26 (19,4)
Fumador activo	Ausente	68 (50,7)
	Presente	66 (49,3)
Enfermedad coronaria	Ausente	121 (90,3)
	Presente	13 (9,7)
Enfermedad vascular	Ausente	116 (86,6)
	Presente	18 (13,4)
Hipertensión arterial sistémica	Ausente	99 (73,8)
	Presente	35 (26,2)
Síndrome constitucional	Ausente	36 (26,9)
	Presente	96 (71,6%)
	Perdidos	2 (1,5)

Tabla IX (continuación)

Análisis descriptivo de variables clínicas y analíticas del paciente.

Variable		n (%)
EPOC	Ausente	93(69,4)
	Presente	41(30,6)
Estado clínico ECOG	Bajo	29 (21,7)
	Alto	103 (76,8)
	Perdidos	2 (1,5)
Hallazgo casual	Ausente	85(63,4)
	Presente	47 (35)
	Perdidos	2 (1,5)

VARIABLE	validos	perdidos	media	mediana	DS	mínimo	máximo	k-s
Edad	134		66,76	67	7,99	40	84	0,24
Índice de masa corporal	134		25,8	25,57	3,75	16,43	36,43	0,12
Hemoglobina g/dl	133	1	14,2	14,3	1,91	9	18,8	0,35
Leucocitos/ mm³	134		8,84	8,25	2,85	4,20	20,5	0,03
Polimorfonucleares %	134		64,5	64,35	9,89	40,5	87	0,99
Albumina g/dl	122	12	4,19	4,2	0,51	2,76	5,12	0,71
Índice acumulado de paquetes / año	134		56,18	50	35,58	0	165	0,21
Demora quirúrgica	121	13	57,68	49	39,04	10	251	0,001

DS: Desviación estándar

k-s: Test de Kolmogorov-Smirnoff

Las variables cuantitativas se expresan en forma de media \pm desviación estándar (DS) o mediana y rango intercuartil en función de la distribución normal o no de la variable estudiada

Tabla X

Análisis descriptivo de marcadores moleculares

MARCADOR	AUSENTE n (%)	PRESENTE n (%)	NV n (%)	PERDIDOS n (%)
Ciclina A	32 (23,8)	102 (76,2)		0
Ciclina B1	106 (79,2)	26 (19,3)	2(1,5)	0
Ciclina D1	75 (55,1)	55 (40,4)	4 (2,9)	0
Ciclina E	78 (57,4)	54(39,7)	2(1,5)	0
CDK2	48 (35,3)	84(61,8)	2(1,5)	0
CDK6	82(60,3)	48 (35,3)	4(2,9)	0
p16b	117(86)	16 (11,8)	1(0,7)	0
p21	83(61)	49(36)	2(1,5)	0
p27	84(61,8)	44(34,2)	6(4,4)	0
Rb	34(25)	98(72,1)	2(1,5)	0
Ki67	57(41,9)	77(56,6)		0
p53	62(45,6)	70(51,5)	2(1,5)	0
MDM2	120 (88,2)	11(8,1)	3(2,2)	0
Bcl-2	113 (83,1)	19(14)	2(1,5)	0
Caspasa 3	94(69,1)	35(25,7)	5(3,7)	0
Survivina C	106(77,9)	6(4,4)	7(5,1)	15 (12,5)
Survivina N	92 (67,6)	39(28,7)	3(2,2)	0
NFKβ-C	51 (37,5)	77(56,6)	6(4,4)	0
NFKβ-N	44(32,4)	66(48,5)	10(7,4)	16(11,8)
E-CADHERINA	102(75)	30(22,1)	2(1,5)	0
B-CATENINA-N	125(91,9)	8(5,9)		1 (2,2)
B-CATENINA-MB	107(78,7)	25(18,4)	1(0,7)	1 (2,2)
AKTp	115(84,6)	18(13,2)	1(0,7)	0
mTORp	64(47,1)	66(48,5)	4(2,9)	0
EGFR	90(66,2)	40(29,4)	4(2,9)	0
COX-2	6(4,4)	113(83,1)	15(11)	0
TTF1	115(84,6)	18(13,2)	1(0,7)	0
p63	78(57,4)	51(37,5)	5(3,7)	0
Cdc6C	79(58,1)	47(34,6)	8(5,9)	0
ACC	101(74,3)	31(22,8)	2(1,5)	0

Tabla X (continuación)

Análisis descriptivo de marcadores moleculares

LKB1	20(14,7)	104(76,5)	10 (7,4)	0
PS6	83(61)	43(31,6)	8(5,9)	0
γCP4	98(72,1)	35(25,7)	1(0,7)	0

NV: No valorable

Tabla XI**Análisis descriptivo de marcadores de actividad mitocondrial**

MARCADOR	Intensidad de expresión leve y moderada n (%)	Intensidad de expresión fuerte n (%)	nv n (%)	Perdidos n (%)
β-F1-ATPasa i	56 (41,2)	74 (54,4)		6 (4,4)
Hsp60 i	58(42)	67(50)	11(8)	
GADPH i	87(63,9)	30 (22,1)	19(14)	
PK i	65(47)	63(46)	8(7)	
	<que la mediana n (%)	≥ que la mediana n (%)	NV n (%)	perdidos n (%)
β-F1-ATPasaX	65(47,8)	64(47,1)		7(5,1)
ICBB	56(41,2)	56(41,2)		24(17,6)
Índice BEC	63(46,3)	64(47,1)		9(6,6)

Las variables cuantitativas se expresan en forma de media ± desviación estándar (DS) o mediana y rango intercuartil en función de la distribución normal o no de la variable estudiada.

Tabla XII

**Análisis pronóstico univariante
Variables TNM**

VARIABLE	Resultado	n	S5	Wilcoxon	Log rank
Estadio TNM	IA	25	0,60	0,077	0,107
	IB	87	0,47		
	IIA+IIB	22	0,36		
Factor T	T1p	30	0,6	0,018	0,046
	T2p	104	0,44		
Histología	Escamoso	90	0,54	0,13	0,166
	Adenocarcinoma o células grandes	40	0,33		
Tamaño tumoral	0-3 cm	42	0,62	0,01	0,04
	3-5 cm	53	0,43		
	> 5 cm	39	0,38		
Diferenciación celular	Menor y moderada	105	0,45	0,06	0,17
	Mayor	29	0,59		
Afectación de pleura visceral	Ausente	101	0,52	0,009	0,02
	Presente	33	0,33		
Clasificación Nq	N0	112	0,50	0,26	0,19
	N1	22	0,33		

Tabla XII (continuación)

Análisis pronóstico univariante
Variables TNM

VARIABLE	Resultado	n	S5	Wilcoxon	Log rank
Atelectasia/neumonitis obstructiva parcial	1	106	0,45	0,39	0,59
	3	27	0,46		

S5: Probabilidad de supervivencia a los 5 años

Tabla XIII

Análisis pronóstico univariante

Variables clínicas y analíticas

VARIABLE	Resultado	n°	S5	Wilcoxon	Log rank
Comorbilidad	Ausente	55	0,51	0,17	0,18
	Presente	79	0,46		
Demora quirúrgica	< mediana	59	0,58	0,002	0,003
	>/= mediana	62	0,39		
Morbilidad postoperatoria	Ausente	79	0,44	0,61	0,99
	Presente	55	0,53		
Índice masa corporal	< mediana	67	0,51	0,49	0,35
	>/= mediana	67	0,45		
Edad	< mediana	59	0,51	0,34	0,29
	>/= mediana	75	0,45		
Tumor previo	Ausente	108	0,51	0,083	0,104
	Presente	26	0,34		
Fumador	Ausente	68	0,51	0,77	0,74
	Presente	66	0,44		
Enfermedad coronaria	Ausente	121	0,46	0,27	0,33
	Presente	13	0,62		
Enfermedad vascular periférica	Ausente	116	0,47	0,55	0,87
	Presente	18	0,56		
Hipertensión arterial sistémica	Ausente	99	0,53	0,07	0,007
	Presente	35	0,34		
Síndrome constitucional	Ausente	36	0,47	0,82	0,84
	Presente	96	0,48		
Sexo	Varon	123	0,50	0,42	0,25
	Mujer	11	0,27		

Tabla XIII (continuación)**Análisis pronóstico univariante****Variables clínicas y analíticas**

EPOC	Ausente	93	0,53	0,048	0,021
	Presente	41	0,37		
Diabetes Mellitus	Ausente	120	0,45	0,14	0,101
	Presente	14	0,71		
Estado clínico ECOG	Bajo	29	0,45	0,78	0,92
	Alto	103	0,50		
Hallazgo casual	Ausente	85	0,52	0,55	0,42
	Presente	47	0,40		
Hemoglobina	< mediana	61	0,46	0,18	0,29
	>/= mediana	72	0,49		
Leucocitos	< mediana	67	0,58	0,008	0,029
	>/= mediana	67	0,37		
Polimorfonucleares	< mediana	67	0,51	0,706	0,8
	>/= mediana	67	0,45		
Albúmina	< mediana	59	0,39	0,042	0,042
	>/= mediana	63	0,56		
Índice acumulado paquetes / año	< mediana	65	0,48	0,78	0,88
	>/= mediana	69	0,48		
Grado disnea	Bajo	83	0,48	0,85	0,51
	Alto	49	0,47		

S5: Probabilidad de supervivencia a los 5 años

Tabla XIV**Análisis pronóstico univariante****Marcadores moleculares**

VARIABLE	Resultado	n	S5	Wilcoxon	Log rank
CiclinaA	negativo	32	0,44	0,55	0,65
	positivo	102	0,49		
CiclinaB1	negativo	106	0,48	0,99	0,89
	positivo	26	0,50		
CiclinaD1	negativo	75	0,45	0,24	0,405
	positivo	55	0,53		
Ciclina E	negativo	78	0,47	0,99	0,99
	positivo	54	0,50		
Cdk2	negativo	48	0,50	0,24	0,29
	positivo	84	0,46		
Cdk6	negativo	82	0,49	0,83	0,46
	positivo	48	0,46		
p16B	negativo	117	0,50	0,011	0,017
	positivo	16	0,25		
p21	negativo	83	0,48	0,81	0,68
	positivo	49	0,49		
p27	negativo	84	0,54	0,082	0,054
	positivo	44	0,34		
RB	negativo	34	0,32	0,026	0,048
	positivo	98	0,54		
Ki67	negativo	57	0,56	0,064	0,15
	positivo	77	0,42		
p53	negativo	62	0,40	0,45	0,35
	positivo	70	0,54		
Mdm2	negativo	120	0,49	0,95	0,66
	positivo	11	0,36		
Bcl2	negativo	113	0,50	0,18	0,41
	positivo	19	0,42		

Tabla XIV (Continuación)**Análisis pronóstico univariante****Marcadores moleculares**

Caspasa_3	negativo	94	0,45	0,11	0,19
	positivo	35	0,60		
Survivina_c	negativo	106	0,49	0,46	0,79
	positivo	6	0,50		
Survivina_n	negativo	92	0,50	0,23	0,38
	positivo	39	0,44		
NFK β _c	negativo	51	0,51	0,48	0,59
	positivo	77	0,48		
NFK β _n	negativo	44	0,50	0,36	0,52
	positivo	66	0,45		
Fas	negativo	118	0,47	0,06	0,061
	positivo	10	0,70		
B_catenina_n	negativo	125	0,49	0,32	0,32
	positivo	8	0,38		
E_cadherina	negativo	102	0,47	0,95	0,78
	positivo	30	0,53		
Aktp	negativo	115	0,49	0,71	0,51
	positivo	18	0,44		
mTORp	negativo	64	0,41	0,074	0,194
	positivo	66	0,56		
EFGR	negativo	90	0,48	0,67	0,60
	positivo	40	0,48		
COX-2	negativo	6	0,50	0,78	0,81
	positivo	113	0,47		

Tabla XIV (Continuación)
Análisis pronóstico univariante
Marcadores moleculares

Cdc6c	negativo	79	0,48	0,39	0,38
	positivo	47	0,47		
Ps6	negativo	83	0,45	0,17	0,1
	positivo	43	0,56		
Lkb1	negativo	20	0,40	0,94	0,89
	positivo	104	0,48		
Ttf1	negativo	115	0,49	0,30	0,35
	positivo	18	0,39		
P63	negativo	78	0,44	0,22	0,35
	positivo	51	0,55		
γCP4	negativo	98	0,48	0,94	0,98
	positivo	35	0,50		
herceptest	negativo	130	0,47	0,60	0,38
	positivo	2	0,50		

S5: Probabilidad de supervivencia a los 5 años

Tabla XV

**Análisis pronóstico univariante
Marcadores de actividad mitocondrial**

VARIABLE	Resultado	n	S5	Wilcoxon	Log rank
β-F1-ATPasa i	leve y moderada	56	0,36	0,07	0,14
	fuerte	72	0,53		
Hsp60 i	leve y moderada	58	0,41	0,81	0,99
	fuerte	67	0,48		
GADPH i	leve y moderada	87	0,47	0,37	0,55
	fuerte	30	0,50		
PK i	leve y moderada	65	0,51	0,94	0,91
	fuerte	63	0,54		
β-F1-ATPasaX	<que la mediana	65	0,39	0,64	0,39
	≥ que la mediana	64	0,51		
Hsp60X	<que la mediana	57	0,47	0,91	0,87
	≥ que la mediana	69	0,43		
GADPHX	<que la mediana	64	0,50	0,91	0,89
	≥ que la mediana	64	0,47		
PKX	<que la mediana	49	0,43	0,5	0,41
	≥ que la mediana	81	0,51		
ICBB	<que la mediana	55	0,49	0,35	0,5
	≥ que la mediana	55	0,42		
Índice BEC	<que la mediana	61	0,41	0,74	0,73
	≥ que la mediana	64	0,48		

Tabla XVI**Variables seleccionadas ($p < 0,3$) para el estudio multivariante (partición recursiva)**

GRUPO A					
Variable	Resultado	n°	S5	Wilcoxon	Log rank
Factor T	T1p	30	0,60	0,018	0,046
	T2p	104	0,44		
Histología	Escamoso	90	0,54	0,13	0,166
	Adenocarcinoma o células grandes	40	0,33		
Tamaño tumoral	0-3cm	42	0,62	0,01	0,04
	3-5cm	53	0,43		
	> 5cm	39	0,38		
Diferenciación celular	Menor o moderada	105	0,45	0,06	0,17
	Mayor	29	0,59		
Afectación de pleura visceral	Ausente	101	0,52	0,009	0,02
	Presente	33	0,33		
Clasificación Nq	N0	112	0,50	0,26	0,19
	N1	22	0,33		
Estadio TNM	IA	25	0,60	0,077	0,107
	IB	87	0,47		
	IIA+IIB	22	0,36		

GRUPO B					
Comorbilidad	ausente	55	0,51	0,17	0,18
	presente	79	0,46		
Demora quirúrgica	< mediana	59	0,58	0,002	0,003
	>/= mediana	62	0,39		
Edad	< mediana	59	0,51	0,34	0,29
	>/= mediana	75	0,45		
Tumor previo	ausente	108	0,51	0,083	0,104
	presente	26	0,34		
HTA	ausente	99	0,53	0,07	0,007
	presente	35	0,34		
Sexo	varón	123	0,50	0,42	0,25
	mujer	11	0,27		
Epoc	ausente	93	0,53	0,048	0,021
	presente	41	0,37		
Diabetes	ausente	120	0,45	0,14	0,101
	presente	14	0,71		
GRUPO C					
Hemoglobina	< mediana	61	0,4	0,18	0,29
	>/= mediana	72	0,49		
Leucocitos	< mediana	67	0,58	0,008	0,029
	>/= mediana	67	0,37		
Albúmina	< mediana	59	0,39	0,042	0,042
	>/= mediana	63	0,56		
GRUPO D					
Cdk2	negativo	48	0,50	0,24	0,29
	positivo	84	0,46		
p16B	negativo	117	0,50	0,011	0,017
	positivo	16	0,25		
p27	negativo	84	0,54	0,082	0,054
	positivo	44	0,34		

RB	negativo	34	0,32	0,026	0,048
	positivo	98	0,54		
mTORp	negativo	64	0,41	0,074	0,194
	positivo	66	0,56		
Ki67	Negativo	57	0,56	0,064	0,15
	positivo	77	0,42		
Caspasa_3	negativo	94	0,45	0,11	0,19
	positivo	35	0,60		
FAS	negativo	118	0,47	0,06	0,061
	positivo	10	0,70		
Ps6	negativo	83	0,45	0,17	0,1
	positivo	43	0,56		
GRUPO E					
β-F1-ATPasa i	leve y moderada	56	0,36	0,07	0,14
	fuerte	72	0,53		

Tabla XVII

Selección de variables en el análisis multivariante, y el espectro de probabilidades de supervivencia a 5 años.

Grupo	Variables seleccionadas	Área bajo la curva C-index (IC 95%)	Supervivencia a 5 años, valores extremos
A	Afectación de pleura visceral, Tp, Nq, tamaño tumoral, diferenciación celular, histología, Estadio quirúrgico-patológico	0,58 (0,5-0,66)	0,41-0,62
B	Sexo, edad, demora, HTA, DM tipo 2, comorbilidad previa, EPOC, tumor previo,	0,68(0,58-0,77)	0,31-0,71
C	Leucocitos, hemoglobina, albúmina	0,60 (0,51-0,68)	0,37-0,58
D	CDK2, p16, p27, RB, ki67, caspasa-3, FAS, mTORp	0,66(0,56-0,75)	0,28-0,62
E	β -F1-ATPasa	0,57(0,48-0,65)	0,38-0,54

Tabla XVIII

Comparación de área bajo la curva ROC para cada grupo de variables en relación con el modelo pronóstico conjunto

Grupo	C-Index, área bajo la curva ROC	DS*	R^{2**}	Valor p***
A	0,58	0,042	0,048	0,005
B	0,68	0,049	0,14	0,32
C	0,60	0,044	0,05	0,05
D	0,66	0,049	0,12	0,077
E	0,57	0,044	0,03	0,01
Grupo conjunto	0,72	0,045	0,20	

* Desviación estándar

** R2 Nalgerkerke

*** Comparación del C-index del Modelo Muldidimensional con el de los grupos A, B, C, D, E

Tabla XIX

PERFIL PRONÓSTICO GENERAL DE LOS MM-MTe

VARIABLE	Wilcoxon- Gehan	Log rank	Significado	Coincidente con la literatura
CiclinaA	0,55	0,65	No significativo	
CiclinaB1	0,99	0,89	No significativo	
CiclinaD1	0,24	0,405	No significativo	
Ciclina E	0,99	0,99	No significativo	
Cdk2	0,24	0,29	No significativo	
Cdk6	0,83	0,46	No significativo	
p16B	0,011	0,017	Negativo	No
p21	0,81	0,68	No significativo	
p27	0,082	0,054	Negativo	*
RB	0.026	0.048	Positivo	Si
Ki67	0.064	0.15	Negativo	Sí
p53	0.45	0.35	No significativo	
Mdm2	0.95	0.66	No significativo	
Bcl2	0.18	0.41	Negativo	*
Caspasa_3	0.11	0.19	Positivo	Sí
Survivin_c	0.46	0.79	No significativo	
Survivin_n	0.23	0.38	No significativo	
NFKβ_c	0.48	0.59	No significativo	
NFKβ_n	0.36	0.52	No significativo	
FAS	0.06	0.061	Negativo	No
B_catenina_n	0.32	0.32	No significativo	
E_cadherina	0.95	0.78	No significativo	
Aktp	0.71	0.51	No significativo	
mTORp	0.074	0.194	Positivo	*
EFGR	0.67	0.60	No significativo	

Tabla XIX(continuación)

PERFIL PRONÓSTICO GENERAL DE LOS MM-MTe

COX-2			No significativo	
herceptest	0.60	0.38	No significativo	
Cdc6c	0.39	0.38	No significativo	
Ps6	0.17	0.1	Positivo	*
Lkb1	0.94	0.89	No significativo	
Ttf1	0.30	0.35	No significativo	
P63	0.22	0.35	No significativo	
γ CP4	0.94	0.98	No significativo	

- **Significado pronóstico positivo:** Cuando existe más supervivencia en el grupo de mayor expresión del marcador.
- **Significado negativo:** Cuando existe menos supervivencia en el grupo de mayor expresión del marcador
- *Datos contradictorios

Tabla XX:

Validación interna del modelo final:

n=134	Rendimiento aparente	Rendimiento Bootstrap	Rendimiento del test (1)	Optimismo esperado (2)	Rendimiento corregido por el optimismo (3)
ROC area	0.7262	0.7039 (0.042)	0.6298 (0.032)	0.0741 (0.032)	0.6521
R ²	20.30%	20.41% (7.12%)	5.63% (3.90%)	14.77% (7.29%)	5.53%

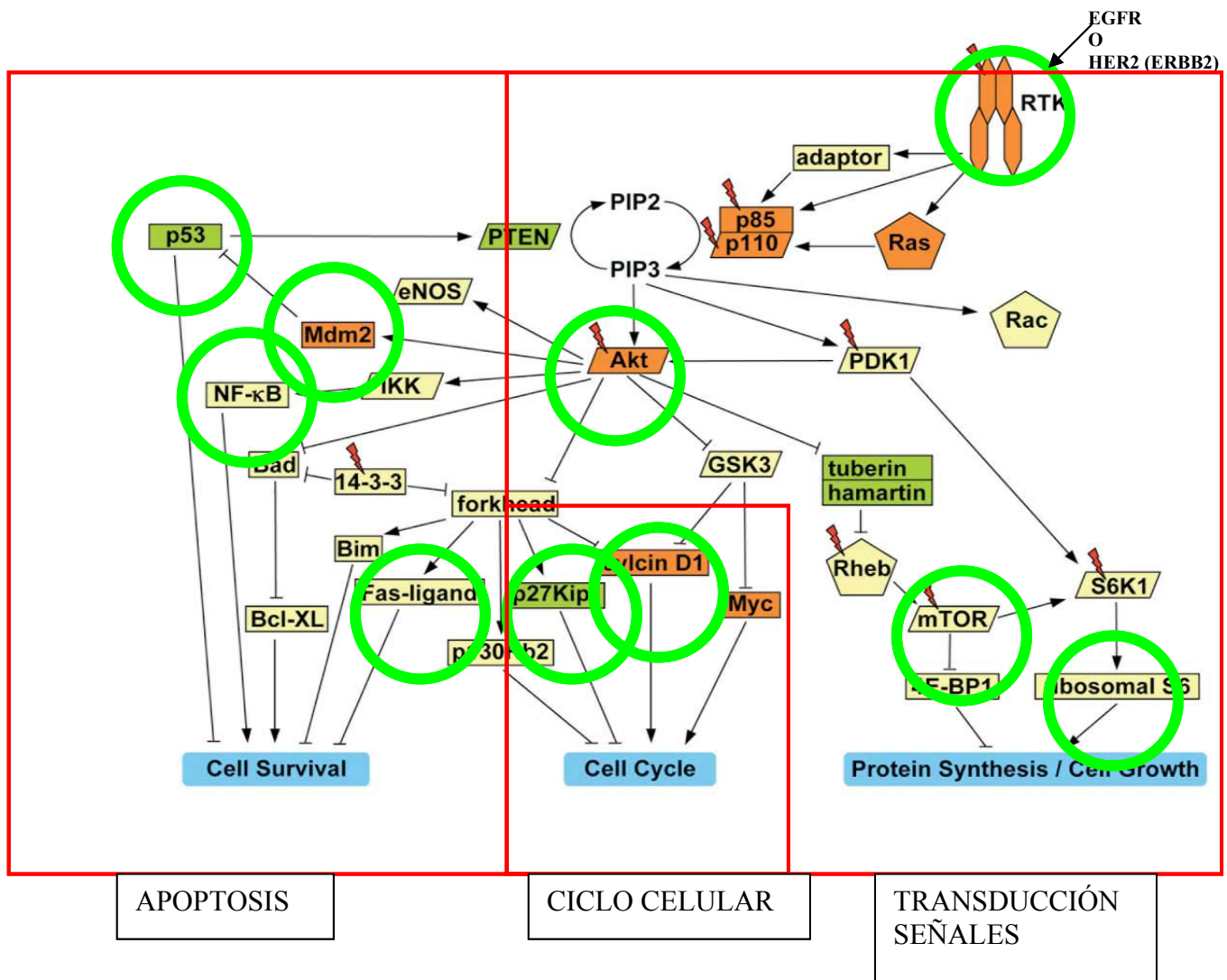
Resultados del muestreo Bootstrap para toda la serie de datos (n=134). En la tabla se refleja la media y desviación standard, calculadas mediante la realización de mil repeticiones “bootstrap”.

- 1- El rendimiento del test se definió como el rendimiento de los modelos del bootstrap cuando se aplicaban a la población original.
- 2- El optimismo esperado fue calculado como la diferencia entre el rendimiento del bootstrap y el rendimiento del test.
- 3- El método bootstrap permite obtener el rendimiento corregido por el optimismo, que se calcula restando el optimismo esperado del rendimiento aparente.

FIGURAS:

Figura 1

Expresión gráfica de las vías moleculares de acción en cáncer



* En círculos se expresan alguno de los marcadores moleculares incluidos en el estudio.

Figura 2

Marcadores moleculares del ciclo celular

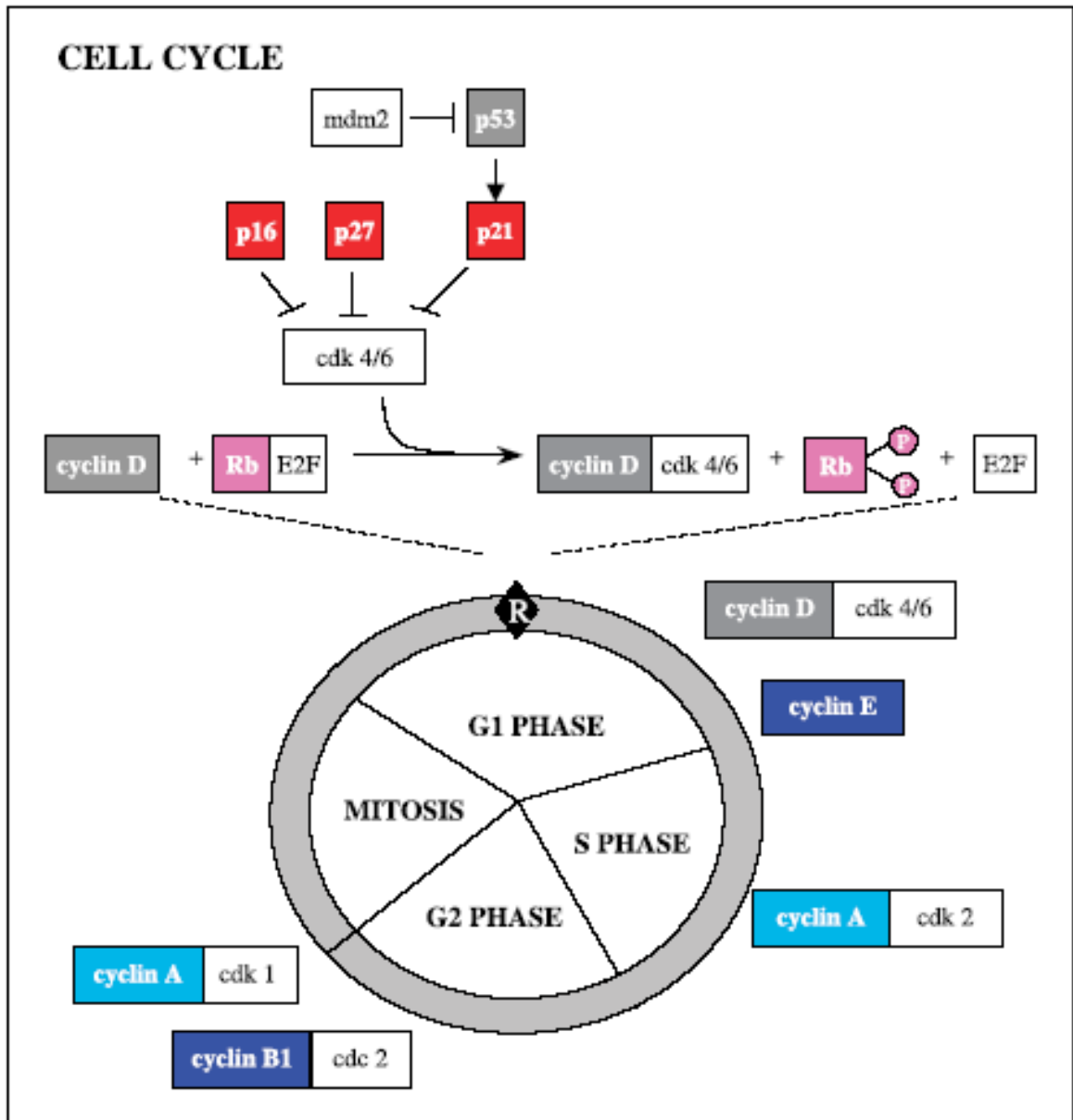


Figura 3

Marcadores moleculares de apoptosis

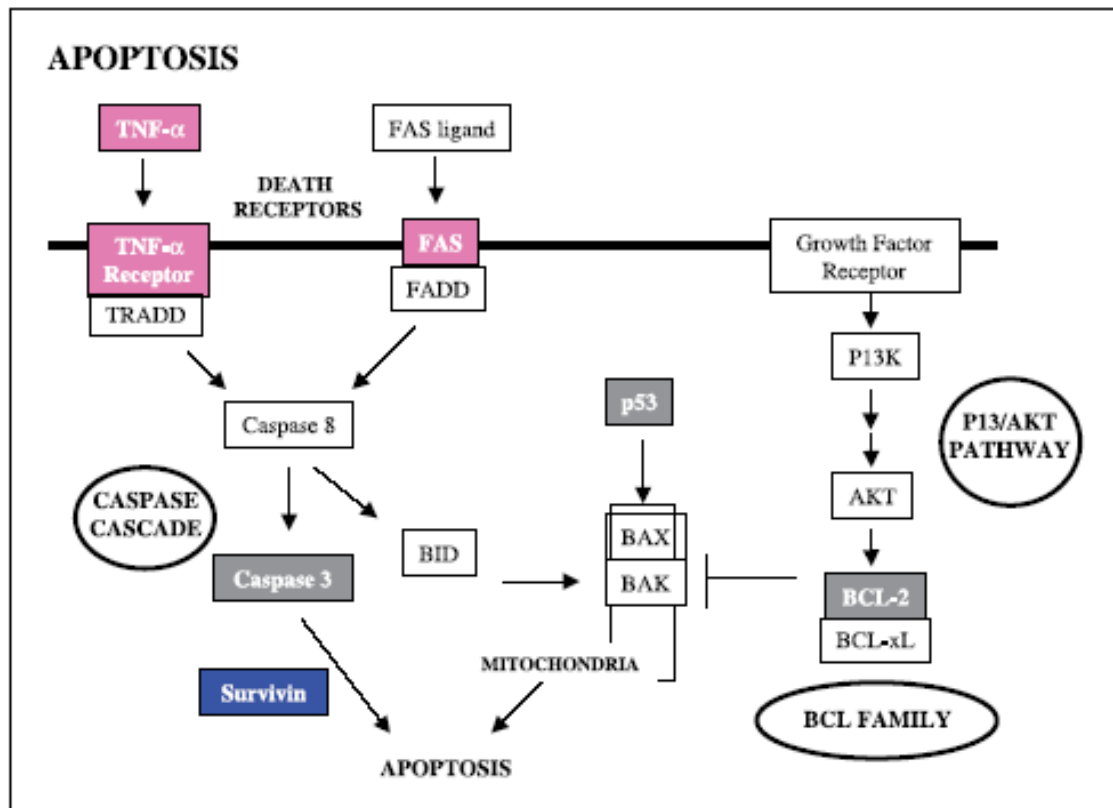
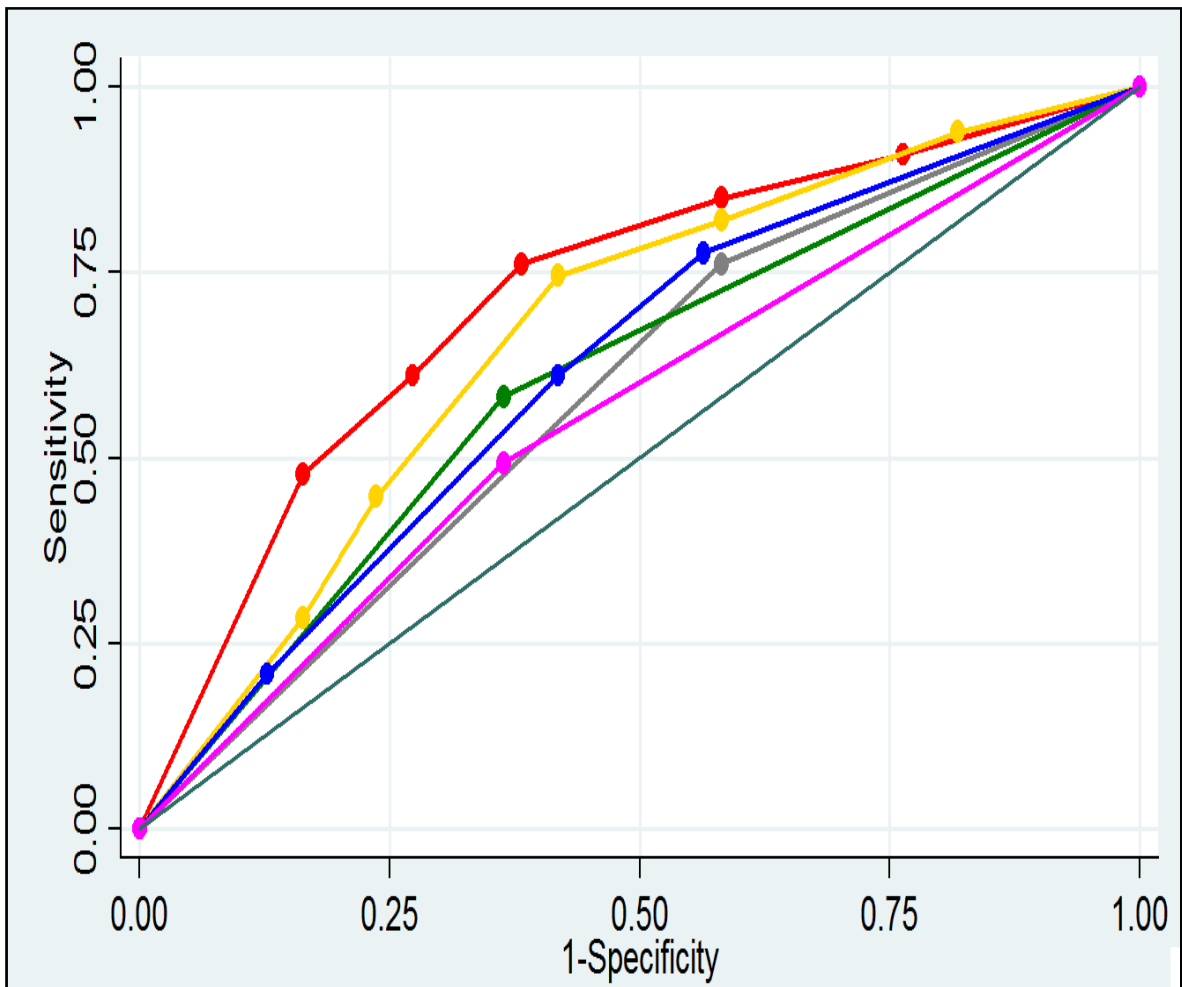


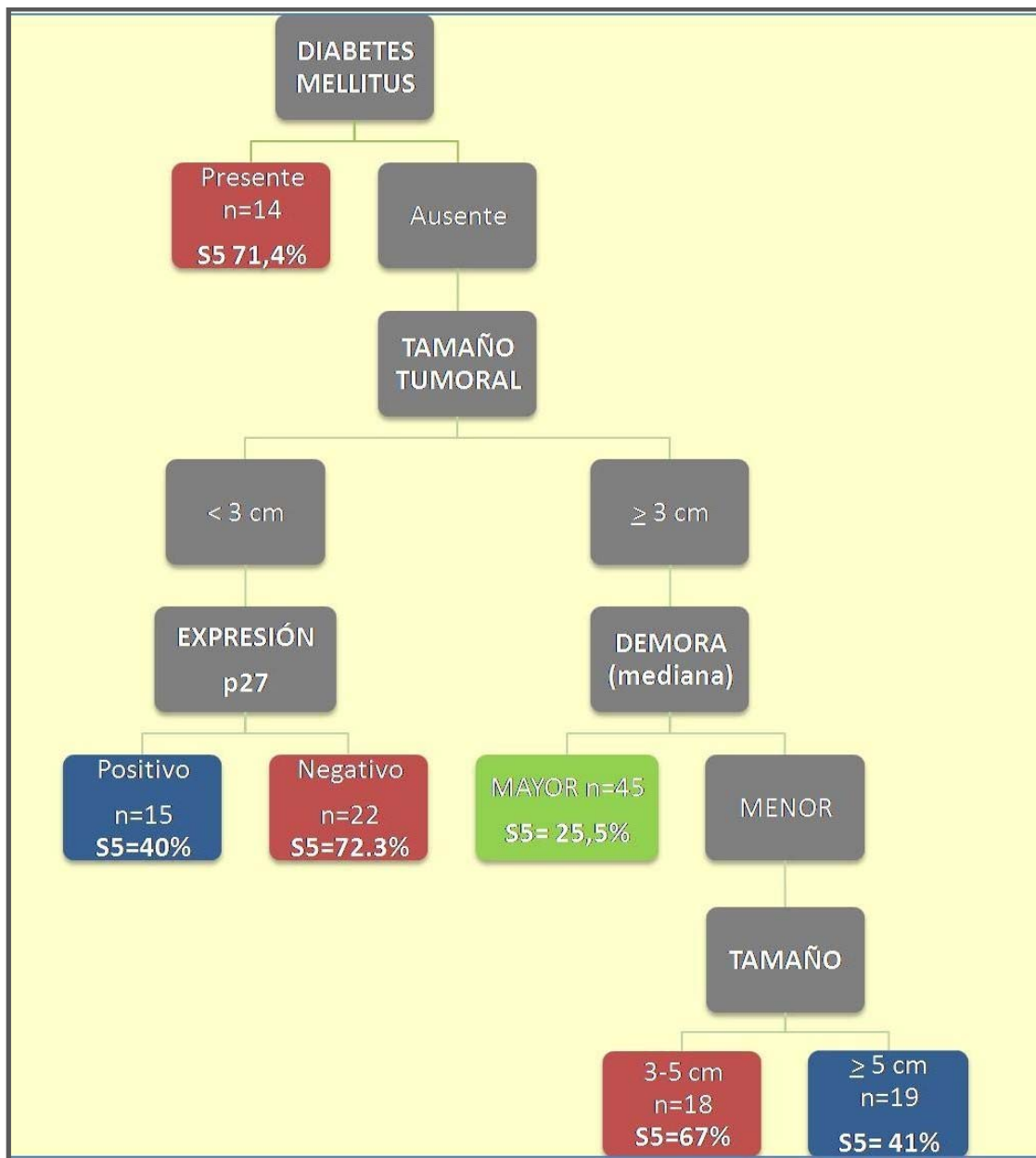
Figura 4

Área bajo la curva para cada grupo de variables.



- **Rojo: Modelo Multidimensional**
- **Gris: Grupo A:** Variables relacionadas con la extensión anatómica del tumor (TNM)
- **Amarillo: Grupo B:** Variables clínicas
- **Verde: Grupo C:** Variables analíticas
- **Azul: Grupo D:** Marcadores moleculares
- **Rosa: Grupo E:** Factores de actividad mitocondrial

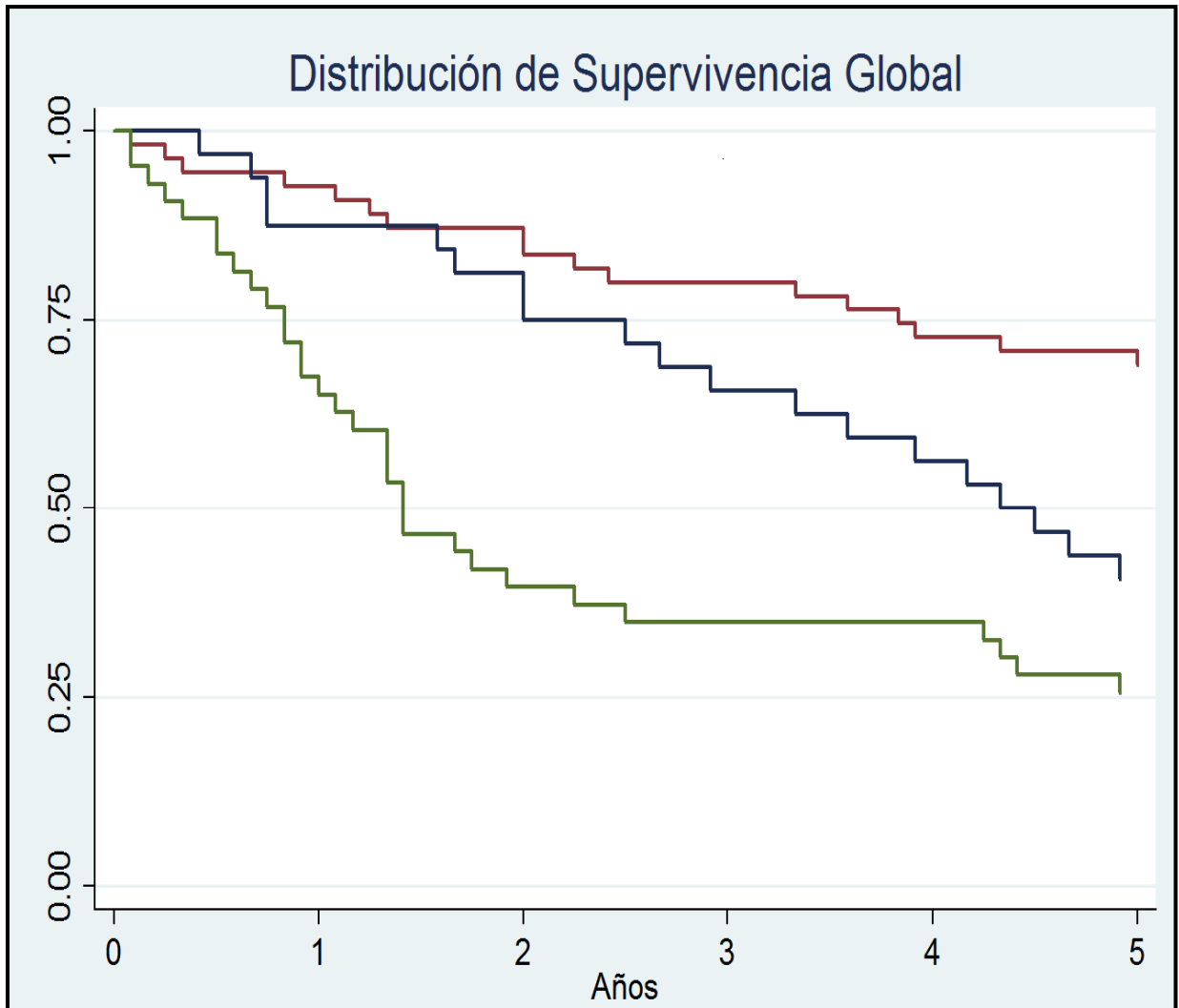
Figura 5 MODELO MULTIDIMENSIONAL



S5: Probabilidad de supervivencia a 5 años; para explicación, ver texto

Figura 6

Supervivencia global para ramas terminales con supervivencia similar del modelo conjunto.



Curva roja (n=55): grupo con pacientes con supervivencia a los 5 años del 71%, son aquellos que padecen de diabetes mellitus, NO presentan expresión de p27, y el tamaño es de 3-5cm

Curva azul (n=33): grupo con pacientes con supervivencia a los 5 años del 41%, son aquellos que presentan expresión de p27 y el tamaño tumoral es > 5cm

Curva verde (n=45): grupo con pacientes con supervivencia a los 5 años del 26% que corresponde a los pacientes con mayor demora mediana

J) BIBLIOGRAFIA:

1. Instituto Nacional de estadística. Defunciones según causa de muerte en España 2005. Madrid 2008. WWW. INE .ES
2. Vioque J, Bolumar F. Trends in mortality from lung cancer in Spain, 1951-80. *J Epidemiol Community Health* 1987;41:74-8.7.
3. Alonso I, Regidor E, Rodríguez C, et al. The main causes of death in Spain, 1992; comment. *Med Clin (Barc)* 1996; 107:441-5.
4. Álvarez Sala JL et al. *Neumología Clínica*. Primera edición. Elsevier España 2010. 459-465.
5. Cayuela A, Rodríguez-Dominguez S, López-Campos JL, et al. Lung cancer mortality in Spain: estimating the future burden to the year 2028. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:1117-21.
6. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, Otero R. Trends in lung cancer mortality rates in the provinces of Andalusia, Spain, 1975-2002. *Arch Bronconeumol* 2006;42:633-7.
7. Cabanes A, Vidal E, Aragonés N, et al. Cancer mortality trends in Spain: 1980-2007. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 3:14-20.
8. López Encuentra A. Lung cancer among women. *Arch Bronconeumol* 2001;37:55-7.
9. Franco J, Pérez-Hoyos S, Plaza P. Changes in lung-cancer mortality trends in Spain. *Int J Cancer* 2002;97:102-5.
10. Regidor E, Gutiérrez-Fisac JL, Rodríguez C. Increased socioeconomic differences in mortality in eight Spanish provinces. *Soc Sci Med* 1995;41:801-7.
11. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, López-Campos JL, et al. Lung cancer mortality trends in Spain between 1980 and 2005. *Arch Bronconeumol* 2008;44:70-4.
12. Ferlay J, Autier P, Boniol M, et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*. 2007;18:581-92.
13. Black RJ, Bray F, Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997;33:075-107.
14. La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, et al. Cancer mortality in Europe, 2000-2004, and an overview of trends since 1975. *Ann Oncol* 2010;21:1323-60.

15. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81.
16. Sánchez de Cos Escuín J, Riesco Miranda JA, Antón Martínez J, et al. Incidence of bronchopulmonary carcinoma in Extremadura in 1998. *Arch Bronconeumol* 2000;36:381-4.
17. Santos-Martínez MJ, Curull V, Blanco ML, et al. Lung cancer at a university hospital: epidemiological and histological characteristics of a recent and a historical series. *Arch Bronconeumol* 2005;41:307-12.
18. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zealand and Europe. *Lung Cancer* 2001;31:323-37 .
19. Koyi H, Hillerdal G, Brandén E. A prospective study of a total material of lung cancer from a county in Sweden 1997-1999: gender, symptoms, type, stage, and smoking habits. *Lung Cancer* 2002;36:9-14.
20. Bray FI, Weiderpass E. Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007. *Int J Cancer* 2010;126:1454-6
21. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermerlink HK et al. Tumours of the lung. In Travis WD eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of the lung, pleura and hearth*. Lyon: IARC Press 2004:9-124
22. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, et al. The new IASLC/ATS/ERS International multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thoracic Oncol* 2011;6:244–285.
23. Travis WD, Brambilla E, Van Schil P, et al. Paradigm shifts in lung cancer as defined in the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification. *Eur Respir J* 2011;38:239-43.
24. Anbazhagan R, Tihan T, Bornman DM, et al. Classification of small cell lung cancer and pulmonary carcinoid by gene expression profiles. *Cancer Res* 1999;59:5119-22.
25. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;20:13790-5.
26. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, et al on behalf of the members of the IASLC staging committee. 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;4:568-577
27. Sanchez de Cos J. Normativa SEPAR sobre estadificación del carcinoma de pulmón . 2010
 28. Fernando HC, Goldstraw P. The accuracy of clinical evaluative intrathoracic staging in lung cancer as assessed by postsurgical pathologic staging. *Cancer*. 1990;65:2503-6.
 29. Cetinkaya E, Turna A, Yildiz P, et al. Comparison of clinical and surgical-pathologic staging of the patients with non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:1000-5.
 30. López-Encuentra A, García-Luján R, Rivas JJ, et al. Comparison between clinical and pathologic staging in 2,994 cases of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005;79:974-9.
 31. GCCB-S (Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica). Estadificación ganglionar intraoperatoria en la cirugía del carcinoma broncogénico. Documento de consenso. *Arch Bronconeumol* 2001;37:495-503
 32. Coate LE, John T, Tsao MS, et al. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* 2009;10:1001-10.
 33. Custodio AB, González-Larriba JL, Bobokova J, et al. Prognostic and predictive markers of benefit from adjuvant chemotherapy in early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009;4:891-910
 34. Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, et al. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2004;22:811– 819.
 35. Wigle DA, Jurisica I, Radulovich N, et al. Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res* 2002;62:3005– 3008.
 36. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002;8:816–824.
 37. Schneider PM, Praeuer HW, Stoeltzing O, et al. Multiple molecular marker testing (p53, C-Ki-ras, c-erbB-2) improves estimation of prognosis in potentially curative resected non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000;83:473– 479.

38. Cuezva JM, Chen G, Alonso AM, Isidoro et al. The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 2004;25:1157-63.
39. Isidoro A, Martínez M, Fernández PL, et al. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 2004;378:17-20.
40. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, et al. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998;392:300-3.
41. Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, et al. Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 2001;61:1309-13.
42. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998;16:1207-17.
43. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annual Review of Medicine* 2003;54:73-87.
44. Mills NE, Fishman CL, Rom WN et al. Increased prevalence of K-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995;55:1444-7.
45. Adjei AA. K-ras as a target for lung cancer therapy. *J Thorac Oncol* 2008;3:S160-3.
46. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:851– 891.
47. Cappuzzo F, Ligorio C, Toschi L, et al M. EGFR and HER2 gene copy number and response to first-line chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Oncol* 2007 ;2:423-9.
48. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:339-46.
49. Helland Å, Skaug HM, Kleinberg L, et al. EGFR gene alterations in a Norwegian cohort of lung cancer patients selected for surgery. *J Thorac Oncol* 2011;6:947-50.
50. Sun Y, Ren Y, Fang Z, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol* 2010 ;28:4616-20.
51. Gao B, Sun Y, Zhang J, et al. Spectrum of LKB1, EGFR, and KRAS mutations in chinese lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol* 2010;5:1130-5.

52. Johnson BE, Russell E, Simmons AM, et al. MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Cell Biochem Suppl* 1996;24: 210-7.
53. Krystal G, Birrer M, Way J et al. Multiple mechanisms for transcriptional regulation of the myc gene family in small-cell lung cancer. *Molecular & Cellular Biology* 1998; 8:3373-81.
54. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993;329:690-4.
55. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351:453-6.
56. Mao L. Molecular abnormalities in lung carcinogenesis and their potential clinical implications. *Lung Cancer* 2001;34 :S27-34.
57. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in non small cell lung cancer. *J BiomedBiotechnol* 2011;2011:583929.
58. Husgafvel-Pursiainen K, Boffetta P, Kannio A, et al. p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:2906-11
59. Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF. The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. *Hum Mutat* 2003;21:229-39.
60. Shimizu E, Coxon A, Otterson GA, et al. RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma. *Oncogene* 1994 ;9:2441-8.
61. Sanchez-Cespedes M. The role of LKB1 in lung cancer. *Fam Cancer* 2011;10:447-53
62. Marcus AI, Zhou W. LKB1 regulated pathways in lung cancer invasion and metastasis. *J Thorac Oncol* 2010;5:1883-6.
63. Gugger M, Kappeler A, Vonlanthen S, et al. Alterations of cell cycle regulators are less frequent in advanced non-small cell lung cancer than in resectable tumours. *Lung Cancer* 2001;33:229-39.
64. Sterlacci W, Fiegl M, Hilbe W, et al. Deregulation of p27 and cyclin D1/D3 control over mitosis is associated with unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer, as determined in 405 operated patients. *J Thorac Oncol* 2010;5:1325-36.
65. Leversha MA, Fielding P, Watson S et al. Expression of p53, pRB, and p16 in lung tumours: a validation study on tissue microarrays. *J Pathol* 2003;(5):610-619.

66. Xue Q, Sano T, Kashiwabara K, et al. Aberrant expression of pRb, p16, p14ARF, MDM2, p21 and p53 in squamous cell carcinomas of lung. *Jpn J Cancer Res* 2001 ;92:285-92.
67. Nambu Y, Hughes SJ, Rehemtulla A, et al. Lack of cell surface Fas/APO-1 expression in pulmonary adenocarcinomas. *J Clin Invest* 1998;101:1102-10.
68. Kren L, Brazdil J, Hermanova M, et al. Prognostic significance of anti-apoptosis proteins survivin and bcl-2 in non-small cell lung carcinomas: a clinicopathologic study of 102 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:44-9.
69. Ucvet A, Kul C, GURSOY S, et al. Prognostic value of epithelial growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, E-Cadherin, and p120 catenin in resected non-small cell lung carcinoma. *Arch Bronconeumol* 2011;47:397-402.
70. Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, 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;20:2417-28.
71. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D et al. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 2005;11:3974-86.
72. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997;15:2858-65.
73. D'Amico TA, Massey M, Herndon JE 2nd et al. A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:736-43.
74. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W et al. Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer* 2005;93:387-91.
75. Mallett S, Timmer A, Sauerbrei W, et al. Reporting of prognostic studies of tumour markers: a review of published articles in relation to REMARK guidelines. *Br J Cancer* 2010;102:173-80.
76. Dobashi Y, Jiang SX, Shoji M, et al. Diversity in expression and prognostic significance of G1/S cyclins in human primary lung carcinomas. *J Pathol* 2003 ;199:208-20
77. Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, et al. Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. *Histopathology* 2009;55:28-36.

78. Arinaga M, Noguchi T, Takeno S, et al. Clinical implication of cyclin B1 in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2003;10:1381-6
79. Rossi F, Spizzo R, Bordo D, et al. Prognostic stratification of stage IIIA pN2 non-small cell lung cancer by hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data: an Alpe Adria Thoracic Oncology Multidisciplinary Group study (ATOM 014). *J Thorac Oncol* 2010;5:1354-60.
80. Jin M, Inoue S, Umemura T, 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;34:207-18.
81. Zhu J, Yu L, Zhan P, et al. The relationships between cyclin D1 expression and prognosis of non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2010;13:803-8.
82. Nishio M, Koshikawa T, Yatabe Y, et al. Prognostic significance of cyclin D1 and retinoblastoma expression in combination with p53 abnormalities in primary, resected non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 1997;3:1051-8.
83. Fukuse T, Hirata T, Naiki H, et al. Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2000;60:242-4.
84. Mishina T, Dosaka-Akita H, Hommura F, et al. Cyclin E expression, a potential prognostic marker for non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2000 ;6:11-6.
85. Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, et al. High cyclin E and low p27/Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* 2001 ;34:59-65.
86. Dobashi Y, Shoji M, Jiang SX, et al. Active cyclinA-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *Am J Pathol* 1998;153:963-72.
87. Tong J, Sun X, Cheng H, et al. Expression of p16 in non-small cell lung cancer and its prognostic significance: A meta-analysis of published literatures. *Lung Cancer* 2011;[Epub ahead of print)
88. Na II, Rho JK, Choi YJ, et al. The survival outcomes of patients with resected non-small cell lung cancer differ according to EGFR mutations and the P21 expression. *Lung Cancer* 2007 ;57:96-102.
89. Rubio L, Vera-Sempere FJ, Lopez-Guerrero JA, et al. A risk model for non-small cell lung cancer using clinicopathological variables, angiogenesis and oncoprotein expression. *Anticancer Res* 2005;25:497-504.

90. Sterlacci W, Fiegl M, Hilbe W, et al. Deregulation of p27 and cyclin D1/D3 control over mitosis is associated with unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer, as determined in 405 operated patients. *J Thorac Oncol* 2010;5:1325-36.
91. Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T et al. Prognostic significance of p27KIP1 protein and ki-67 growth fraction in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 2000;6:4073-81.
92. Caputi M, Groeger AM, Esposito V, et al. Loss of pRb2/p130 expression is associated with unfavourable clinical outcome in lung cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:3850-6.
93. García Luján R, Conde Gallego E, López Ríos F, et al. Prognostic value study of lung cancer molecular markers. *Med Clin (Barc)* 2009 ;132:529-36.
94. Martin B, Paesmans M, Mascaux C, et al. Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2004;91:2018-25.
95. Burke L, Flieder DB, Guinee DG, 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;11:232-41.
96. Graziano SL, Gu L, Wang X et al; Cancer and Leukemia Group B; North Central Cancer Treatment Group; Radiation Therapy Oncology Group. Prognostic significance of mucin and p53 expression in stage IB non-small cell lung cancer: a laboratory companion study to CALGB 9633. *J Thorac Oncol* 2010;5:810-7.
97. D'Amico TA, Aloia TA, Moore MB, et al. Molecular biologic substaging of stage I lung cancer according to gender and histology. *Ann Thorac Surg* 2000;69(3):882-6.
98. Dworakowska D, Gózdź S, Jassem E, et al. Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 35:35-41.
99. Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, et al. Prognostic value of the apoptotic index analysed jointly with selected cell cycle regulators and proliferation markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;66:127-33.
100. Dworakowska D, Jassem E, Jassem J, et al. MDM2 gene amplification: a new independent factor of adverse prognosis in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2004;43:285-95.

101. Knoefel LF, Werle-Schneider G, Dally H, et al. Polymorphisms in the apoptotic pathway gene BCL-2 and survival in small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6:183-9.
102. Cox G, Louise Jones J, Andi A, et al. Bcl-2 is an independent prognostic factor and adds to a biological model for predicting outcome inoperable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2001; 34:417-26.
103. Yoo J, Kim CH, Song SH, et al. Expression of caspase-3 and c-myc in non-small cell lung cancer. *Cancer Res Treat* 2004;36:303-7.
104. Oshita F, Ito H, Ikehara M, et al. Prognostic impact of survivin, cyclin D1, integrin beta1, and VEGF in patients with small adenocarcinoma of stage I lung cancer. *Am J Clin Oncol* 2004;27:425-8.
105. Koomägi R, Volm M. Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance. *Int J Cancer* 1999;84:239-43.
106. Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, et al. Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer* 2002;94:752-8.
107. Asnaghi L, Vass WC, Quadri R et al. E-cadherin negatively regulates neoplastic growth in non-small cell lung cancer: role of Rho GTPases. *Oncogene* 2010;29:2760-71.
108. Pagaki E, Patsouris E, Gonidi M, et al. The value of E-cadherin/beta-catenin expression in imprints of NCSLC: relationship with clinicopathological factors. *Diagn Cytopathol* 2010;38:419-24.
109. Shah A, Swain WA, Richardson D, et al. Phospho-akt expression is associated with a favorable outcome in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2930-6
110. Gately K, Al-Alao B, T Dhillon, et al. Overexpression of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and angiogenesis are poor prognostic factors in early stage NSCLC: A verification study. *Lung Cancer* 2011. [Epub ahead of print]
111. Anagnostou VK, Bepler G, Syrigos KN, et al. High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:4157-64.
112. Selvaggi G, Novello S, Torri V, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2004;15:28-32.

113. Onn A, Correa AM, Gilcrease M, et al. Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:136-43.
114. Paz-Ares L, Soulières D, Melezínek I, et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. *J Cell Mol Med* 2010 ;14:51-69.
115. Wu SG, Gow CH, Yu CJ, et al . Frequent epidermal growth factor receptor gene mutations in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 2008 ;32:924-30.
116. Hashim M, Sayed M, Samy N, et al. Prognostic significance of telomerase activity and some tumor markers in non-small cell lung cancer. *Med Oncol* 2011 ;28:322-30.
117. Nakamura H, Kawasaki N, Taguchi M, et al. Association of HER-2 overexpression with prognosis in nonsmall cell lung carcinoma: a metaanalysis. *Cancer* 2005;103:1865-73.
118. Kim HS, Youm HR, Lee JS et al. Correlation between cyclooxygenase-2 and tumor angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 42:163-70.
119. Tan D, Li Q, Deeb G et al. Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study. *Human Pathology*2003;34:597-604.
120. Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM et al. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res* 2003;63:7113-21.
121. Ortega D, Cuezva JM (2005). Mitochondria in Cancer Biology. En: "New Frontiers in Mitochondrial Biogenesis and Disease" (F. Villarroya, ed.) Research Signpost, Kerala. Chapter 6, pp. 111-39.
122. Ortega D, et al (2004). The organelles, I: Mitochondrial Failure and Neurodegeneration. En: "Brain Damage and Repair" (J.M. Delgado-Garcia and T. Herdegen, eds.) Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Chapter 7, pp.95-109.
123. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933.
124. Hanahan D, Weinberg RA . The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
125. Cuezva, JM, Krajewska M, de Heredia ML, et al. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 2002; 62: 6674-81.

126. Isidoro A, Martínez M, Fernández PL, et al. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 2004; 378: 17-20.
127. Formentini L, Martínez-Reyes I, Cuezva JM. The mitochondrial bioenergetic capacity of carcinomas. *IUBMB Life*. 2010 ;62:554-60.
128. Isidoro A, Casado E, Redondo A, et al. Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 2095-104.
129. Govindarajan B, Shah A, Cohen C, et al. Malignant transformation of human cells by constitutive expression of platelet-derived growth factor-BB. *J Biol Chem* 2005; 280: 13936-43.
130. López de Heredia M, Izquierdo JM, Cuezva JM. A conserved mechanism for controlling the translation of β -F1-ATPase mRNA between the fetal liver and cancer cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 7430-37.
131. Warburg, O. *The Metabolism of Tumors*. pp. 254–270. London: Arnold Constable, 1930.
132. Ramanathan A, Wang C, Schreiber SL, et al. Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 5992-7.
133. Gottlieb E et al. Mitochondrial tumour suppressors: A genetic and biochemical update. *Nature Reviews Cancer* 2005; 5: 857-66.
134. Unwin RD, Craven RA, Harnden P, et al. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 2003; 3: 1620-32.
135. Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U et al. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1005-10.
136. Yin PH, Lee HC, Chau GY , et al. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 2390-6.
137. Hervouet E, Demont J, Pecina P, et al. A new role for the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: stimulation of mitochondrial oxidative phosphorylation complex biogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 531-9.

138. He QY, Chen J, Kung HF, et al. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 271-8.
139. Shin YK, Yoo BC, Chang HJ, et al. Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 2005; 65: 3162-70.
140. Simon R, Sauter G. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2003 ;5:1-12.
141. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.
142. Yang P, Sun Z, Aubry MC, et al. Study design considerations in clinical outcome research of lung cancer using microarray analysis. *Lung Cancer* 2004;46:215-26.
143. Santos ES, Blaya M, Raez LE. Gene expression profiling and non-small-cell lung cancer: where are we now? *Clin Lung Cancer* 2009 ;10:168-73.
144. Larsen JE, Pavey SJ, Passmore LH, et al. Gene expression signature predicts recurrence in lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2007 ;13(10):2946-54.
145. D’Cunha J, Herndon JL, Herzan DL, et al. Poor correlation between clinical and pathological staging in stage I non small cell lung cancer: results from CALGB 9761, a prospective trial [Abstract]. *Proc ASCO* 2003:A2550.
146. Nesbitt JC, Putnam JB, Jr., Walsh GL et al. Survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Ann Thor Surg* 1995; 60:466-72.
147. Agarwal M, Brahmanday G, Chmielewski GW, et al. Age, tumor size, type of surgery, and gender predict survival in early stage (stage I and II) non-small cell lung cancer after surgical resection. *Lung Cancer* 2010;68:398-402.
148. Chansky K, Sculier JP, Crowley JJ, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project: prognostic factors and pathologic TNM stage in surgically managed non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4:792–801
149. Rubio L, Vera-Sempere FJ, Lopez-Guerrero JA, et al. A risk model for non-small cell lung cancer using clinic pathological variables, angiogenesis and oncoprotein expression. *Anticancer Res* 2005; 25:497-504.
150. Carbone E, Asamura H, Takei H, et al. T2 tumors larger than five centimeters in diameter can be upgraded to T3 in non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:907-12.

151. Lopez-Encuentra A, Duque-Medina JL, Rami-Porta R et al. Staging in lung cancer: is 3 cm a prognostic threshold in pathologic stage I non-small cell lung cancer? A multicenter study of 1,020 patients. *Chest* 2002; 121:1515-20.
152. León-Atance P, Moreno-Mata N, González-Aragoneses F, et al. Multicenter Analysis of Survival and Prognostic Factors in Pathologic Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer According to the New 2009 TNM Classification. *Arch Bronconeumol* 2011;47:441-6.
153. Li Z, Yu Y, Lu J, Luo Q, Wu C, et al. Analysis of the T descriptors and other prognosis factors in pathologic stage I non-small cell lung cancer in China. *J Thorac Oncol* 2009;4:702-9.
154. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest* 2002;122:1037-57.
155. Ou SH, Zell JA, Ziogas A, et al. Prognostic factors for survival of stage I nonsmall cell lung cancer patients : a population-based analysis of 19,702 stage I patients in the California Cancer Registry from 1989 to 2003. *Cancer* 2007;110:1532-41.
156. Battafarano RJ, Piccirillo JF, Meyers BF, et al. Impact of comorbidity on survival after surgical resection in patients with stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:280-7.
157. Wang CY, Lin YS, Tzao C, et al. Comparison of Charlson comorbidity index and Kaplan-Feinstein index in patients with stage I lung cancer after surgical resection. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:877-81.
158. Birim O, Kappetein AP, van Klaveren RJ, et al. Prognostic factors in non-small cell lung cancer surgery. *Eur J Surg Oncol* 2006;32:12-23.
159. Gómez de la Cámara A, López-Encuentra A, Ferrando P; Bronchogenic Carcinoma Cooperative Group of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (GCCB-S). Heterogeneity of prognostic profiles in non-small cell lung cancer: too many variables but a few relevant. *Eur J Epidemiol* 2005;20:907-14.
160. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet*. 2003;362:847-52.
161. Allender S, Balakrishnan R, Scarborough P, et al. The burden of smoking-related ill health in the UK. *Tob Control* 2009 ;18:262-7.
162. Doll R, Peto R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidablerisks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*. 1981;66:1191-308.

163. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2005;93:825-33.
164. Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* 2004;45:S3-9.
165. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med* 2002;252:206-24.
166. Takkouche B, Gestal-Otero JJ. The epidemiology of lung cancer: review of risk factors and Spanish data. *Eur J Epidemiol* 1996;12:341-9.
167. www. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Encuesta de salud pública 2006
168. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*;315:980-8.
169. Gómez Raposo C, De Castro Carpeño J, González Barón M. Causes of lung cancer: smoking, environmental tobacco smoke exposure, occupational and environmental exposures and genetic predisposition. *Med Clin (Barc)* 2007;128:390-6.
170. Le Calvez F, Mukeria A, Hunt JD, et al. TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res* 2005;65:5076-83.
171. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al: Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 2001; 92:1525-1530.
172. Siegfried JM, Gillespie AT, Mera R, et al: Prognostic value of specific KRAS mutations in lung adenocarcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:841-847.
173. Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* 2007;5:561-70.
174. Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*;92(6):1525-30.
175. Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, et al. Chromosomal alterations in lung adenocarcinoma from smokers and non smokers. *Cancer Res* 2001; 61:1309-13.
176. Toyooka S, Tsuda T, Gazdar AF. The TP53 gene, tobacco exposure, and lung

- cancer. *Hum Mutat* 2003;21:229-39.
177. Vahakangas KH, Bennett WP, Castren K, et al: p53 and K-ras mutations in lung cancers from former and never-smoking women. *Cancer Res* 2001; 61:4350-4356.
178. Wu SG, Gow CH, Yu CJ, et al . Frequent epidermal growth factor receptor gene mutations in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 2008 ;32(4):924-30.
179. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005 2;97:339-46.
180. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 2004;64:8919-23.
181. Parsons A, Daley A, Begh R, Aveyard P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: systematic review of observational studies with meta-analysis. *BMJ* 2010;340: b5569
182. Sardari Nia P, Weyler J, Colpaert C, et al. Prognostic value of smoking status in operated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005;47:351-9.
183. Zhou W, Heist RS, Liu G, et al. Smoking cessation before diagnosis and survival in early stage non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 2006 ;53(3):375-80.
184. Toh CK, Wong EH, Lim WT, et al. The impact of smoking status on the behavior and survival outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer: a retrospective analysis. *Chest*. 2004;126:1750-6.
185. López-Encuentra A; Bronchogenic Carcinoma Co-operative Group. Comorbidity in operable lung cancer: a multicenter descriptive study on 2992 patients. *Lung Cancer* 2002;35:263-9
186. Yao H, Rahman I. Current concepts on the role of inflammation in COPD and lung cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:375-83.
187. Mayne ST, Buenconsejo J, Janerich DT. Previous lung disease and risk of lung cancer among men and women nonsmokers. *Am J Epidemiol* 1999;149:13-20.
188. De Torres JP, Bastarrika G, Wisnivesky JP, et al. Assessing the relationship between lung cancer risk and emphysema detected on low-dose CT of the chest. *Chest* 2007;132:1932-8.

189. Malhotra S, Lam S, Man SF, Gan WQ, et al. The relationship between stage 1 and 2 non-small cell lung cancer and lung function in men and women. *BMC Pulm Med* 2006;6:2.
190. Papi A, Casoni G, Caramori G, et al. COPD increases the risk of squamous histological subtype in smokers who develop non-small cell lung carcinoma. *Thorax* 2004;59:679-81.
191. Raviv S, Hawkins KA, DeCamp MM Jr, et al. Lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease: enhancing surgical options and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1138-46.
192. Mannino DM, Aguayo SM, Petty TL, et al. Low lung function and incident lung cancer in the United States: data From the First National Health and Nutrition Examination Survey follow-up. *Arch Intern Med* 2003;163:1475-80.
193. Wasswa-Kintu S, Gan WQ, Man SF, et al. Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Thorax*. 2005 Jul;60(7):570-5.
194. Nakajima T, Sekine Y, Yamada Y, et al. Long-term surgical outcome in patients with lung cancer and coexisting severe COPD. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009 ;57:339-42.
195. Volpino P, Cangemi R, Fiori E, Cangemi B, et al. Risk of mortality from cardiovascular and respiratory causes in patients with chronic obstructive pulmonary disease submitted to follow-up after lung resection for non-small cell lung cancer. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2007;48:375-83.
196. Sekine Y, Kesler KA, Behnia M, et al. COPD may increase the incidence of refractory supraventricular arrhythmias following pulmonary resection for non-small cell lung cancer. *Chest*. 2001;120:1783-90.
197. Kearney DJ, Lee TH, Reilly JJ et al. Assessment of operative risk in patients undergoing lung resection. Importance of predicted pulmonary function. *Chest* 1994;105:753-9.
198. Win T, Jackson A, Sharples L et al. Relationship between pulmonary function and lung cancer surgical outcome. *ERJ*2005; 25:594-9.
199. López-Encuentra A, Astudillo J, Cerezal J, et al Prognostic value of chronic obstructive pulmonary disease in 2994 cases of lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27:8-13.

200. Sekine Y, Behnia M, Fujisawa T. Impact of COPD on pulmonary complications and on long-term survival of patients undergoing surgery for NSCLC. *Lung Cancer* 2002;37:95-101.
201. Anthonisen NR, Wright EC, Hodgkin JE. Prognosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:14-20.
202. Harpole DH Jr, DeCamp MM Jr, Daley J, et al. Prognostic models of thirty-day mortality and morbidity after major pulmonary resection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:969-79.
203. Yamamoto K, Padilla Alarcón J, Calvo Medina V, et al. Surgical results of stage I non-small cell lung cancer: comparison between elderly and younger patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;23:21-5.
204. Chambers A, Routledge T, Pilling J, et al. In elderly patients with lung cancer is resection justified in terms of morbidity, mortality and residual quality of life? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2010;10:1015-21.
205. Pallis AG, Scarci M. Are we treating enough elderly patients with early stage non-small cell lung cancer? *Lung Cancer* 2011; [Epub ahead of print].
206. Pallis AG, Gridelli C. Is age a negative prognostic factor for the treatment of advanced/metastatic non-small-cell lung cancer? *Cancer Treat Rev* 2010 ;36:436-41
207. Richards MA, Westcombe AM, Love SB, et al. Influence of delay on survival in patients with breast cancer: a systematic review. *Lancet* 1999;353:119–26.
208. López Encuentra A, Martín de Nicolás JL, Casado López M, et al. Delays in the diagnosis and surgical treatment of bronchogenic carcinoma. *Arch Bronconeumol* 1998;34:123-6.
209. Quarterman RL, McMillan A, Ratcliffe MB, et al. Effect of preoperative delay on prognosis for patients with early stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:108-13.
210. Neal RD. Do diagnostic delays in cancer matter? *Br J Cancer* 2009;101:S9-S12.
211. Neal RD, Allgar VL, Ali N, et al. Stage, survival and delays in lung, colorectal, prostate and ovarian cancer: comparison between diagnostic routes. *Br J Gen Pract* 2007;57:212-9.
212. Aragonese FG, Moreno N, Leon P, et al; Bronchogenic Carcinoma Cooperative Group of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery (GCCB-S). Influence of delays on survival in the surgical treatment of bronchogenic carcinoma. *Lung Cancer* 2002;36:59-63.

213. Jensen AR, Mainz J, Overgaard J. Impact of delay on diagnosis and treatment of primary lung cancer. *Acta Oncol* 2002;41:147-52.
214. Grupo Cooperativo Médico Quirúrgico del Carcinoma Broncogénico del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. Pauta Carcinoma Broncogénico Actualización 2010. <http://www.mbeneumologia.org/pautaCB>
215. Rami Porta R, Duque Medina JL, Hernández Hernández JR, et al. Normativa actualizada (1998) sobre diagnóstico y estadificación del carcinoma broncogénico. *Arch bronconeumol* 1998;34: 437-452.
216. Goldstraw P (Editor). International Association for the Study of Lung Cancer. Staging Handbook in Thoracic Oncology. Orange Park, Florida: Editorial Rx-Press 2009.
217. Quinlan R. C4.5: Programs for Machine Learning. San Mateo, California: Morgan Kaufmann Publishers 1993.
218. Ture M, Tokatli F, Kurt I. Using Kaplan–Meier analysis together with decision tree methods (C&RT, CHAID, QUEST, C4.5 and ID3) in determining recurrence-free survival of breast cancer patients. *Expert Systems with Applications* 2009;36:2017–26.
219. Hanley JA, McNeil BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology* 1982;143:29-36.
220. Nagelkerke NJD. A note on a general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* 1991;78:691-692.
221. StataCorp. Stata Statistical Software: Release 10. College Station, TX: StataCorp LP 2007.
222. Schoenfeld DA. Analysis of categorical data: logistic model. In: Mike V, Stanley KE, editors. *Statistics in medical research*. New York, NY: Wiley 1982: 443-454.
223. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer* 2003;41:245-58.
224. Fry WA, Menck HR, Winchester DP. The National Cancer Data Base report on lung cancer. *Cancer* 1996;77:1947-55.
225. Padilla J, Penalver JC, Jorda C et al. Non-small cell bronchogenic cancer in stage IA: mortality patterns after surgery. *Arch de Bronconeum* 2005; 41:180-4.
226. Manac'h D, Riquet M, Medioni J, et al. Visceral pleura invasion by non-small cell lung cancer: an underrated bad prognostic factor. *Ann Thorac Surg* 2001 ;71:1088-93.

227. Kang JH, Kim KD, Chung KY. Prognostic value of visceral pleura invasion in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2003;23:865-9.
228. Demir A, Turna A, Kocaturk C, et al. Prognostic significance of surgical-pathologic N1 lymph node involvement in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2009;87:1014-22.
229. Petrović M, Baskić D, Banković D, et al. Neuroendocrine differentiation as an indicator of chemosensitivity and prognosis in nonsmall cell lung cancer. *Biomarkers* 2011;16:311.
230. de Torres JP, Marín JM, Casanova C, et al. Lung Cancer in patients with COPD: Incidence and predicting factors. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:913-9
231. de Rijke JM, Schouten LJ, ten Velde GP, et al. Influence of age, comorbidity and performance status on the choice of treatment for patients with non-small cell lung cancer; results of a population-based study. *Lung Cancer* 2004 ;46:233-4520.
232. Tomita M, Shimizu T, Hara M, et al. Preoperative leukocytosis, anemia and thrombocytosis are associated with poor survival in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2009;29:2687-90.
233. Hauser CA, Stockler MR, Tattersall MH. Prognostic factors in patients with recently diagnosed incurable cancer: a systematic review. *Support Care Cancer* 2006;14:999-1011.
234. Win T, Sharples L, Groves AM, et al. Predicting survival in potentially curable lung cancer patients. *Lung* 2008;186:97-102.
235. McMillan DC, Watson WS, O'Gorman P, et al. Albumin concentrations are primarily determined by the body cell mass and the systemic inflammatory response in cancer patients with weight loss. *Nutr Cancer* 2001;39:210-3.
236. Luis A. M., Izquierdo J. M., Ostronoff L. K. et al. Translational regulation of mitochondrial differentiation in neonatal rat liver. Specific increase in the translational efficiency of the nuclear-encoded mitochondrial beta-F1-ATPase mRNA *J. Biol. Chem* 1993; 268:1868–1875
237. López-Ríos F, Sánchez-Aragó M, García-García E. et al. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 2007; 67:9013-9017.
238. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest* 2009;136:260-71.

239. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, 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; 2: 706-714.
240. Potti A, Mukherjee S, Petersen R, et al. A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006;355:570-80.
241. Lee ES, Son DS, Kim SH, et al. Prediction of recurrence-free survival in postoperative non-small cell lung cancer patients by using an integrated model of clinical information and gene expression. *Clin Cancer Res* 2008; 14:7397-404.
242. Lau SK, Boutros PC, Pintilie M, et al. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:5562-9.
243. Guo L, Ma Y, Ward R, et al. Constructing molecular classifiers for the accurate prognosis of lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:3344-54.
244. Director's Challenge Consortium for the Molecular Classification of Lung Adenocarcinoma, Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med.* 2008;14:822-7.
245. Potti A, Mukherjee S, Petersen R, et al. Retraction: A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2011;364:1176.
246. Win T, Sharples L, Groves AM, et al. Predicting survival in potentially curable lung cancer patients. *Lung* 2008;186:97-102.
247. Varlotto J, Medford-Davis LN, Recht A et al. Confirmation of the role of diabetes in the local recurrence of surgically resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2012;75:381-90.
248. Colinet B, Jacot W, Bertrand D, et al. A new simplified comorbidity score as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer patients: description and comparison with the Charlson's index. *Br J Cancer* 2005; 93:1098-10.
249. Hatlen P, Grønberg BH, Langhammer A, et al. Prolonged survival in patients with lung cancer with diabetes mellitus. *J Thorac Oncol* 2011;6:1810-7.
250. Tan BX, Yao WX, Ge J, et al. Prognostic influence of metformin as first-line chemotherapy for advanced nonsmall cell lung cancer in patients with type 2 diabetes. *Cancer* 2011;117:5103-11.

251. Currie CJ, Poole CD, Jenkins-Jones S, et al. Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: impact of metformin on survival. *Diabetes Care* 2012;35:299-304.
252. Wu N, Gu C, Gu H, et al. Metformin induces apoptosis of lung cancer cells through activating JNK/p38 MAPK pathway and GADD153. *Neoplasma* 2011;58:482-90.