

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA



ATRAPAMIENTO ALVEOLAR Y DISEMINACIÓN INTERALVEOLAR EN
CARCINOMA PULMONAR NO MICROCÍTICO

CORRELACION CON LA EXPRESIÓN DE ANTIGENO DE GRUPO A, PROTEINAS DE
CHOQUE TERMICO, ESTADIFICACIÓN Y SUPERVIVENCIA

TESIS DOCTORAL DE:

FRANCISCO MIGUEL IZQUIERDO GARCÍA

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

EMILIO ÁLVAREZ FERNÁNDEZ

Madrid, 2013

©Francisco Miguel Izquierdo García, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO “GREGORIO
MARAÑÓN”
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

TESIS DOCTORAL

ATRAPAMIENTO ALVEOLAR Y DISEMINACIÓN
INTERALVEOLAR EN CARCINOMA PULMONAR NO
MICROCÍTICO: CORRELACION CON LA
EXPRESIÓN DE ANTIGENO DE GRUPO A,
PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO,
ESTADIFICACIÓN Y SUPERVIVENCIA

Autor: Francisco Miguel Izquierdo García

Director: Prof. Dr. Emilio Álvarez Fernández

MADRID 2013

INFORME DEL DIRECTOR DEL TRABAJO.

DON EMILIO ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, PROFESOR TITULAR DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, JEFE DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y LABORATORIOS DEL HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO GREGORIO MARAÑÓN,

CERTIFICA: Que Don FRANCISCO MIGUEL IZQUIERDO GARCIA ha realizado en este departamento y bajo mi dirección el trabajo “ATRAPAMIENTO ALVEOLAR Y DISEMINACIÓN INTERALVEOLAR EN CARCINOMA PULMONAR NO MICROCÍTICO: CORRELACION CON LA EXPRESIÓN DE ANTIGENO DE GRUPO A, PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO, ESTADIFICACIÓN Y SUPERVIVENCIA”.

Considero que dicho trabajo presenta una hipótesis razonable, con un apoyo bibliográfico adecuado. El método utilizado es correcto y los hallazgos justifican suficientemente las conclusiones. Por todo ello considero que reúne las condiciones necesarias para su lectura y defensa como Tesis Doctoral.

Y para que así conste firmo el presente en Madrid, a de de 2013.

Fdo.: _____

(fecha y firma)

INFORME DEL CONSEJO DEL DEPARTAMENTO.

DR. D. FELIPE LLANES MENENDEZ, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

INFORMO: Que una vez examinado el trabajo presentado por Don FRANCISCO MIGUEL IZQUIERDO GARCIA, titulado “ATRAPAMIENTO ALVEOLAR Y DISEMINACIÓN INTERALVEOLAR EN CARCINOMA PULMONAR NO MICROCÍTICO: CORRELACION CON LA EXPRESIÓN DE ANTIGENO DE GRUPO A, PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO, ESTADIFICACIÓN Y SUPERVIVENCIA”, dirigido por el prof. Dr. D. Emilio Alvarez Fernández, este departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo de Departamento

El director del Departamento

Fdo _____

(fecha y firma)

A mi madre

A mi padre (in memoriam)

A María Angeles

**.....llegaréis al conocimiento de la verdad, y
la verdad os hará libres. (Jn 8,32).**

INDICE

	<u>Nº PAGINA</u>
<u>INDICE</u>	<u>4</u>
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	<u>8</u>
<u>GLOSARIO</u>	<u>10</u>
<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>12</u>
I. Generalidades.....	13
1) Incidencia y mortalidad del carcinoma pulmonar.....	13
2) Etiopatogénesis.....	15
3) Clasificación histológica.....	17
II. Biología molecular del cáncer de pulmón	19
III. Factores pronósticos en el carcinoma de pulmón.....	26
IV. Factores histológicos.....	27
V. Expresión del antígeno del grupo sanguíneo A.....	29
VI. Fisiopatología del sistema de proteínas de choque térmico.....	31
VII. Hipótesis y justificación del presente estudio.....	34
<u>OBJETIVOS</u>	<u>36</u>
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	<u>39</u>

I.	MATERIAL	
1.1.	Casos del estudio.....	40
1.2.	Muestras del estudio.....	41
II.	METODOS	
2.1.	Datos clínicos.....	41
2.2.	Estadio tumoral.....	42
2.3.	Procesamiento de las muestras.....	46
2.4.	Estudio histológico.....	47
2.5.	Características morfológicas estudiadas.....	49
2.6.	Técnicas inmunohistoquímicas y anticuerpos utilizados.....	53
2.7.	Análisis estadístico.....	58
	RESULTADOS	59

I.	ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA SERIE	
1.1.	Datos clínicos.....	60
1.2.	Distribución por estadios y tipos histológicos.....	62
1.3.	Factores histológicos.....	63
1.4.	Estudio inmunohistoquímico.....	80
1.4.1.	Expresión del antígenos del grupo sanguíneo A.....	80
1.4.2.	Proteínas de choque térmico.....	83
II.	RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA.	

2.1.	Supervivencia global.....	91
2.2.	Supervivencia libre de enfermedad.....	110

DISCUSIÓN **124**

1.	Factores histológicos.....	125
2.	Grupo sanguineo A.....	135
3.	Proteínas de choque termico.....	145

CONCLUSIONES **169**

ICONOGRAFÍA **172**

BIBLIOGRAFÍA **183**

RESUMEN EN INGLÉS (ENGLISH SUMMARY) **209**

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que de múltiples formas me han ayudado en la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. Emilio Alvarez Fernández, Director de esta Tesis, Jefe del Departamento de Anatomía Patológica y Laboratorios del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón” y profesor titular de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda y supervisión en la realización de esta tesis y tantos otros estudios a lo largo de más de veinte años de amistad que trasciende la mera relación profesional.

A los técnicos de laboratorio que han realizado las diferentes técnicas que han hecho posible este trabajo, especialmente Marisa y Julio.

Al Dr Emiliano Honrado, compañero del Servicio de Anatomía Patológica del Complejo Asistencial de León, que ha realizado el estudio estadístico, imprescindible para el manejo y elaboración de los datos de este trabajo.

Al Dr Nicolás Moreno, actual jefe de Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla por habernos facilitado los datos de estadificación y seguimiento de los pacientes para su correlación con los hallazgos anatomopatológicos.

A la Dra María Cebollero del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”, por facilitarme el acceso a los casos estudiados y a las diferentes técnicas realizadas.

A mis compañeros de Servicio con quienes transcurre mi vida profesional, por la ayuda mutua y el agradable ambiente personal que facilita la labor diaria y contribuye al gusto por la realización de esas tareas y a la felicidad cotidiana.

Por último gracias a mi familia: Feli, Almudena, Chema y mi mujer María Angeles por su interés y apoyo en tantas cosas verdaderamente importantes de la vida, haciéndola más fácil y llevadera.

GLOSARIO

GLOSARIO

ABC: Complejo Avidina-Biotina

ADN: Acido desoxirribonucleico

AIF: factor inductor de apoptosis.

ALK: quinasa del linfoma anaplasico

ARN: Acido ribonucleico

ATP: Adenosina trifosfato

B-SA: Sistema Biotina-Streptavidina amplificado

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidermico.

HSP: proteinas de choque termico

IGFR: receptor del factor de crecimiento de tipo insulina

IHQ: Inmunohistoquimica

Le: Lewis

MAPK: protein-quinasa mitogeno activada.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NSCLC: carcinoma pulmonar no microcitico

OMS: Organización mundial de la salud

PAP: Peroxidasa-antiperoxidasa

PCR: Reacción de polimerasa en cadena

RMN: Resonancia nuclear magnetica

RT-PCR: Reacción de polimerasa en cadena con transcripción inversa

SLE: supervivencia libre de enfermedad.

TAC: Tomografía axial computerizada

TTF-1: Factor de transcripción tiroideo 1

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

INTRODUCCIÓN

I. GENERALIDADES.

1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD.

El cáncer de pulmón es uno de los problemas sanitarios más importantes, especialmente en el mundo occidental. En las estadísticas más recientes constituye la mayor causa de mortalidad por cáncer en Estados Unidos (28% de las muertes por cáncer), en ambos sexos. En ese país se diagnostican 215.000 cánceres de pulmón al año, con una mortalidad de 161.000 (1,2).

En la Unión Europea se diagnostican anualmente más de 381.000 casos nuevos, con 341.000 muertes por año, que suponen el 20,7% de todos los tipos de cáncer en varones y el 5,6% en mujeres. En relación con la población europea, uno de cada 10-15 varones y una de cada 80 mujeres desarrollan cáncer de pulmón (3). La tasa de supervivencia es de un 30% en el primer año y 10% a los 5 años (4)

La incidencia en España en el periodo 1978-1982 fue relativamente baja (menos de 60 por 100.000 habitantes); experimentó un crecimiento en los años 80. Como en la mayoría de los países del sur y del este de Europa, la incidencia de cáncer de pulmón entre hombres alcanzó su máximo a finales de los años 90, superando en 2008 los 60 casos por 100.000 habitantes (5,6).

En la actualidad, se estima que en nuestro país de los 162.000 pacientes diagnosticados de cáncer cada año, 18.800 presentan cáncer de pulmón (7).

Dicha relevancia se ha ido incrementando a lo largo del siglo XX de manera que al comienzo era una enfermedad poco frecuente, pero en la década de los años 50 aumentó su incidencia, encontrándose en los primeros estudios epidemiológicos realizados al respecto una relación entre el consumo de tabaco y el desarrollo de cáncer de pulmón (8).

La curva de incidencia es ascendente aunque dicho incremento se ha ralentizado en los últimos años. Así en el conjunto de la población el incremento por año es del 0,5%, siendo la frecuencia urbana mayor que en la población rural, y respecto al sexo de dos a seis veces más frecuente en los varones que en las mujeres (9).

A pesar de los avances en las nuevas estrategias terapéuticas (gracias a la introducción de las técnicas de anestesia actuales en la década de los 50) y diagnósticas, los porcentajes de supervivencia totales en estos pacientes oscilan entre el 10 y el 15%, sin diferencias importantes en los últimos años. Las tasas de mortalidad en Estados Unidos por 100.000 habitantes ajustadas a la población mundial se encuentran alrededor del 53,2 para los hombres y del 27,2 para las mujeres. En los demás países del mundo las tasas son muy variables. En España, las tasas en el año 1997 eran del 58,6 para varones y del 6,4 para mujeres (10).

El pronóstico del cáncer de pulmón está directamente relacionado con el estadio en el momento del diagnóstico. Se han establecido una serie de pruebas de detección selectiva en individuos de alto riesgo (varones de más de 45 años que fuman 40 cigarrillos o más al día), que consisten en citología de esputo y radiografía de tórax cada 4 meses. El cáncer se detecta en el 72% de los casos sólo con radiografía de tórax, el 20% sólo con citología y el 6% con ambos métodos. En contraste con los individuos no

sometidos a estas técnicas de detección, el 90% de los pacientes seguidos de esta forma y que presentan cáncer son asintomáticos, el 62% tiene tumores resecables y el 53% corresponden a estadio I después de la cirugía. Sin embargo, en estudios prospectivos aleatorios y multiinstitucionales no se han demostrado diferencias entre la supervivencia de los sometidos a estas pruebas de detección y la de los que no lo fueron. Esto se debe a la presencia de metástasis clínicamente silentes en la mayoría de los enfermos, incluso cuando los tumores son detectados en estadios muy precoces. Por esta razón, las técnicas de detección precoz del cáncer de pulmón han fracasado y se ha abandonado su utilización (11).

2. ETIOPATOGENESIS.

El consumo de tabaco es el principal factor ambiental relacionado con el desarrollo del carcinoma pulmonar, encontrándose un incremento del riesgo dosis-dependiente para cualquier tipo histológico (9). Se encuentra además una asociación estadística entre la frecuencia del cáncer de pulmón, la cantidad diaria de tabaco consumido, la tendencia a inhalar el humo y el tiempo del hábito de fumar (12-14). Se aprecian sin embargo variaciones en cuanto al subtipo histológico entre fumadores y no fumadores, siendo el carcinoma epidermoide y el microcítico los que muestran mayor asociación con el consumo de tabaco, como se resume en la siguiente tabla:

Subtipo histológico	Fumadores (%)	No fumadores (%)
Carcinoma epidermoide	98	2
Adenocarcinoma	81,6	18,4
Carcinoma bronquioloalveolar (adenoCA in situ (lepídico))	70,6	29,4
Carcinoma microcítico	98,9	1,1
Carcinoma celula grande (NSCLC NOS)	93,3	6,7

En cambio no todos los fumadores desarrollan la enfermedad, menos del 20%, lo que indica la existencia de otros factores añadidos en dicha génesis.

La exposición a asbesto es también una causa del carcinoma pulmonar, siendo responsable de entre 4 y 6000 muertes al año, si bien esa cifra supone únicamente el 5% de la mortalidad **(9)**. La relación es dosis-dependiente en cuanto a la génesis, pero no en cuanto al subtipo histológico.

Es también un cofactor que multiplica su efecto carcinogénico al asociarse con el consumo tabáquico, de forma que el asbesto aislado multiplica por seis el riesgo, el consumo de cigarrillos aislado por 11, mientras que la exposición conjunta eleva este riesgo 59 veces **(15)**.

También son conocidas otras causas como la exposición a radiaciones ionizantes, dieta, nitrosaminas, cicatrices pulmonares, displasia epitelial alveolar, carcinomas broncogénicos previos **(13,14)**.

3. CLASIFICACION HISTOLOGICA.

Desde el punto de vista del manejo terapéutico se contemplan dos grandes grupos dentro del carcinoma de pulmón: el carcinoma microcítico y el carcinoma no microcítico. En este segundo grupo se incluyen tres tipos que suponen más del 80% de los tumores pulmonares malignos: el carcinoma epidermoide, el adenocarcinoma y el carcinoma de células grandes (carcinoma pulmonar no microcítico sin diferenciación específica) (2). Menos del 5% del total lo comprenden otras variantes infrecuentes de carcinoma no microcítico (adenoescamoso, rabdoide, papilar, pleomórfico... etc) y tumores no epiteliales. Estos últimos no están incluidos en nuestro estudio.

Se observan variaciones en la incidencia de los diferentes tipos histológicos. Así el adenocarcinoma es más frecuente en las mujeres y en grupos de edad más joven. El epidermoide en cambio se encuentra con mayor frecuencia en el sexo masculino y entre edades más avanzadas. Existen también diferencias geográficas, con una prevalencia mayor en países industrializados (EEUU y Europa) (9).

El carcinoma de células grandes es por definición un tumor indiferenciado en el que no se encuentran características específicas, desde el punto de vista de la microscopía óptica, de carcinoma escamoso ni de adenocarcinoma. Es por tanto un diagnóstico de exclusión. Es el menos frecuente y ha ido disminuyendo debido a que gracias a las técnicas de microscopía electrónica, en épocas anteriores, y sobre todo de inmunohistoquímica, muchos de estos tumores, han sido reclasificados como adenocarcinomas o carcinomas epidermoides poco diferenciados, sobre todo en casos en que el material inicial era escaso o el muestreo no resultaba suficientemente amplio. En casos dudosos el estudio inmunohistoquímico es útil ya que la positividad para TTF-1 se observa en adenocarcinomas y no en epidermoides o carcinomas de célula grande, y

la de p63 se encuentra en carcinomas escamosos y no en los otros dos tipos histológicos (16).

Recientemente la International Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society, and European Respiratory Society ha propuesto una nueva clasificación internacional multidisciplinaria de adenocarcinomas en la que no se incluyen solamente criterios histopatológicos sino que también se incluye la radiología, biología molecular, oncología y cirugía, atendiendo a las nuevas necesidades de determinaciones moleculares con fines terapéuticos (17). Elimina el carcinoma bronquioloalveolar como entidad, ya muy restringido conceptualmente en la clasificación de la OMS del 2004 (2), divide los adenocarcinomas en preinvasivos (adenocarcinoma in situ), mínimamente invasivos e invasivos, con diferentes formas y variantes dentro de cada grupo, y propone eliminar el término de carcinoma indiferenciado de célula grande sustituyéndolo por el de carcinoma pulmonar no microcítico sin diferenciación específica (17). Habrá que esperar para ver si es aceptada por la comunidad médica o en qué medida es incluida en clasificaciones más universales como la de la OMS.

Lesiones preneoplásicas

Al igual que en muchas otras neoplasias epiteliales, existen un grupo de lesiones preneoplásicas precursoras del carcinoma pulmonar, principalmente en el epitelio bronquial. Clásicamente sólo se consideraban dichas lesiones en el carcinoma epidermoide, incluyendo la hiperplasia, la metaplasia escamosa, la displasia y el carcinoma in situ. Suelen ser extensas y frecuentemente multifocales, debido a que aparecen dentro del fenómeno de “cancerización de campo” (field effect). En cambio la

última clasificación de la OMS incluye lesiones preneoplásicas asociadas al adenocarcinoma como la hiperplasia adenomatosa atípica alveolar, el adenocarcinoma in situ y otras en relación con tumores neuroendocrinos como la hiperplasia idiopática difusa de células neuroendocrinas (2,18) o el adenocarcinoma in situ en la reciente Clasificación Internacional (17).

Desde el punto de vista del comportamiento clínico, los adenocarcinomas son más agresivos, recidivan con mayor frecuencia y se presentan en estadios más avanzados, comparados con los epidermoides. Si embargo la supervivencia es similar en ambos grupos.

Estas diferencias, tanto en el tipo de población afecta como en el comportamiento clínico, las diferentes lesiones preneoplásicas y su distinta morfología, hacen pensar en vías patogénicas diversas, a pesar de estar incluidos en el mismo grupo y separados del carcinoma microcítico. En conjunto muestran mejor pronóstico y diferente respuesta al tratamiento que el de célula pequeña.

II. BIOLOGIA MOLECULAR DEL CANCER DE PULMON

Gracias a la tecnología molecular, ampliamente desarrollada en las últimas décadas, se han podido identificar numerosas alteraciones genéticas en el cáncer de pulmón, contribuyendo así a la comprensión y caracterización de su patogenia. Estos descubrimientos tienen su aplicación práctica en métodos de diagnóstico precoz en un futuro inmediato, estrategias de prevención y nuevos tratamientos basados en el restablecimiento de las lesiones genéticas o terapias selectivas dirigidas a aquellas células tumorales que muestran una alteración específica.

Se ha intentado encontrar un modelo de carcinogénesis, sin embargo, aún no está claro el papel exacto de estas alteraciones genéticas en los mecanismos de génesis y progresión tumoral **(18)**. El hecho de que existan tumores con varias formas histológicas diferentes combinadas en la misma neoplasia, sugiere que todos los tipos histológicos puedan originarse a partir de una misma célula madre **(19)**. Sin embargo, el comportamiento diferente de cada subtipo hace necesario estudiar los factores implicados a fin de disminuir en lo posible su incidencia y mortalidad.

En otro aspecto el cáncer de pulmón puede ser considerado como una enfermedad del ciclo celular **(20)**, cuya alteración podría ser en unos casos el factor inicial desencadenante de la malignización de la célula, o en otros el factor contribuyente que altera la progresión del tumor en estadios más avanzados. Los genes que contribuyen al desarrollo del carcinoma de pulmón serían tanto oncogenes como genes supresores, reguladores de forma directa o indirecta del ciclo celular.

Tanto las deleciones como las pérdidas de heterozigosidad son dos mecanismos genéticos importantes en el desarrollo de tumores. En el cáncer de pulmón dichas alteraciones se producen frecuentemente en el brazo corto del cromosoma 3, región que es conocida por la alta frecuencia de alteraciones en diferentes tumores. En el 98% de carcinomas de pulmón y en el 78% de lesiones preneoplásicas se observa pérdida de heterozigosidad **(21,22)** o lesiones homocigotas **(12)** en esa zona. Se han encontrado 5 regiones en las que se produce la deleción, tres en 3p21, una en 3p12-13 y otra en 3p14.2 **(23)**. Entre los posibles candidatos a genes supresores en 3p están el protooncogen c-RAF-1, el gen receptor del ácido retinoico, el gen de la fosfatasa-gamma de la tirosina (PTP-gamma) **(23)** y el gen FHIT (Fragile Histidin Triad) **(24)**.

Los oncogenes codifican proteínas relacionadas con el crecimiento celular y su control, imprescindibles en las células no tumorales. Cuando uno de los alelos se altera como consecuencia de una mutación u otro mecanismo, se pueden provocar cambios en la vía metabólica y por tanto en los mecanismos normales de proliferación, produciéndose el desarrollo de un clon tumoral independiente que escapa a los sistemas habituales de regulación.

En el carcinoma de pulmón se han detectado alteraciones en la familia de los proto-oncogenes Myc (C-Myc, N-Myc y L-Myc). Las alteraciones en N-Myc y L-Myc se describen en el carcinoma microcítico, pero el que se altera más frecuentemente es el C-Myc, tanto en carcinomas microcíticos como no microcíticos **(12,25)**. Esta alteración de C-Myc según algunos autores va asociada a mayor agresividad y peor pronóstico. Se observa con más frecuencia en pacientes tratados y en metástasis, que en tumores primarios no tratados, por lo que corresponde a un factor pronóstico tardío, que provoca un peor comportamiento con el desarrollo de metástasis y recidiva tumoral **(26)**.

También se encuentran alteraciones en proto-oncogenes de la familia Ras (K-Ras, H-Ras, N-Ras): de K-Ras entre el 15 y 20% de carcinomas no microcíticos, más frecuentemente en adenocarcinomas (20-30%) (12). La capacidad oncogénica de dicha mutación parece estar asociada con el tabaco y no está clara su importancia pronóstica, aunque algunos autores encuentran peor pronóstico en los casos de mutación **(27,28)**. Está relacionada con la activación de la vía de la PI3K/Akt kinasa y la inhibición de la apoptosis **(29-31)**.

Otros oncogenes implicados en el cáncer de pulmón son el Bcl-2 (18q21), relacionado con la inhibición de la apoptosis **(32)**, sobreexpresado más frecuentemente en el carcinoma microcítico (75-95%) y entre el 10 y el 46% de carcinomas no microcíticos, sobre todo el epidermoide **(33-35)**; la ciclina-D1 (11q13), implicada en la regulación del ciclo celular en el punto de restricción G1 (25-47% de no microcíticos) **(36)**; y el C-MOS (8q11-12), inhibidor de la vía proteín-quinasa activadora de mitógenos. No se ha demostrado que ninguno de estos tenga relación clara con factores pronósticos o de supervivencia.

En la siguiente tabla se resumen las principales alteraciones genéticas descritas en el cancer de pulmón.

Tipo de alteración	Microcítico	No microcítico
Mutaciones en Ras	<1%	15-30%
Amplificación de Myc	15-30%	80%
Sobreexpresión bcl-2	75-95%	10-35%
Mutación p53	75-100%	50%
Expresión anormal p53	40-70%	40-60%
Baja o ausente expresión de Rb	>90%	15-30%
Mutación p16	<1%	10-40%
Ausencia expresión p16	0-10%	30-70%
Pérdida heterocigosidad 3p	90-100%	90%
Perdida heterocigosidad 4p/q	50-80%	20-30%
Actividad telomerasa	100%	80-85%
Inestabilidad microsatelites	35%	22%
Sobreexpresión HER 2- neu	<1%	35%

Algunos autores han realizado estudios de perfiles de expresión génica usando matrices (microarrays) de ADN con las que se pueden valorar un elevado número de genes con el fin de encontrar un número asequible de ellos, denominados genes candidatos, que demuestren relación con la génesis tumoral u otros parámetros clínicos y pronósticos que puedan ser útiles para determinar el curso tumoral e incluso pueden

ser usados como dianas para el desarrollo de nuevas terapias. Una vez encontrados dichos genes pueden ser estudiados de forma más amplia y rentable usando la técnica de RT-PCR (37).

Dichos estudios de perfiles de expresión de genes usando matrices (38,39) o PCR (40,41) permiten además estimar con seguridad el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón (42-45). Así la presencia de los genes DUSP6, MMD, STAT1, ERBB3, y LCK está asociada con riesgo aumentado de recurrencia y disminución de supervivencia y podría ser útil para clasificar a los pacientes según el riesgo en ensayos de tratamiento adyuvante y para seleccionar terapias. (37,40). Otro grupo encontró 82 probes relacionados con recaída en adenocarcinoma (46).

También se ha encontrado que mutaciones o expresión aberrante de microARNs, que son reguladores negativos posttranscripcionales de la expresión génica, están asociados con cáncer, incluyendo el pulmonar. Pueden actuar como oncogenes o genes supresores. Su patrón de expresión puede clasificar diferentes tipos tumorales incluso de forma más segura que las matrices de ADN referidas en el párrafo anterior. En pulmón se han encontrado 69 miARNs expresados en la carcinogénesis bronquial desde los estadios más iniciales, por lo que podrían usarse para detección precoz. Se expresan de forma diferencial en carcinomas de alto y bajo grado (47).

Los fenómenos epigenéticos han mostrado su influencia en la biología tumoral. Así se ha demostrado que la metilación en 14-3-3 σ , un gen responsable del control del checkpoint G2-M en respuesta al daño del ADN. Un 34% de casos de CAs de célula no pequeña de pulmón en estadio avanzado presentan esa metilación en 14-3-3 σ que los hace más sensibles a doxorrubicina y cisplatino con gemcitabina, mostrando mayor supervivencia con dicho tratamiento. Es por tanto un factor pronóstico independiente

para la supervivencia **(48)**. Otras aberraciones epigenéticas encontradas en carcinoma pulmonar son hipermetilación de p16ink4a, DAPK y RASSF1A, hipometilación genómica global y deleciones genómicas de CBP y del factor remodelador de cromatina BRG1 **(49-51)**.

Una de las mayores novedades de los últimos años es el empleo de inhibidores de la tirosin-quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-TKI) en el tratamiento de carcinoma pulmonar no microcítico avanzado y metastático, en aquellos casos en que muestran mutación de EGFR, en lugar del tratamiento convencional **(52,53)**. Se obtiene mejor progresión libre de enfermedad pero no mejora la supervivencia global, no encontrándose beneficio como terapia de primera línea **(54)**. Dicha mutación se correlaciona clínicamente con mujeres no fumadoras y con adenocarcinoma, siendo más frecuente en pacientes asiáticos. Otro tratamiento novedoso en lo que se refiere a EGFR es el uso de anticuerpos monoclonales para el bloqueo del receptor de crecimiento EGFR añadido al tratamiento convencional pero con beneficio de pequeña magnitud acompañado de toxicidad severa y coste elevado **(55,56)**.

En esta misma línea otros candidatos para dianas terapéuticas en los que también se han desarrollado tratamientos con inhibidores de tirosin quinasa y/o anticuerpos monoclonales son el receptor del factor de crecimiento de tipo insulina (insulin-like) (IGFR): IGF-1 e IGF-2 y su receptor IGF-1R que están sobreexpresados en carcinoma pulmonar no microcítico **(57)** acompañándose de peor pronóstico **(58,59)**; el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) con valor pronóstico negativo de su aumento de expresión demostrado en la mayoría de los estudios realizados **(60,61)**; quinasa del linfoma anaplásico (ALK) en casos positivos asociados con inversión del

cromosoma 2 inv(2)(p21;p23) conduciendo a la fusión EML4-ALK que se produce en un 13% de carcinomas pulmonares no microcíticos (62,63).

Algunos de estos resultados terapéuticos y de expresión o alteración molecular son más frecuentes en un tipo histológico que en otro. Además de los arriba referidos el adenocarcinoma y el de célula grande responden mejor que el escamoso a pemetrexed (64) y el bevacizumab se encuentra contraindicado en carcinomas escamosos (65). Por tanto la selección de la terapia se hace en base a la histología tumoral por lo que ya no es suficiente un diagnóstico general de carcinoma pulmonar no microcítico. Por esto en casos poco claros desde el punto de vista histológico el uso de anticuerpos para TTF-1 y p63 en el estudio inmunohistoquímico puede resultar esclarecedor como ha quedado referido anteriormente (16).

III. FACTORES PRONOSTICOS EN EL CARCINOMA DE PULMON.

Entre los factores pronósticos del carcinoma de pulmón encontramos algunos clásicos, bien establecidos, y otros de menor importancia y cuyo valor no es aceptado en todos los estudios. Dado que la tasa de recurrencia tumoral tras resección quirúrgica se encuentra entre el 20% y el 85%, en función del estadio, encontrar nuevos parámetros pronósticos que permitan predecir la recidiva o progresión de la enfermedad es clínicamente relevante (66).

Dentro del carcinoma no microcítico el estadio y los parámetros que lo definen (T: tamaño tumoral, N: extensión de afectación ganglionar, M: metástasis a distancia) son los factores pronósticos de mayor importancia y más firmemente establecidos (67,68). La demostración de diferente supervivencia dentro de cada estadio o parámetro TNM

induce a buscar otras características añadidas que permitan determinar y predecir dichas diferencias.

Entre dichos parámetros se encuentran también alteraciones genéticas y moleculares. Su determinación se realiza gracias a técnicas inmunohistoquímicas o de biología molecular y están comentadas en el apartado II.

IV. FACTORES HISTOLOGICOS

Con respecto a la implicación pronóstica de factores puramente histológicos se han estudiado varios de ellos pero con unos resultados no concluyentes, no tan claros ni universalmente reconocidos como los anteriormente citados de estadificación tumoral y ganglionar. En general son conflictivos desde el punto de vista de cada factor aislado y algunos que son significativos en unos artículos no conservan dicha significación en otros estudios.

El tipo histológico tumoral no es significativo en la mayoría de estudios (69), pero en otros sí encuentran diferencias, en general con mayor supervivencia en los escamosos (70), o peor supervivencia en los no escamosos (71,72). En lo que están de acuerdo la práctica totalidad de autores es en el mejor pronóstico para el carcinoma broquioloalveolar (73,74).

Tampoco el grado histológico tiene significación en la mayoría de trabajos (72), aunque algunos la encuentran para los adenocarcinomas (75) o incluyendo todos los tipos tumorales (76).

El patrón invasivo en la periferia tumoral confiere peor pronóstico que la buena delimitación tumoral (77), pero el crecimiento de una luz alveolar a otra sin destrucción

tisular es signo de buen pronóstico; otros no encuentran esas diferencias (78) y patrones como el atrapamiento alveolar en el que las luces de los alveolos normales quedan incluidas en el seno de los nidos tumorales han sido menos estudiados.

La necrosis en general conlleva peor pronóstico, sobre todo cuando es extensa (79), pero otros no encuentran esa diferencia (72). A la apoptosis en cambio se le ha encontrado un carácter favorable en epidermoides (70).

La presencia de cicatriz en el centro del tumor es un hecho bien conocido y estudiado. Si es menor de 0,5 cm en adenocarcinomas menores de 3 cm, se acompaña de supervivencia de casi el 100% (75), empeorando el pronóstico al aumentar el tamaño y sobre todo si se acompaña de desmoplasia (75,80) que es sinónimo de mayor tiempo de depósito de colágeno y por tanto un tiempo de evolución más largo. Otras características generales del estroma tumoral han sido menos estudiadas pero parecen no tener influencia pronóstica, al menos en cuanto a su ausencia o presencia (78).

Entre los factores pronósticos histológicos más constantes están la invasión vascular, tanto linfática (79) como venosa (72) o incluso arterial (76), esta menos frecuente y menos estudiada, que son signos de pronóstico tumoral negativo, como también lo es el contaje mitótico (75), aunque otros estudios no encuentran esa asociación (78,81).

Algunas variedades histológicas, aunque suponen un porcentaje bajo dentro del total de carcinomas pulmonares, también se asocian con curso clínico más agresivo como son el adenocarcinoma con patrón micropapilar, el carcinoma pleomórfico, de células gigantes, de células fusiformes o con diferenciación rabdoide.

V. EXPRESIÓN DEL ANTIGENO DEL GRUPO SANGUÍNEO A.

Los determinantes de grupos sanguíneos ABH y antígenos relacionados son estructuras oligosacáridas carbohidratadas presentes normalmente en glicoproteínas y glicolípidos animales. Aunque reciben dicha denominación porque fueron descubiertos en células hemáticas y se pensaba que eran exclusivos y específicos de ellas, en realidad están ampliamente distribuidos en tejidos humanos y animales, especialmente epiteliales y en sus secreciones, de forma que las secreciones epiteliales son la principal fuente corporal de antígenos de grupo sanguíneo **(82)**. Todas las células epiteliales respiratorias normales revistiendo bronquios, glándulas o sacos alveolares pueden expresar antígenos de grupo sanguíneo de tipo ABH y Le, excepto las células serosas de las glándulas bronquiales **(83,84)**, observándose un gradiente de disminución desde las vías bronquiales centrales hacia la periferia, mostrando positividad los neumocitos tipo II únicamente en zonas de hiperplasia.

En general son estructuras complejas con cuatro tipos principales de cadenas oligosacáridas **(85)**. Sobre estas cadenas se añaden diferentes tipos de azúcares en diversas posiciones, mediados por varios tipos de transferasas específicas cuya regulación está determinada por cuatro genes codificados en el cromosoma 9 **(86,87)**. Esta expresión varía a lo largo del desarrollo embrionario y la diferenciación **(82,87,88)**), así como en los diferentes órganos e incluso dentro de estos es diferente según la localización o estructura anatómica **(89,90)**.

En unos procesos complejos es de esperar que los cambios que se producen a lo largo de la carcinogénesis también lo sean. Estos se resumen en 4 categorías **(91)**: 1.- disminución de la actividad de transferasas con la consiguiente acumulación de precursores o desviación de la vía enzimática con expresión paradójica o de antígenos

poco frecuentes **(83,92)**. 2.- Activación de transferasas previamente suprimidas con reexpresión de antígenos presentes en tejidos fetales y embrionarios **(93)**. 3.- Alteración de la expresión de diferentes series. 4.- Cambios en las proteínas y lípidos unidos a membrana que llevan el antígeno de grupo sanguíneo inmunodeterminante.

En metaplasia escamosa e hiperplasia alveolar se observa una disminución de expresividad antigénica al aumentar la atipia celular, tanto en intensidad como en porcentaje celular **(84)**.

En numerosos estudios se ha tratado de correlacionar la pérdida de expresión de los histoantígenos de grupos sanguíneos A, B y H con una mayor agresividad de los tumores (asociada con mayor invasividad y potencial metastásico), o con el hecho de que en su desarrollo biológico acumulen cada vez más aberraciones. En carcinomas pulmonares se ha observado pérdida o disminución de determinantes ABH **(94)**, delección antigénica con expresión de grupos incompatibles **(83,84)** y acumulación de precursores **(83)** como el antígeno I, no presente en células normales.

Fue en el cáncer gástrico en el primero que se describió la reducción y pérdida de epitopos de histoantígenos de grupo A o B **(95)**.

Posteriormente se demostró que la capacidad de invasión y metástasis en tumores pulmonares y de cérvix uterino estaban relacionadas con el grado de delección de los antígenos de grupo A y B **(94,96)**. En el cáncer de pulmón la pérdida de expresión de grupo A (no así en el grupo B) se asocia con una menor supervivencia **(97)**, siendo

dicha pérdida un marcador predictivo negativo de supervivencia en carcinomas no microcíticos (98).

Por otra parte la pérdida de expresión de histoantígenos de grupo A se puede relacionar con la acumulación de aberraciones fenotípicas sucesivas según progresa el tumor, al igual que ocurre en estadios avanzados o tumores de mayor tamaño en los que aparecen subclones más agresivos que favorecen la progresión tumoral, frecuentemente con expresión de otros marcadores como los neuroendocrinos (99).

Sin embargo en algunos artículos (100,101), no encuentran relación de la pérdida o disminución de la expresión con supervivencia, agresividad tumoral ni capacidad metastásica.

VI. FISIOPATOLOGÍA DEL SISTEMA DE PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO.

Ante diferentes agresiones el organismo reacciona con cambios complejos encaminados a neutralizar la acción del agente y la progresión de la lesión, bloquear el agente que la ha producido y desencadenar los procesos reparativos que se necesiten para establecer el equilibrio inicial.

La respuesta a nivel celular está orientada en un doble aspecto: la protección del acervo genético, reparando los nucleótidos alterados, y la protección de la estructura proteica de la célula.

Las proteínas de choque térmico (Hsp) o proteínas de respuesta a estrés (Srp), son una familia de proteínas que se encuentran en todas las células procariotas y eucariotas, con secuencias de aminoácidos similares a lo largo de la escala filogenética (102,103).

En condiciones fisiológicas tienen una función de colaboración molecular (chaperona) en los procesos de plegamiento y ensamblaje de las proteínas sintetizadas, transporte por los diferentes compartimentos celulares y degradación. Pero ante una situación de estrés las proteínas pueden desnaturalizarse. En estos casos aumentan los niveles de Hsp siendo capaces de reconocer las proteínas alteradas realizando su función en el plegamiento, o bien transportándolas a otros compartimentos celulares, o induciendo su degradación en los lisosomas, con la secreción o excreción de los productos proteicos **(104,105)**.

El primer estímulo descrito en el que se encontró un incremento en los niveles de Hsp fue realizado con exposición al calor, de ahí el nombre que reciben, lo que generaba la expresión de los genes específicos que las codifican **(106,107)**.

Posteriormente se ha encontrado que otras situaciones de estrés desencadenan una respuesta celular similar. Así por ejemplo agentes oxidantes, metales pesados, grupos sulfhidrido, arsenito sódico, algunos quimioterápicos o alcoholes **(108,109)**.

También se ha encontrado que las Hsp participan en la respuesta inmune como antígenos tumorales o transportadores de péptidos **(110,111)** y en estudios experimentales se ha comprobado que la exposición in vitro de células tumorales a una temperatura elevada aumenta la expresión de Hsp en superficie facilitando la lisis celular por células NK **(112)**.

También podrían ser alteradas durante la carcinogénesis y ser presentadas en superficie por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I

donde interaccionan con células T **(113,114)**. Incluso las propias Hsp podrían tener también por sí mismas esa función de presentadoras de antígenos **(115)**.

El patrón de expresión de las Hsp en células tumorales es diferente que en las normales, encontrándose niveles más elevados de estas proteínas, como Hsp70 y Hsp27 **(111,116)**.

Aunque no se conoce bien en detalle su papel en el cáncer, parece que son numerosas las funciones en las que intervienen **(111)**. Así parecen relacionadas con apoptosis ligada al oncogén c-myc, necrosis y factores TNF- α y β **(117,118)**, unión a proteína p53 mutante **(119,120)**, relación con productos proteicos de oncogenes y con la expresión de receptor de estrógenos **(121)**. Dichas funciones están ligadas a diferentes Hsp y también varía de unos tumores a otros.

Se ha encontrado que el tratamiento con agentes quimioterápicos puede aumentar el nivel de Hsp **(122)** y que, a su vez, este tratamiento induce termotolerancia **(123,124)**. Este aumento de nivel proteico se ha encontrado relacionado con diferentes fármacos como actinomicina D, colchicina, adriamicina, cisplatino, etopósido, vincristina, etc. Se ha especulado por tanto que la presencia de esta familia de proteínas podría estar relacionada con el desarrollo de resistencia a esos quimioterápicos. Sin embargo no todos los trabajos sostienen dicha relación **(125,126)**.

Por otra parte también han sido estudiadas como factores pronósticos, encontrándose que en general son factores que implican un peor pronóstico en aquellas neoplasias con

un nivel elevado de Hsp. En cambio otros grupos han encontrado un pronóstico más favorable asociado con esa expresión (127-129).

Por tanto dicha discrepancia aconseja la continuación de trabajos de investigación encaminados a discriminar factores pronósticos y otros relacionados con el tratamiento quimioterápico a fin de aclarar las diferentes contradicciones que existen entre los artículos.

VII. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN DEL PRESENTE ESTUDIO

Como hemos resumido en la introducción, a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento la mortalidad del carcinoma pulmonar sigue siendo muy elevada y la disminución de la tasa de mortalidad por esta neoplasia ha sido mínima. A pesar de la estadificación y la resección quirúrgica supuestamente sin enfermedad residual conocida en el momento de la cirugía, un 30% de los pacientes operados desarrollan recidiva o enfermedad a distancia.

Por tanto cualquier trabajo de investigación destinado a intentar estudiar dicho tumor, su comportamiento y evolución biológica y buscar parámetros que sirvan como factores pronósticos, que determinen líneas terapéuticas, o seleccionen los pacientes para uno u otro tratamiento, principalmente en estadios precoces en los que todavía es posible la acción terapéutica con fines curativos, está plenamente justificado.

En el presente trabajo estudiamos varios parámetros histológicos como son el tipo histológico, el grado de diferenciación tumoral, la cantidad de estroma, la presencia de cicatriz y necrosis y especialmente el atrapamiento alveolar en el seno del tumor y la

diseminación interalveolar en la periferia, correlacionándolo con la expresión de antígeno de grupo sanguíneo A y de proteínas de choque térmico Hsp27 y Hsp70, para intentar encontrar relación entre ellos, y estudiar si tienen influencia significativa en la supervivencia o se relacionan con la o estadificación TNM.

La alteración de la regulación y expresión proteica, como el antígeno de grupo sanguíneo A y de proteínas de choque térmico, está íntimamente relacionada con la regulación de expresión de dichas proteínas en diferentes procesos, entre los que está la oncogénesis y las diferentes alteraciones que se producen en la evolución tumoral a lo largo del desarrollo de las neoplasias. El estudio de la expresión proteica en toda esa evolución tumoral es interesante para comprender la malignidad de los tumores e intentar demostrar correlaciones con su pronóstico, evolución y tratamiento.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Estudiar en esta serie de carcinomas pulmonares no microcíticos la presencia y frecuencia de las siguientes características histológicas convencionales: (1) tipo histológico, (2) grado de diferenciación, (3) atrapamiento alveolar por la tumoración en su crecimiento, (3) gradación de la cantidad y extensión de dicho atrapamiento, (4) volumen de estroma en la zona de atrapamiento y en el resto de la tumoración, (5) presencia y cuantificación de necrosis tumoral, (6) presencia de cicatriz central o periférica, (7) presencia de diseminación tumoral interalveolar en la periferia.
2. Determinar en esta serie de carcinomas pulmonares no microcíticos la expresión de determinante antigénico del grupo sanguíneo A, mediante técnicas inmunohistoquímicas, intentando establecer la relación entre dicha expresión y el grupo sanguíneo del paciente: pérdida de dicho determinante en pacientes del grupo A o expresión aberrante en el resto de pacientes de un grupo sanguíneo diferente del A, y su correlación con los factores señalados en el apartado anterior.
3. Determinar en esta serie de carcinomas pulmonares no microcíticos la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp27 y Hsp70, mediante técnicas inmunohistoquímicas y su correlación con los factores señalados en los apartados anteriores.

4. Correlacionar en esta serie de carcinomas pulmonares no microcíticos las características estudiadas en los tres párrafos anteriores con factores pronósticos consolidados como estadificación T, N, M, supervivencia global y libre de enfermedad, intentando establecer la posible significación pronóstica de dichos parámetros, posibles factores pronósticos, tanto en la serie completa como, especialmente, en los tumores en estadio precoz (estadios I y II). Correlacionar, en análisis multivariante, también las diversas características entre sí, estudiando posibles relaciones de expresión fenotípica de las diferentes proteínas y los hallazgos histológicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MATERIAL.

1.1. CASOS DEL ESTUDIO.

La presente serie consta de 470 casos de carcinomas pulmonares no microcíticos, 310 casos de tumores pulmonares resecaos en el Hospital General Universitario Gregorio Marañón entre 1993 y el 2004 y 160 casos resecaos en el Hospital General de Vigo entre 1997 y el 2003.

Criterios de inclusión de los casos en la serie:

- Confirmación en el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica del diagnóstico tumoral de la lesión
- Distribución por estadios. El estudio de supervivencia es realizado en la serie completa y en los casos de estadios Ia, Ib, IIa y IIb (119, 202, 52 y 32 casos respectivamente), comparándose también los casos de los tipos histológicos más frecuentes (carcinomas escamosos y adenocarcinomas) y los de los restantes casos.
- Ausencia de tratamiento preoperatorio quimioterápico o radioterápico.

1.2. MUESTRAS DEL ESTUDIO.

Las muestras proceden de las piezas quirúrgicas estudiadas en los Departamentos de Anatomía Patológica de los respectivos hospitales. Los especímenes corresponden a neumonectomías (82), lobectomías (309), bilobectomías (15) o resecciones en cuña (64).

II. METODOS.

2.1. DATOS CLINICOS.

Los datos clínicos de los pacientes se obtuvieron revisando las historias clínicas buscando los parámetros: edad, sexo, antecedentes profesionales, principalmente en relación con cáncer pulmonar, antecedentes personales y enfermedades sistémicas. Se introducen prospectivamente los datos en la base de datos (Microsoft Access®). Esta base incluye también variables clínicas de los estudios de imagen (lateralidad y localización), del protocolo de intervención quirúrgica y del informe de Anatomía Patológica, de los resultados de las técnicas de inmunohistoquímica realizadas, de la evolución postoperatoria y del seguimiento en la consulta externa.

Seguimiento de los pacientes: Los pacientes son seguidos periódicamente en la consulta externa del Servicio de Cirugía de Tórax. En el primer año después de la intervención, se realiza seguimiento en el mes 1º, 3º, 6º, 9º y 12º, en el 2º y 3º año cada 6 meses y a partir del 4º año de forma anual. En cada revisión se realiza un interrogatorio enfocado a detectar recurrencias y signos o síntomas del aparato cardiorrespiratorio, un examen físico y se solicitan estudios analíticos, marcadores biológicos tumorales y estudios de imagen: radiografía de tórax en cada revisión y TAC tóraco-abdominal anual. El primer año se realiza una fibrobroncoscopia. Si aparecen síntomas se solicitan los estudios complementarios más adecuados (RMN, TAC craneal, ecografía, colonoscopia, etc...).

Mortalidad y recidiva: Se considera causa de muerte tumoral cuando se demuestra por autopsia o si el paciente fallece en el seno de una recidiva tumoral. Se recoge la fecha de muerte cuando esta se produce. La información se obtiene del informe del hospital, si el paciente fallece en un centro sanitario, o de los familiares, generalmente a través de una entrevista telefónica. Se considera recidiva locorregional o metástasis cuando los criterios clínicos, analíticos, radiológicos o histológicos o bien una combinación de ellos apoyan dicha afectación. Se anota la fecha de la metástasis o recidiva locorregional.

2.2. ESTADIO TUMORAL.

El estadio tumoral se determinó siguiendo el sistema TNM, propuesto por Mountain en 1986 y actualizado por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y el Comité

Americano sobre Cáncer (AJCC) en 2010. Los datos se obtuvieron de la pieza quirúrgica, completados con los estudios radiológicos para establecer el tamaño y extensión del tumor (T) y la afectación ganglionar (N). El estudio de las metástasis a distancia (M) se realiza mediante criterios clinico-radiológicos (TAC y ecografía sobre todo), con confirmación histológica cuando es posible. Los criterios de clasificación TNM y la clasificación por estadios se resumen en las siguientes tablas:

T_{IS}	carcinoma in situ
T1a	Tamaño < o igual 2 cm
T1b	Tamaño entre 2 y 3 cm
T2	Tamaño > 3 cm pero <7 cm y/o afectación de bronquio principal con distancia a carina > o igual a 2 cm y/o invasión de la pleura visceral y/o atelectasia parcial del parénquima no tumoral
T2a	>3cm pero<5 cm
T2b	>5cm pero <7cm
T3	>7cm y/o afectación de la pared torácica, diafragma, pericardio, pleura parietal, mediastínica, nervio frénico y/o bronquio principal a <2 cm de carina y/o atelectasia total de parénquima no tumoral y/o nódulo tumoral en el mismo lóbulo
T4	Afectación de mediastino y/o corazón, grandes vasos, carina, tráquea, nervio recurrente, esófago y/o vértebras. Presencia de nódulos tumorales separados en diferente lóbulo del mismo lado.
N0	Ausencia de metástasis ganglionares
N1	Metástasis en ganglios peribronquiales y/o hiliares ipsilaterales
N2	Metástasis en ganglios mediastínicos y/o subcarinales ipsilaterales
N3	Metástasis en ganglios mediastínicos, subcarinales contralaterales, escalenos y/o supraclaviculares
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Presencia de metástasis.
M1a	Nódulos tumorales contralaterales en uno o más lóbulos, nódulos pleurales, derrame pleural o pericárdico neoplásico.
M1b	Metástasis a distancia

Estadio 0		TIS	N0	M0
Estadio I	IA	T1	N0	M0
	IB	T2a	N0	M0
Estadio II	IIA	T2b	N0	M0
		T1	N1	M0
	T2a	N1	M0	
	IIB	T2b	N1	M0
		T3	N0	M0
Estadio III	IIIA	T1	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1,2	M0
		T4	N0,1	M0
	IIIB	Cualquier T	N3	M0
		T4	N2,3	M0
Estadio IV		Cualquier T	Cualquier N	M1a,b

2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

ESTUDIO Y PROCESADO MACROSCOPICO

Las neumonectomías y lobectomías se reciben en fresco. Se mide y se pesa la pieza. Se procede a la fijación de la pieza mediante insuflación intrabronquial de formol tamponado y se deja fijando 24 horas.

Se secciona la pieza, se mide la tumoración y se incluye totalmente en fragmentos de un tamaño máximo de 0,5x2x3 cm en los que se realiza el procesado histológico habitual. Incluyendo todo el tumor se consiguen dos objetivos:

- Estudio amplio de la neoplasia facilitando su diagnóstico y disminuyendo el porcentaje de casos de carcinomas indiferenciados de célula grande
- Seleccionar la zona más indicada para el estudio inmunohistoquímico

De los bloques de parafina se realizan cortes de 5 μ m de espesor y se montan en portas bañados en silano, guardándose toda la noche en estufa a 60°C. Se desparafinan con xileno (2x5 minutos) y se rehidratan utilizando alcoholes de graduación sucesiva (100%, 96% y 70% respectivamente) durante 5 minutos, y posteriormente se lavan en agua destilada 5 minutos. Finalmente se tiñen con hematoxilina-eosina.

2.4. ESTUDIO HISTOLOGICO.

Todas las preparaciones histológicas fueron revisadas por cuatro observadores al menos dos veces para confirmar el tipo histológico. Se clasificaron histológicamente de acuerdo a la última clasificación de la OMS, del año 2004.

Se seleccionaron para el estudio los adenocarcinomas y los carcinomas epidermoides, incluyéndose el resto de tipos histológicos en un grupo aparte como “otros” en algunas de las valoraciones (carcinomas bronquioloalveolares, carcinomas adenoescamosos, carcinomas indiferenciados de célula grande), mientras que en otras se contemplan como tipos histológicos específicos cada uno de ellos. Los casos se clasificaron según el componente más diferenciado. El grado de diferenciación se evaluó sólo en los 310 casos del Hospital Gregorio Marañón. Resumimos los criterios diagnósticos de los dos tipos histológicos básicos del estudio:

Carcinomas epidermoides: presencia de puentes intercelulares y formación de queratina. Se subclasificaron en bien, moderadamente y pobremente diferenciados siguiendo los criterios de la OMS. Si presentan abundante queratinización y numerosos puentes intercelulares se consideran bien diferenciados. Si dichas características se encuentran de forma aislada y en cantidad escasa se consideran pobremente diferenciados. Los moderadamente diferenciados muestran esas características en cantidad intermedia entre los dos tipos anteriores. Se identificaron además las siguientes variantes histológicas de carcinoma epidermoide: de célula pequeña, de células claras, mixto de célula pequeña y escamosa, y fusocelulares. Sólo si se encontraban áreas bien definidas de diferenciación glandular o de carcinoma anaplásico de célula pequeña eran

incluidos en el grupo de los tumores mixtos. Los carcinomas adenoescamosos (aquellos con componente glandular y escamoso, siempre que el menos predominante constituya más del 10% del tumor) se incluyeron en el grupo heterogéneo de “otros”.

Adenocarcinomas: constituyen un grupo heterogéneo de tumores. La OMS en su clasificación de 2004 reconoce 4 variedades:

- acinar (tubular)
- papilar
- bronquioloalveolar
- sólido

Todos los casos fueron clasificados según el componente más diferenciado observado en el conjunto de todas las secciones estudiadas de cada tumor.

Se dividieron en bien, moderada y pobremente diferenciados atendiendo a la regularidad arquitectural de las glándulas, la proporción de áreas sólidas, el grado de atipia citológica y la presencia o no de necrosis, así como su extensión:

Bien diferenciado: escasa necrosis y atipia, patrón arquitectural regular y predominantemente glandular con mínimas áreas de crecimiento sólido.

Moderadamente diferenciado: moderada atipia, áreas de necrosis, irregularidad arquitectural y presencia en numerosos focos de áreas de crecimiento sólido entre otras de predominio glandular.

Pobremente diferenciado: extensas áreas de necrosis, marcada atipia citológica y escasas áreas de componente glandular, de arquitectura muy irregular y con predominio de áreas sólidas.

Carcinomas de célula grande: carcinoma indiferenciado que carece de rasgos citológicos y arquitecturales de diferenciación glandular, escamosa o de carcinoma de célula pequeña.

Carcinomas adenoescamosos: carcinoma con componente de carcinoma epidermoide y adenocarcinoma, siempre que suponga más del 10% de la extensión tumoral cada uno de ellos.

2.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLOGICAS ESTUDIADAS

Se estudiaron en todos los tumores las siguientes características histológicas:

Atrapamiento alveolar

Se estudió la presencia de luces alveolares atrapadas dentro del tumor, tanto en el seno de los nidos tumorales como en el estroma que los separa. Dichas luces se distinguen por un revestimiento de células epiteliales cúbicas con núcleo sin atipia, monomorfo, ocasionalmente con nucleolo prominente. El citoplasma es claro o levemente eosinófilo. Forman luces redondeadas que destacan en el seno de los grupos tumorales. Se distinguen de estructuras glandulares tumorales por la ausencia de atipia celular y de mitosis, además de la uniformidad del tamaño y forma de los alveolos. Se valoró la presencia o ausencia de dichas luces alveolares y se subdividió de acuerdo con los siguientes criterios:

Gradación del atrapamiento:

El grado de atrapamiento de luces alveolares dentro de la tumoración se evaluó en tres grados:

- 1.- Escaso cuando sólo existen luces alveolares aisladas.
- 3.- Abundante si se encuentran numerosas luces alveolares atrapadas.
- 2.- moderado cantidad intermedia entre 1 y 3, fáciles de encontrar pero no tan numerosas como en el grado 3.

Extensión del atrapamiento:

La extensión del atrapamiento alveolar se evaluó en tres grupos:

- 1.- Limitada a la periferia de la tumoración, inmediatamente por dentro del límite entre el tumor y el tejido adyacente.
- 2.- Incluidos en un margen menor de 2mm [diámetro de un campo de 10 aumentos (objetivo de 10 aumentos y ocular de 10 aumentos)] en la periferia tumoral.
- 3.- Luces atrapadas a más de 2mm del límite de la neoplasia con el tejido no tumoral adyacente.

Estroma tumoral

Se valoró la cantidad de estroma entre los nidos tumorales en toda la extensión del tumor, considerándose:

- 1.- Escaso cuando los grupos tumorales están próximos entre sí con mínima cantidad de tejido conectivo rodeando los vasos.
- 2.- Abundante cuando es más amplio y visible, separando claramente los grupos tumorales.

Estroma en zonas de atrapamiento:

Se evaluó por separado la cantidad de estroma en las áreas de atrapamiento alveolar, con el fin de estudiar si existen diferencias con el estroma en el resto del tumor. Se evaluó de la misma forma que en la totalidad del tumor:

- 1.- Escaso cuando los grupos tumorales están próximos entre sí con mínima cantidad de tejido conectivo rodeando los vasos.
- 2.- Abundante cuando es más amplio y visible, separando claramente los grupos tumorales.

Necrosis

Se estudió la necrosis tumoral, evaluándose de 0 a 3:

0: ausencia de necrosis

1: Escasa, limitada al centro de algunos nidos tumorales

2: moderada, más amplia que en el grado 1 pero no afectando nidos tumorales completos y sin fusión entre zonas de necrosis de nidos tumorales adyacentes.

3: Amplias zonas de necrosis afectando nidos tumorales completos y/o con fusión entre grupos tumorales adyacentes.

Diseminación interalveolar

Se valoró la forma de diseminación interalveolar de las células tumorales en la periferia (en 345 casos) cuando afectan a los alveolos adyacentes sin destrucción de la pared alveolar, a través de los poros de Cohn (1), o la ausencia de esa diseminación (2). Dichas luces se identifican como alveolares cuando se encuentra claramente un revestimiento por neumocitos y/o cuando en la luz se encuentran macrófagos alveolares.

Cicatriz

Cicatriz de tejido fibroconectivo sin tumor, con contorno irregularmente estrellado que suele provocar una disposición radial de las estructuras pulmonares adyacentes pareciendo retraerlas. Puede tener localización central si está situada en el centro del tumor o excéntrica si no ocupa esa posición. Se valoró su presencia (+) o ausencia (-).

2.6. TECNICAS INMUNOHISTOQUIMICAS Y ANTICUERPOS UTILIZADOS

El procesamiento inicial es el mismo que el realizado para la tinción de hematoxilina-eosina arriba descrito.

Para algunos anticuerpos se usa un tratamiento enzimático de recuperación antigénica con proteinasa K durante 10 minutos. Para otros, dicha recuperación se realiza con un tratamiento térmico introduciendo los portaobjetos con los cortes histológicos en una solución de citrato trisódico 0,01 M a pH 6,00 y calentándolos en olla a presión. Cuando se comenten los anticuerpos se especifica qué método se ha empleado en cada uno de ellos. A continuación se incuban con los distintos anticuerpos primarios a una concentración previamente determinada, utilizándose para la detección del anticuerpo primario el sistema ABC o el B-SA. Finalmente se revela con diaminobenzidina.

En todos los tumores se realiza un panel de anticuerpos que incluye:

Antígeno de grupo sanguíneo A (BG-2,A. Cadenas tipo 1 y 2).

El BG-2 pertenece a una serie de anticuerpos monoclonales que detectan las especificidades de grupo del sistema ABH. Los antígenos relacionados con el grupo sanguíneo representan un grupo de determinantes tipo carbohidrato que poseen tanto los glicolípidos como las glicoproteínas. Generalmente suelen ser tipo mucina y son detectables en eritrocitos, algunas células epiteliales y en determinados productos de secreción.

Utilizamos el clon T36 con especificidad para las cadenas 1 y 2 del grupo sanguíneo A (DAKO. California, EEUU). Se usó con una dilución de 1/60 e incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente tras tratamiento enzimático. El control positivo recomendado es el riñón normal o el uréter.

Estudio de proteínas de choque térmico.

Hsp27. Para su estudio se utiliza el anticuerpo monoclonal de hibridoma de ratón, clon G3.1 (BioGenex, San Ramon, CA 94583). Formato prediluido.

El control positivo es el carcinoma de mama. El patrón de tinción es citoplasmático.

Se utilizó la técnica de desenmascaramiento antigénico en olla a presión con buffer citrato a pH 6.0.

Reacciona específicamente frente a la proteína de choque térmico Hsp27, de 27 kD. Esta técnica se realizó únicamente en 390 casos.

Hsp70. Para su estudio se utiliza un anticuerpo monoclonal de hibridoma de ratón, clon BRM-22 (Laboratorios BioGenex, San Ramon, CA). Formato prediluido.

El control positivo es el carcinoma de mama. El patrón de tinción es citoplásmico.

Se utilizó la técnica de desenmascaramiento antigénico de alta temperatura, con buffer citrato a pH 6.0.

Este anticuerpo es específico para la familia HSP70. Reconoce la forma constitutiva (Hsp73) y la forma inducible (Hsp72) de la familia HSP70. Reacciona frente a la Hsp70 de los tejidos humanos, de conejo, bovinos, de cerdo y de ratón.

TTF1.

Factor de transcripción tiroideo 1, que es un factor de transcripción nuclear relacionado con la diferenciación tiroidea y pulmonar. Se utilizó el anticuerpo monoclonal clon 8G7G3/1 (DAKO, Glostrup, Denmark) con una dilución de 1/50 y desenmascaramiento antigénico en olla a presión con buffer citrato a pH 6.0.

Se empleó en 25 casos para comprobar el atrapamiento alveolar en el interior de las neoplasias, pues dichas células normales muestran expresión de TTF1. Como control normal se utilizó tiroides o pulmón.

Anticuerpos utilizados en el estudio de los carcinomas pulmonares.

Anticuerpo	Policlonal (P) / Monoclonal (M)	Clon	Casa Comercial	Dilución
Ag grupo A	M	T36	DAKO, California	1:60
Hsp27	M	G3.1	BioGenex, San Ramon, CA	Prediluido
Hsp70	M	BRM-22	BioGenex, San Ramon, CA	Prediluido
TTF1	M	8G7G3/1	DAKO, Glostrup, Denmark	1:50

VALORACIÓN DE LAS TÉCNICAS.

Las técnicas se valoran en función de la intensidad de la positividad y del porcentaje de células positivas, de la siguiente forma:

INTENSIDAD	DEBIL	MODERADA	INTENSA
VALOR	+	++	+++

PORCENTAJE	1-25%	26-50%	51-75%	76-100%
VALOR	1	2	3	4

En el caso del antígeno de grupo sanguíneo se valora también la expresión de este marcador en los tejidos pulmonares normales, tanto alveolos como endotelio y hematíes, sirviendo de control interno.

2.7. ANALISIS ESTADÍSTICO.

Todos los datos se introdujeron en una base de datos. El análisis estadístico se realizó utilizando la aplicación SPSS para Windows (v 15.0).

La asociación entre variables cualitativas se estudió mediante test de contingencia (chi cuadrado de Pearson). Como test de comparaciones múltiples se utilizó la regresión de Cox.

El análisis de supervivencia se realizó mediante las curvas de Kaplan-Meier, y se utilizó la prueba de Mantel-Cox (Log-Rank).

En todas las pruebas el límite del valor de p para establecer relaciones estadísticamente significativas es menor a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

I. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA TOTALIDAD DE LA SERIE.

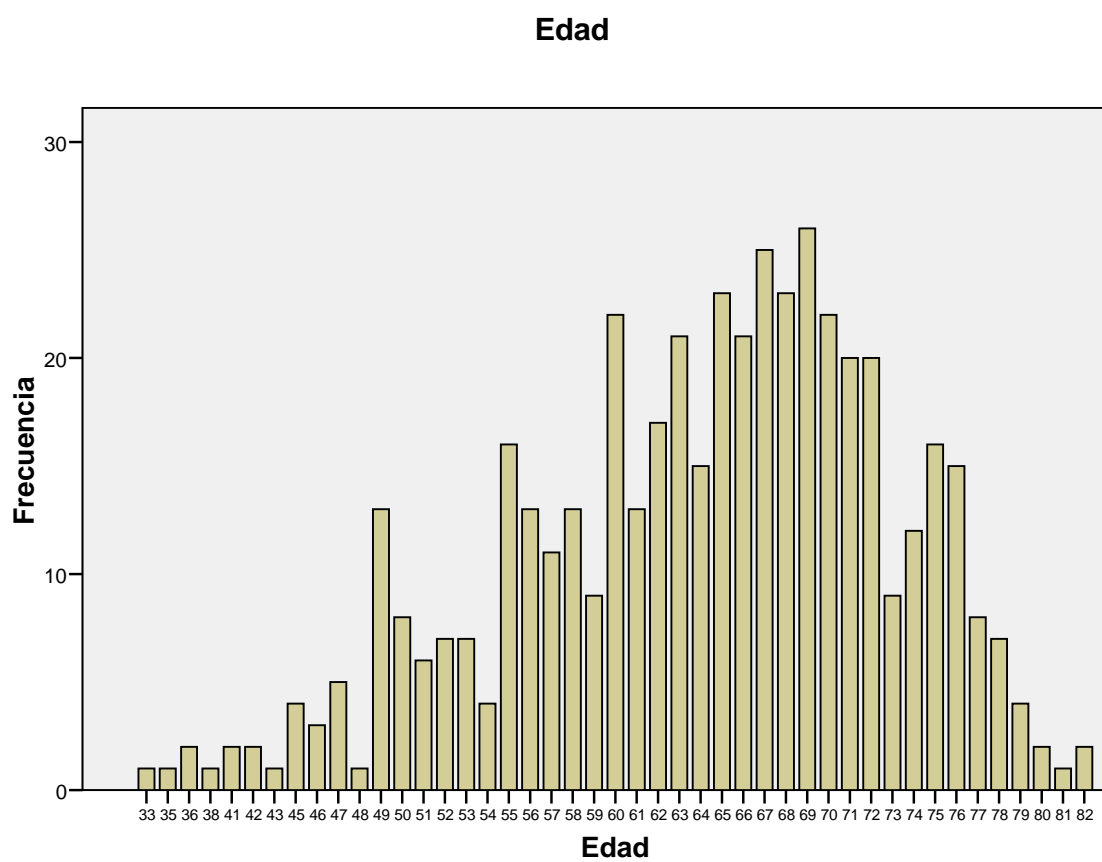
1.1 DATOS CLINICOS.

Sexo

La distribución por sexos mostró un claro predominio de varones 425/470 (90,4%) respecto a las mujeres 45 (9,6%).

Edad

Los pacientes en el momento del diagnóstico tenían edades comprendidas entre los 33 y los 82 años, con una media de 64 años y una mediana de 65. La media de edad en varones era de 64,1 años y en las mujeres ligeramente menor, de 58,3 años.



1.2 DISTRIBUCIÓN POR ESTADIOS Y TIPOS HISTOLÓGICOS.

La distribución por estadios y por tipos histológicos es la siguiente:

ESTADIO	epid	adeno	CABA	CACGR	adenosc	otros	TOTAL/%
Ia	53	49	5	9	0	3	119 25,3%
Ib	93	86	7	10	4	2	202 43%
IIa	30	13	1	6	1	1	52 11,1%
IIb	19	8	1	1	2	1	32 6,8%
IIIa	21	26	0	5	4	0	56 11,9
IIIb	1	1	1	0	0	0	3 0,6%
IV	2	3	0	0	0	1	6 1,2%
TOTAL/%	219/46,5%	186/39,6%	15/3,2%	31/6,6%	11/2,3%	8/1,7%	470

1.3 FACTORES HISTOLOGICOS ESTUDIADOS

Grado de diferenciación tumoral

El grado de diferenciación tumoral se evaluó sólo en los 310 casos del Hospital Gregorio Marañón. La mayoría de tumores eran pobre o moderadamente diferenciados con menos del 10% de bien diferenciados.

Grado diferenciación	bien	moderadamante	pobremente	Total
	25	135	150	310

Grado de diferenciación tumoral y TNM N

Los tumores bien diferenciados presentan metástasis ganglionares en el 8% de casos, mientras que los moderadamente y pobremente diferenciados las presentan respectivamente en 25,3% y 34,8% de casos, resultando significativo estadísticamente. No se encuentra significación en la correlación del grado de diferenciación con el tamaño tumoral (T), metástasis (M) ni estadificación.

Grado diferenciación	bien	moderadamante	pobrementemente	Total
N0	23	101	98	222
N1	0	23	25	48
N2	2	11	27	40
	25	135	150	310

p=0,03

Grado de diferenciación tumoral y atrapamiento alveolar

Los tumores bien diferenciados no presentan atrapamiento alveolar, mientras que este se encuentra en más de un tercio de los poco diferenciados

Grado diferenciación	bien	moderadamante	pobrementemente	Total
Atrapamiento +	0	38	55	93
Atrapamiento -	25	97	95	217
	25	135	150	310

p=0,002

La extensión del atrapamiento en cambio es mayor entre los moderadamente diferenciados que entre los poco diferenciados, aunque no llega a la significación estadística (p=0,061).

Grado de diferenciación tumoral y estroma

Los carcinomas bien diferenciados presentan estroma tumoral escaso; en cambio en los poco o moderadamente diferenciados el estroma es abundante. La relación del grado de diferenciación con el estroma en la zona de atrapamiento, en los casos con atrapamiento alveolar, no es significativa ($p=0,148$).

Grado diferenciación//estroma	bien	moderadamente	pobrementemente	Total
Escaso	17	38	57	112
Abundante	8	97	93	198
	25	135	150	310

$p=0,001$

Grado de diferenciación tumoral y necrosis

La mayoría de tumores bien diferenciados no contienen necrosis (0) o es escasa (1); el grado de necrosis es abundante (3) o moderada (2) en los poco diferenciados, mientras que los moderadamente diferenciados presentan un grado intermedio de necrosis.

Grado diferenciación // necrosis	bien	moderadamente	pobremente	Total
0	20	26	16	62
1	1	32	27	60
2	2	58	54	114
3	2	19	53	74
	25	135	150	310

p=0,000

Grado de diferenciación y tipo histológico

Los epidermoides son sobre todo moderadamente diferenciados, los adenocarcinomas se reparten entre moderadamente y poco diferenciados y el grupo de “otros” sobre todo en poco diferenciados ($p=0,000$; $p=0,033$ si se consideran sólo epidermoides y adenocarcinomas).

Grado diferenciación	bien	moderadamante	pobremente	Total
Epidermoides	4	80	68	152
Adenocarcinomas	12	49	53	114
Otros	9	6	29	44
	25	135	150	310

$p=0,000$

Grado de diferenciación tumoral y Hsp70 % células

Los tumores bien diferenciados presentan mayor porcentaje de células positivas para la proteína Hsp70 que los moderada o pobremente diferenciados ($p=0,023$). No existe significación estadística en lo que se refiere a la positividad-negatividad para Hsp70 o a la intensidad de tinción.

Atrapamiento alveolar

Se estudió el atrapamiento alveolar en el seno de los tumores encontrándose en 115 de los 470 casos (24,4%) con la distribución histológica resumida en la tabla.

El atrapamiento era mucho más frecuente en los carcinomas epidermoides (95 de los 219 casos. 43,4%), encontrándose en el 36,3% de los adenoescamosos, en el 16% de los carcinomas de células grandes, tan sólo en el 5,9% de adenocarcinomas (11/186) y en ningún caso de carcinoma bronquioloalveolar.

Tipo histológico	Atrapamiento +	Atrapamiento -	Total/Porcentaje atrapamiento
Epidermoide	95	124	219/43,4
Adenocarcinoma	11	175	186/5,9
CA bronquioloalveolar	0	15	15/0
Células grandes	4	27	31/12,9
Adenoescamoso	4	7	11/36,3
Otros	1	7	8/12,5
<u>TOTAL</u>	115	355	470/24,4

p=0,000

Atrapamiento alveolar por estadios

	ESTADÍO I		ESTADÍO II		ESTADÍO III		ESTADÍO IV	TOTAL
	A	B	A	B	A	B		
Atrapamiento +	26	51	12	13	9	1	3	115
Atrapamiento -	93	151	40	19	47	2	3	355
Total	119	202	52	32	56	3	6	470

El atrapamiento es más frecuente en el estadio IV, IIB y IB, no significativo estadísticamente.

Grado del atrapamiento

En los casos en que se observa atrapamiento este es abundante o moderado en el 76,5% de casos.

Grado atrapamiento	1	2	3	Total
	27	45	43	115

Distribución histológica de los grados de atrapamiento

Los carcinomas epidermoides presentan un atrapamiento alveolar más abundante que el resto de tipos histológicos, pero la distribución de los grados de atrapamiento dentro de los diferentes tipos histológicos no es estadísticamente significativa.

Tipo histológico	Grado 1/%	Grado 2/%	Grado 3/%	Total casos con atrapamiento
Epidermoide	19/20%	37/38,9%	39/41%	95
Adenocarcinoma	4/36,3%	5/45,4	2/18,1	11
Bronquioloalveolar	0	0	0	0
Células grandes	1/25	2/50	1/25	4
Adenoescamoso	2/50	1/25	1/25	4
Otros	1/100	0	0	1
<u>TOTAL</u>	27/23,4%	45/39,1	43/37,3	115

p=0,321

Extensión atrapamiento:

La mayor parte de casos (92,7%) muestra un atrapamiento extenso siendo pocos los casos con éste limitado a la periferia (extensión 1).

Extensión atrapamiento	1	2	3	Total
	9	14	92	115

p=0,034

Distribución histológica de la extensión de atrapamiento

Los carcinomas epidermoides muestran mayor extensión del atrapamiento alveolar que el resto de tipos histológicos, en este caso con significación estadística.

Tipo histológico	Ext 1/%	Ext 2/%	Ext 3/%	Total casos con atrapamiento
Epidermoide	4/4,2%	12/12,6%	80/84,2%	95
Adenocarcinoma	3/27,2%	2/18,1%	6/54,5%	11
Bronquioloalveolar	0	0	0	0
Células grandes	1/25%	0/0	3/75%	4
Adenoescamoso	1/33%	0/0	2/66%	4
Otros	0	0	1/100%	1
<u>TOTAL</u>	9/7,8%	14/12,1%	92/80	115

p=0,026.

Grado y extensión del atrapamiento

También el grado y la extensión del atrapamiento están correlacionados de manera que ningún caso con atrapamiento abundante (grado 3) lo presenta sólo de forma periférica (extensión 1 ó 2), si no que en todos los casos está distribuido ampliamente por la neoplasia (3).

	Extensión 1	Extensión 2	Extensión 3	
Grado 1	8	7	12	27
Grado 2	1	7	37	45
Grado 3	0	0	43	43
	9	14	92	115

p=0,000.

Estroma en la zona de atrapamiento:

La mayoría de los tumores que muestran atrapamiento el estroma en dicha zona es abundante (83,4%).

Estroma (atrap)	1	2	Total
	19	96	115

El estroma en la zona de atrapamiento no se correlaciona con el grado y extensión de este (p=0,152 y p=0,59 respectivamente).

Si se correlacionan entre sí el estroma general del tumor y en la zona de atrapamiento, encontramos que los tumores con atrapamiento alveolar contienen en la

zona de atrapamiento más cantidad de estroma que en el resto de las zonas del tumor de forma que el atrapamiento parece relacionado con estroma más abundante.

No existe relación, en cambio, con la presencia de cicatriz en el tumor ($p=0,709$).

Estroma atrap// Estroma general	Escaso	Abundante	Total
Escaso	14	24	38
Abundante	5	72	77
	19	96	115

$p=0,000$

Estroma en la zona de atrapamiento y metástasis (TNM M1b)

El único caso con metástasis de los casos con atrapamiento alveolar, contiene estroma abundante ($p=0,032$).

Necrosis

La mayoría de tumores contiene necrosis moderada o abundante. El atrapamiento es más frecuente en casos con necrosis de grado 3 mientras que más del 90% de tumores sin necrosis no presentan atrapamiento ($p=0,000$). En cambio la correlación de la necrosis con el grado o extensión del atrapamiento no muestran significación ($p=0,69$ y $0,92$ respectivamente).

Necrosis	0	1	2	3	Total
Atrapamiento +	7	26	42	40	115
Atrapamiento -	94	72	113	76	355
Total	101	98	155	116	470

$p=0,000$

Necrosis y cicatriz

Los casos que presentan cicatriz en la tumoración muestran menor grado de necrosis que los que no la contienen.

Necrosis	0	1	2	3	Total
Cicatriz -	70	85	129	97	381
Cicatriz +	31	13	26	19	89
Total	101	98	155	116	470

p=0,011

Diseminación interalveolar:

La mayor parte de casos muestran, al menos de forma focal, diseminación tumoral de un alveolo al adyacente a través de los poros de Cohn, en la periferia.

Diseminación interalveolar	1	2	Total
	284	61	345

Diseminación interalveolar y atrapamiento

Casi todos los casos con atrapamiento presentan diseminación interalveolar y la mayoría de los que no muestran este crecimiento tampoco tienen atrapamiento. Sin embargo la correlación de diseminación interalveolar con grado y extensión del atrapamiento no es significativa ($p=0,514$ y $0,166$ respectivamente).

Diseminación interalveolar	1	2	
Atrapamiento +	99	6	105
Atrapamiento -	185	55	240
	284	61	345

$p=0,000$

Diseminación interalveolar y cicatriz

En los casos con diseminación interalveolar es más frecuente que los tumores tengan cicatriz, comparado con los que no tienen ese tipo de diseminación.

Cicatriz	Cicatriz -	Cicatriz +	
Diseminación alveolar 1	212	72	284
Diseminación alveolar 2	53	8	61
	265	80	345

p=0,039.

Cicatriz e histología

La presencia de cicatriz dentro del tumor es más frecuente en los adenocarcinomas, aunque se encuentra en todos los tipos histológicos.

Tipo histológico	Cicatriz -	Cicatriz +	Total
Epidermoide	199	20	219
Adenocarcinoma	130	56	186
Otros	52	13	65
<u>TOTAL</u>	381	89	470

p=0,000.

1.4 RESULTADOS DEL ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO

1.4.1 HISTOANTÍGENO DEL GRUPO SANGUÍNEO A

Pacientes del Grupo A y expresión del histoantígeno del Grupo A en tumores

El 51,7% de los pacientes pertenecen al grupo sanguíneo A, un 37% de los cuales muestran pérdida del antígeno en sus neoplasias. Sólo en un paciente que no es del grupo sanguíneo A el tumor es positivo para dicho antígeno.

	Tumor gr A -	Tumor gr A +	
Paciente gr A -	226	1	227
Paciente gr A +	90	153	243
	316	154	470

p=0,000

Pacientes del Grupo A, expresión del histoantígeno del Grupo A y distribución de tipos histológicos

Las distribuciones de pacientes del grupo sanguíneo A y de la expresión del antígeno A en los tumores, con respecto a los tipos histológicos no son significativas, distribuyéndose de manera uniforme.

Tipo histológico	Paciente gr A -	Paciente gr A +	Total
Epidermoide	103	117	220
Adenocarcinoma	98	87	185
CA bronquioloalveolar	5	10	15
Células grandes	12	19	31
Adenoescamoso	5	6	11
Otros	4	4	8
<u>TOTAL</u>	227	243	470

p=0,20

Los carcinomas epidermoides en pacientes del grupo A presentan pérdida del histoantígeno del grupo A en un porcentaje mayor que los adenocarcinomas, siendo

dicha pérdida superior en el grupo restante en conjunto y especialmente en carcinomas de célula grande y adenoescamosos.

Tipo histológico	Tumor gr A -	Tumor gr A +	Total	Pérdida de antígeno A/%
Epidermoide	147	73	220	44/37,6%
Adenocarcinoma	124	61	185	26/29,8%
CA bronquioloalveolar	7	8	15	2/20%
Células grandes	23	8	31	11/57,8%
Adenoescamoso	9	2	11	4/66,6%
Otros	6	2	8	2/50%
<u>TOTAL</u>	316	154	470	

p=0,28

La correlación del histoantígeno del grupo A con la expresión de Hsp27, Hsp70 y todos los otros factores histológicos estudiados no resultó significativa.

Se cruzó también Hsp27, grupo A y estadio, y Hsp70, grupo A y estadio. No resultaron significativas dichas correlaciones.

1.4.2 PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO

Hsp27 y Hsp70

Hsp70: resultado y porcentaje de células positivas

Más del 85% de los tumores son positivos para la proteína Hsp70 y de estos la mayoría presentan la tinción en más de la mitad de las células

Hsp70	-	1	2	3	4	Total
negativo	64					64
+ % células		22	66	141	177	406
	64	22	66	141	177	470

Hsp70: intensidad de tinción

Además de la extensión de la tinción dentro del tumor, la mayor parte de las células muestran una tinción intensa.

Hsp70	-	+	++	+++	Total
negativo	64				64
+ intensidad		76	161	169	406
	64	76	161	169	470

Hsp27: resultado y porcentaje de células positivas

En lo que se refiere a la proteína Hsp27 también más del 85% de tumores son positivos pero en este caso el porcentaje de células marcadas es aún mayor.

Hsp27	-	1	2	3	4	Total
negativo	54					54
+ % células		31	50	72	183	336
	54	31	50	72	183	390

Hsp27: intensidad de tinción

La intensidad de marcaje es también mayor que en la otra proteína de choque.

Hsp27	-	+	++	+++	Total
negativo	54				54
+ intensidad		36	114	186	336
	54	36	114	186	390

La mayoría de casos son positivos para ambos marcadores Hsp27 y Hsp70 con alta significación estadística. También se mantiene la alta significación ($p=0,000$) para la intensidad de la tinción inmunohistoquímica y para el porcentaje de células positivas.

	Hsp27 +	Hsp27 -	
Hsp70 +	301	34	335
Hsp70 -	35	20	55
	336	54	390

$p=0,000$

Hsp70 y atrapamiento alveolar

El atrapamiento alveolar es significativamente más frecuente en los casos negativos para Hsp70. También es significativo en lo que se refiere a la intensidad de tinción: atrapamiento más frecuente en casos con tinción inmunohistoquímica débil ($p=0,02$) pero no en el porcentaje de células positivas ($p=0,54$)

	Atrapamiento +	Atrapamiento -	
Hsp70 +	95	308	403
Hsp70 -	20	47	67
	115	355	470

$p=0,039$.

Intensidad de Hsp70 y extensión de atrapamiento

Entre los casos con atrapamiento alveolar, los negativos para proteína Hsp70 y los positivos con mayor intensidad presentan mayor extensión del atrapamiento. No ocurre lo mismo en lo que se refiere al grado de atrapamiento.

Hsp70 intensidad	Exten atrap 1	Exten atrap 2	Exten atrap 3	
-	0	2	18	20
+	6	2	9	17
++	1	6	34	41
+++	2	4	31	37
	9	14	92	115

p=0,001.

Intensidad de HSP-70 y estroma en las zonas de atrapamiento

Los casos con estroma abundante en la zona de atrapamiento presentan tinción más intensa para Hsp70 que aquellos con estroma escaso o moderado, y aquellos con mayor intensidad de tinción para la proteína tienen estroma más abundante que los de tinción leve o moderada, o los negativos.

Hsp70 intensidad	Estro atrap escaso	Estro atrap abundante	
-	3	17	20
+	2	15	17
++	11	29	40
+++	3	35	38
	19	96	115

p=0,041.

Hsp27 y atrapamiento alveolar

Los casos con atrapamiento alveolar son más frecuentemente positivos para Hsp27. También es significativo con respecto al porcentaje de células positivas ($p=0,034$) y no lo es en cambio para la intensidad de tinción ($p=0,059$), aunque se mantiene en un rango muy próximo.

	Atrapamiento +	Atrapamiento -	
Hsp27 +	84	253	337
Hsp27 -	9	44	53
	93	297	390

$p=0,034$

HSP-27 y estroma tumoral

En los casos positivos para Hsp27 el estroma tumoral es abundante mientras en los negativos el estroma es escaso. El porcentaje de células positivas es también significativamente mayor entre los que contienen estroma abundante ($p=0,032$), y la tinción es significativamente más intensa ($p=0,009$). No existe correlación en cambio con el estroma en la zona de atrapamiento.

	Hsp27 +	Hsp27 -	
Estroma abundante	218	24	242
Estroma escaso	119	29	148
	337	53	390

p=0,043.

HSP-27 y diseminación interalveolar

Los casos positivos para Hsp27 presentan diseminación interalveolar con mayor frecuencia. También es significativo para el mayor porcentaje de células positivas (p=0,000) y para mayor intensidad de tinción (p=0,000).

	Hsp27 +	Hsp27 -	
Diseminación 1	206	26	232
Diseminación 2	45	15	60
	251	41	292

p=0,000.

II. RESULTADOS DE SUPERVIVENCIA

2.1 SUPERVIVENCIA GLOBAL

Supervivencia en relación al TNM y estadificación

Desde el punto de vista de la **supervivencia** relacionada con el TNM es **significativa** en nuestra serie en relación con el **estado ganglionar (N)** ($p < 0,001$). No es significativa en el diámetro tumoral (T) ($p = 0,368$) ni en lo que respecta a las metástasis (M) ($p = 0,097$). También resultó **significativa** la distribución **por estadios** ($p < 0,001$).

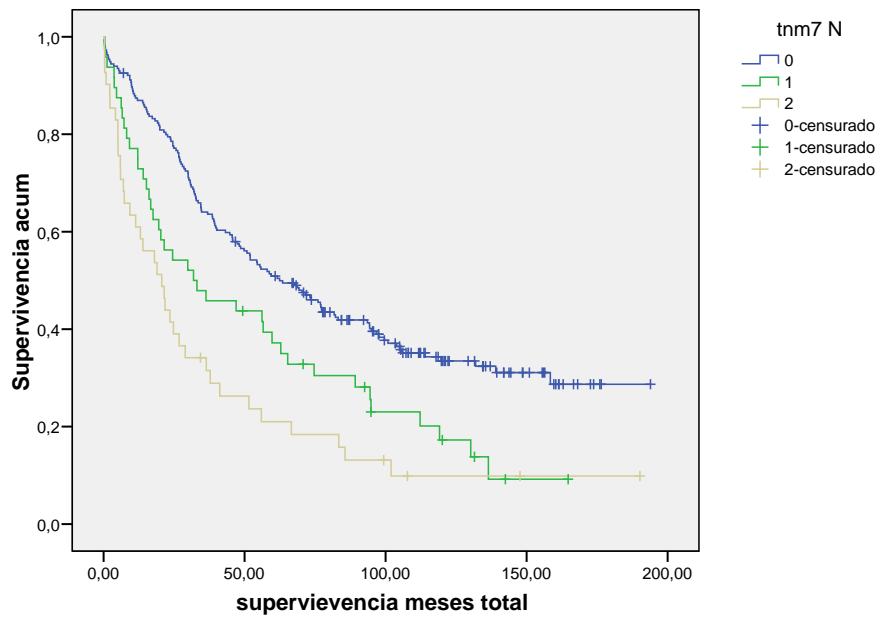
TNM-N	muertos	vivos	TOTAL
0	207	129	336
1	59	14	73
2	52	9	61
TOTAL	318	152	470

(Gráfico pg. 93)

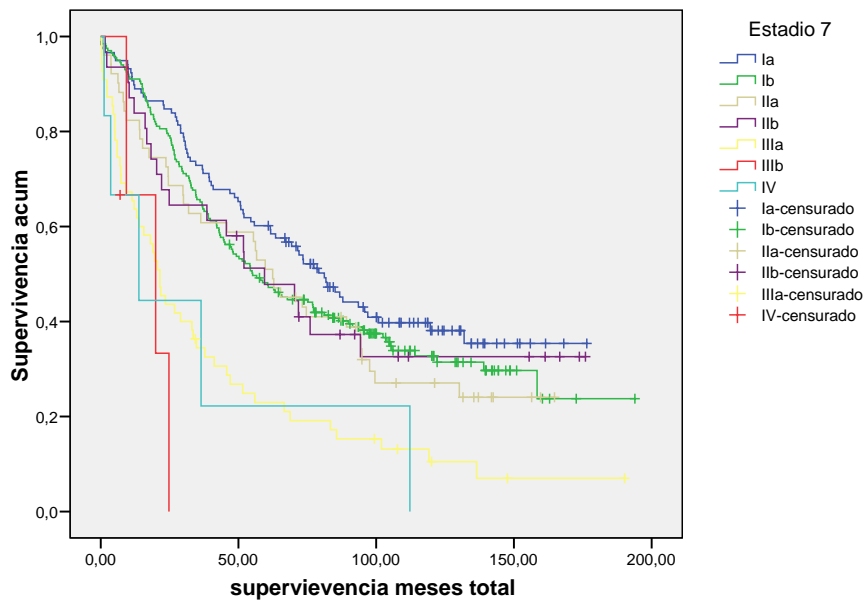
ESTADIO	Muertos	Vivos	TOTAL	Porcentaje supervivencia
Ia	71	48	119	40,3
Ib	130	72	202	35,6
IIa	37	15	52	28,9
IIb	21	11	32	34,4
IIIa	50	6	56	10,7
IIIb	3	0	3	0
IV	6	0	6	0
TOTAL	318	152	470	32,3

(Gráfico pg. 93)

Funciones de supervivencia



Funciones de supervivencia



Subdivisión del estadio I según el diámetro tumoral

La **supervivencia** para diferentes niveles de tamaño tumoral en la pieza de resección dentro del **estadio I distribuidos como <1cm, 1-2cm, 2-3cm, >3cm no resultó significativo** aunque existía tendencia estadística ($p=0,084$), mientras que dicha distribución de tamaño realizada prequirúrgicamente era claramente no significativa ($p=0,502$). Tanto la T global como esta división en centímetros son **significativas en la supervivencia libre de enfermedad** ($p=0,018$ y $p=0,004$ respectivamente; vide infra)

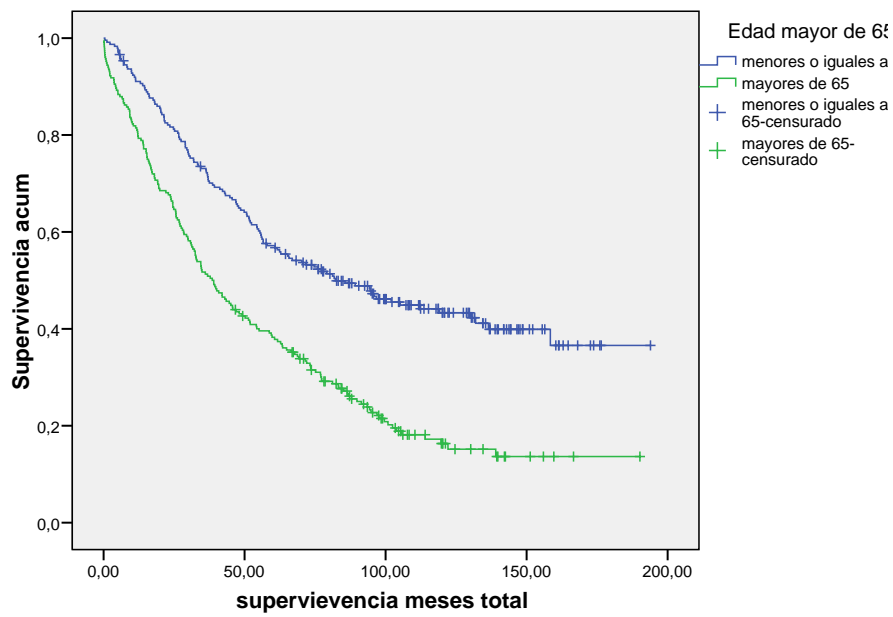
Supervivencia en relación con la edad y el sexo

La **supervivencia con respecto a la edad**, tomando como punto de corte la mediana (65 años) resultó **significativamente** menor para los pacientes mayores de 65 años ($p<0,001$). En lo que se refiere al **sexo** existe tendencia estadística, aunque **no** llega a ser **significativa** ($p=0,063$) con mayor mortalidad en el sexo masculino

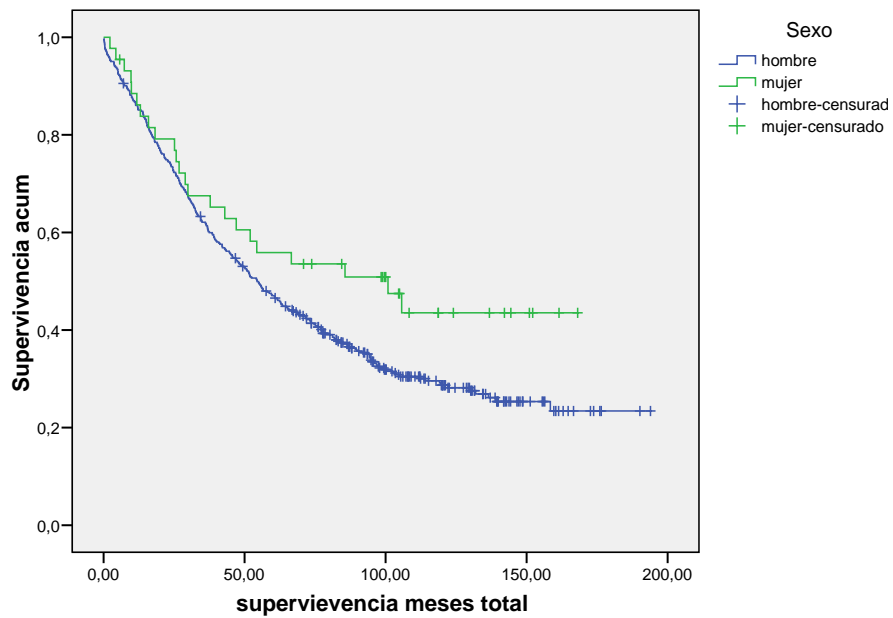
Supervivencia edad	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
< ó = 65 años	131	106	237	44,7
>65 años	187	46	233	19,8
Total	318	152	470	32,3

Supervivencia sexo	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
Hombre	294	131	425	30,8
Mujer	24	21	45	46,6
Total	318	152	470	32,3

Funciones de supervivencia



Funciones de supervivencia



Supervivencia en relación con el grado de diferenciación tumoral

Los tumores **bien diferenciados** tienen **mejor supervivencia** que los poco diferenciados, mientras que para los moderadamente diferenciados la supervivencia es intermedia pero muy próxima a la de los poco diferenciados.

Grado de diferenciación	Muertos	Vivos	Total	% Supervivencia
Bien	12	13	25	52
Moderadamente	96	39	135	28,8
Pobremente	111	39	150	26
Total	219	91	310	28,4

p=0,005

(Gráfico pg. 99)

Supervivencia en relación con el atrapamiento alveolar

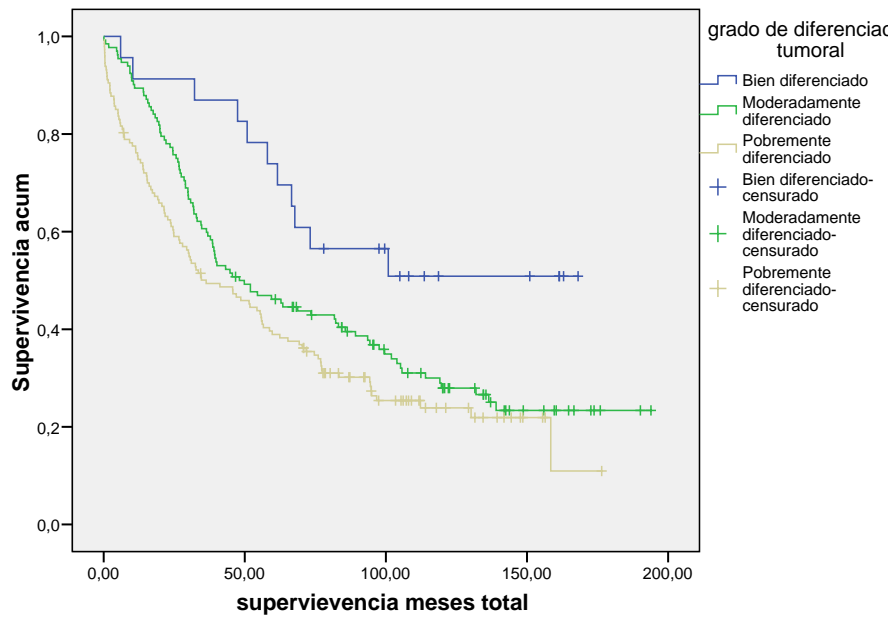
La **supervivencia** con respecto al atrapamiento de luces alveolares dentro del tumor en estadios I y II **no resultó significativa**, aunque sí **muestra una tendencia estadística (p=0,056)** siendo peor para los casos que presentan dicha característica. Para la supervivencia libre de enfermedad no es significativo (p=0,57). Para la serie global tampoco es significativo (p=0,161 para supervivencia global y p=0,507 para supervivencia libre de enfermedad).

Atrapamiento alveolar	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
1	71	28	99	28,3
2	186	120	306	39,2
	257	148	405	36,5

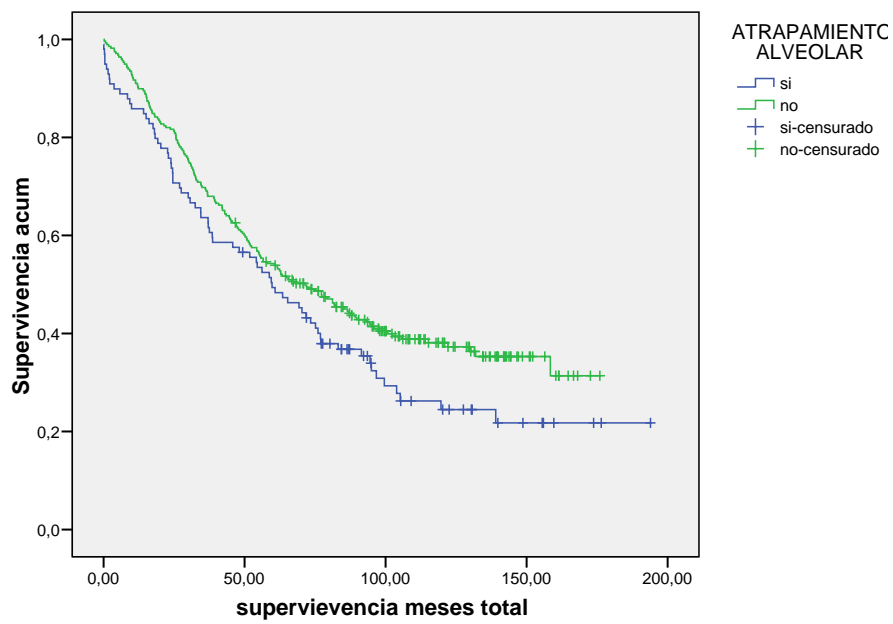
p=0,056

(Gráfico pg. 99)

Funciones de supervivencia



Funciones de supervivencia



Supervivencia en relación con el grado y la extensión del atrapamiento alveolar

Dentro de los casos con atrapamiento aquellos en los que el **grado del atrapamiento** es **mayor** (más abundante) y en los que es **más extenso**, la **supervivencia** es significativamente **más larga**, tanto en estadios I y II ($p=0,032$ y $p=0,068$ respectivamente), como en la serie global (0,03 y 0,04 respectivamente), comparados con los casos que muestran el atrapamiento alveolar más escaso o localizado.

Grado atrapamiento	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
1	23	4	27	14,8
2	33	12	45	26,7
3	28	15	43	34,9
	84	31	115	26,9

$p=0,03$

(Gráfico pg. 102)

La comparación del **grado** de atrapamiento 1 con el 2 y 3 agrupados aumenta la significación ($p=0,01$).

Extensión atrapamiento	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
1	8	1	9	11,1
2	11	4	15	26,7
3	65	26	91	28,6
	84	31	115	26,9

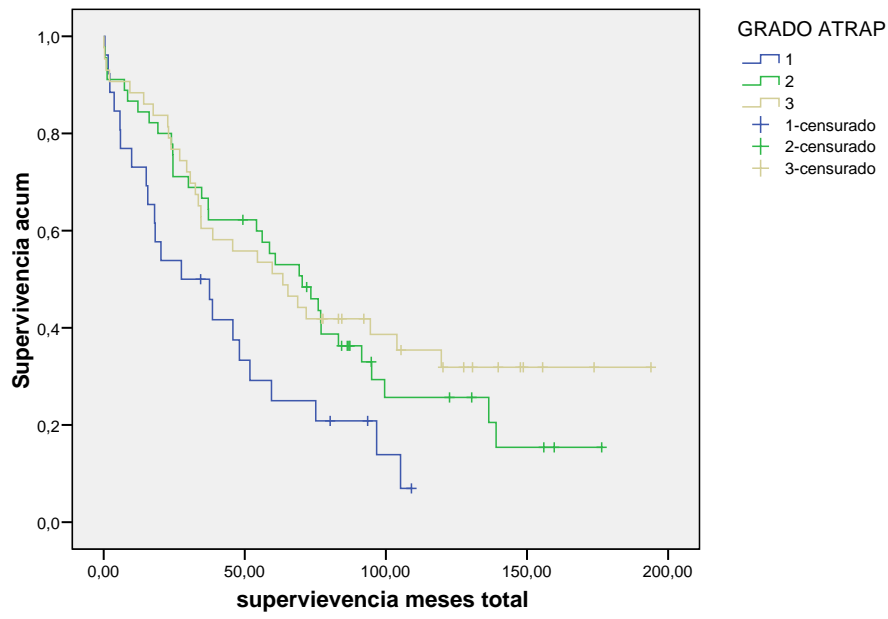
p=0,04

(Gráfico pg. 102)

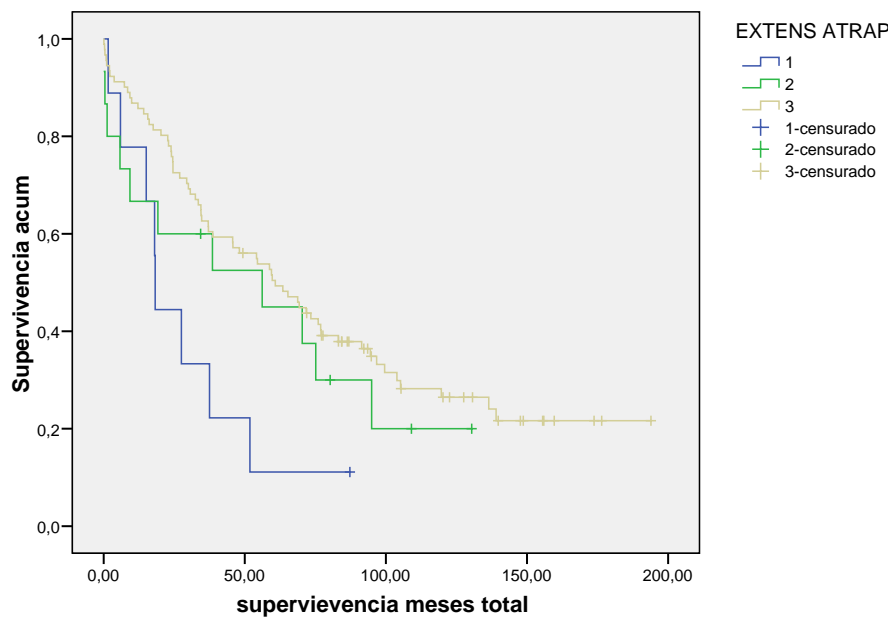
La comparación de la **extensión** de atrapamiento 1 con el 2 y 3 agrupados también aumenta la significación (p=0,016).

Dado que el grado de atrapamiento 3 y la extensión 3 tiene mejor supervivencia que el grado y extensión 1, comparamos la supervivencia de grado 3 y extensión 3 con la supervivencia del resto de la serie completa y no se obtuvo diferencia significativa, perdiéndose la tendencia de peor supervivencia mostrada para el atrapamiento alveolar en general y presentando una supervivencia similar a los casos sin atrapamiento (p=0,585 en grado 3 versus p=0,056 para todos los casos con atrapamiento). Parece por tanto que esa tendencia estadística de la peor supervivencia en los casos con atrapamiento alveolar se refiere a los casos en los que el atrapamiento es escaso o está limitado únicamente a la periferia tumoral.

Funciones de supervivencia



Funciones de supervivencia



Supervivencia en relación con la presencia de diseminación interalveolar

Los pacientes cuyos tumores muestran **diseminación interalveolar** en la interfase con el pulmón no tumoral tienen una **supervivencia menor** que los casos sin dicho crecimiento ($p=0,037$). Esta significación desaparece cuando se estudia en los estadios I y II (0,075).

En ambos grupos la supervivencia libre de enfermedad no es significativa ($p=0,374$ para estadios I y II).

Serie general

Diseminación interalveolar	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
Presente	201	83	284	29,2
Ausente	36	25	61	41
	237	108	345	31,3

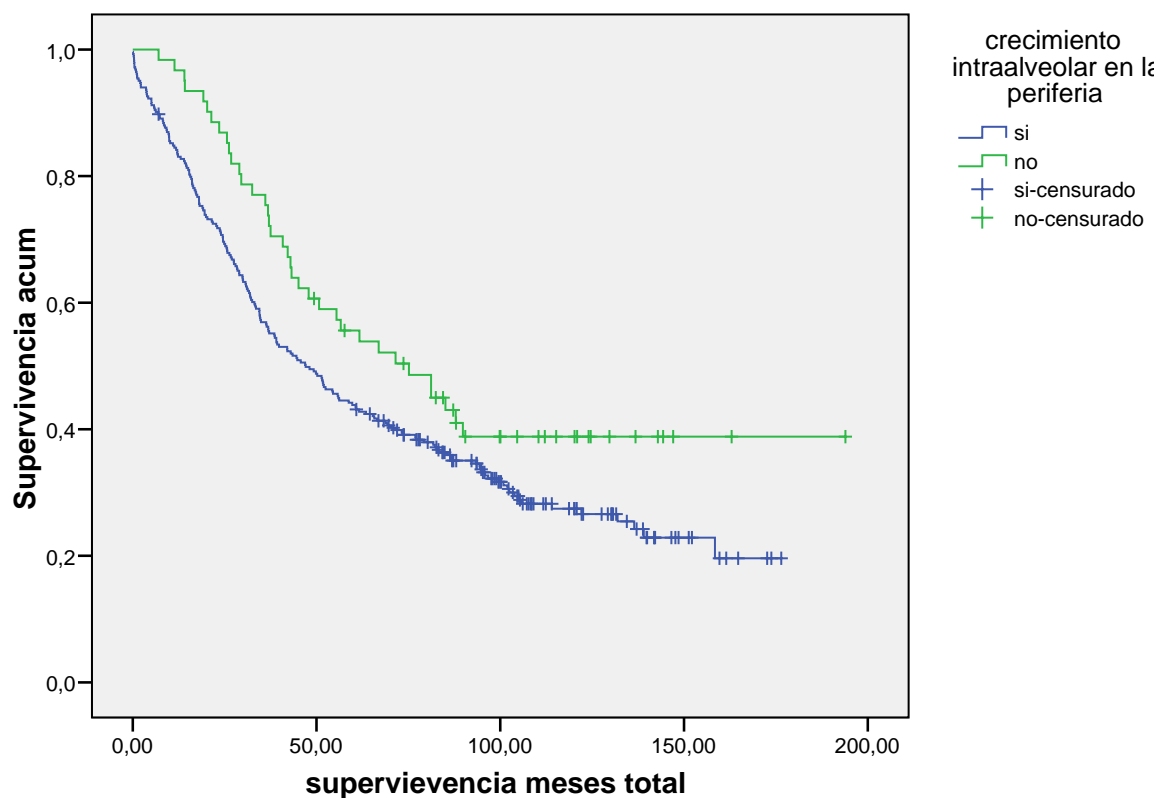
$p=0,037$

Estadios I y II

Diseminación interalveolar	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
Presente	162	78	240	32,5
Ausente	33	25	58	43,1
	195	103	298	34,6

p=0,075

Funciones de supervivencia



Supervivencia pacientes con expresión tumoral de la proteína del Grupo A

Los **tumores positivos** para la proteína del grupo A en el estudio inmunohistoquímico muestran **mejor supervivencia**, no significativa pero con tendencia estadística.

Grupo A en tumor	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
Negativo	220	96	316	30,4
Positivo	99	55	154	35,7
	319	151	470	32,1

p=0,056

(Gráfico pg. 108)

Supervivencia en pacientes con pérdida de expresión de la proteína del Grupo A

En cambio los **pacientes de grupo A con pérdida de expresión** para la proteína en el estudio inmunohistoquímico tienen **peor supervivencia** que los pacientes del grupo A que mantienen la expresión de la proteína tanto en la serie global ($p=0,017$) como en los estadios I y II ($p=0,02$).

Serie global

Antígeno grupo A	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
Perdido en tumor	64	26	90	28,8
Conservado tumor	97	56	153	36,6
	161	82	243	33,7

$p=0,017$

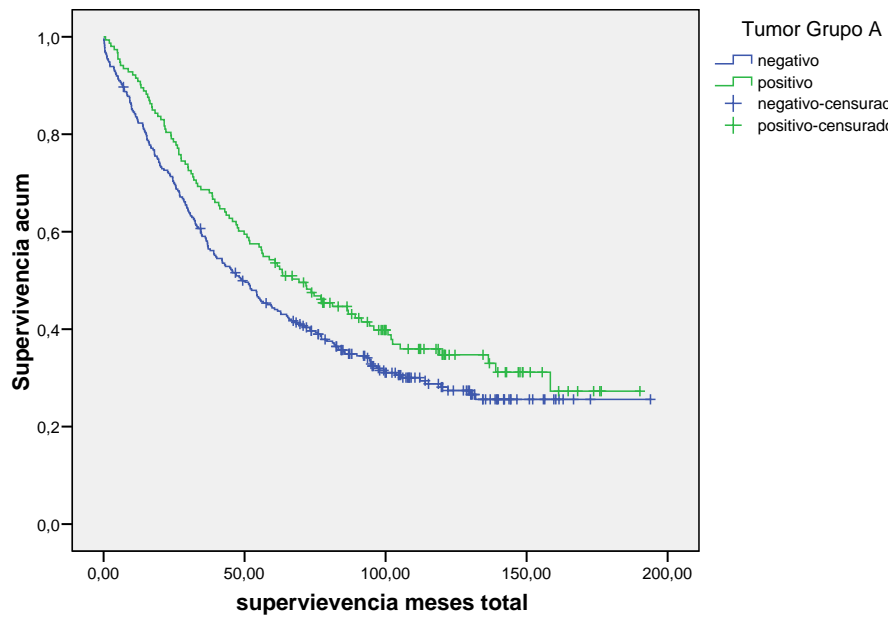
(Gráfico pg. 108)

Estadios I y II

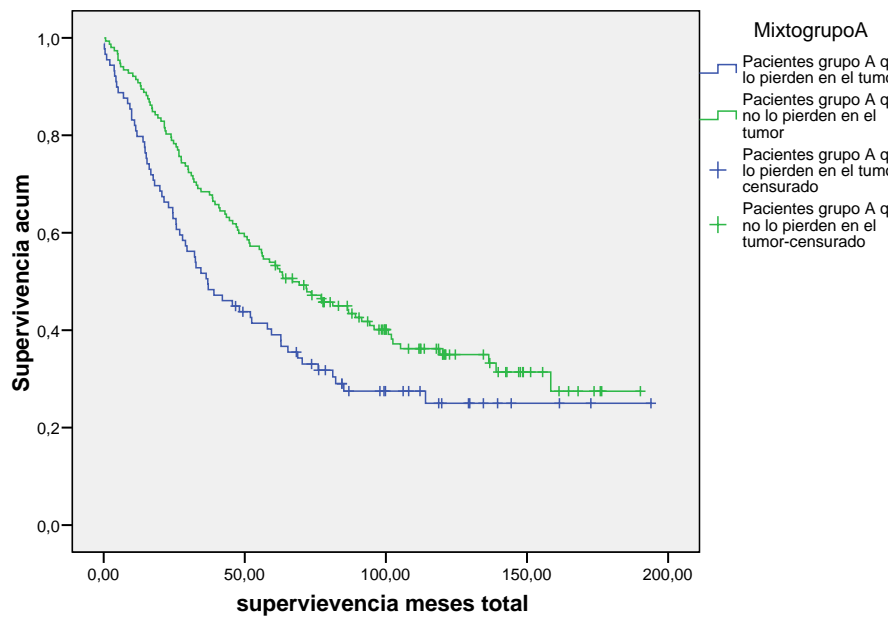
Antígeno grupo A	Muertos	Vivos	Total	Porcentaje supervivencia
Perdido en tumor	55	24	79	30,4
Conservado tumor	77	52	129	40,3
	132	76	208	36,5

p=0,02

Funciones de supervivencia



Funciones de supervivencia



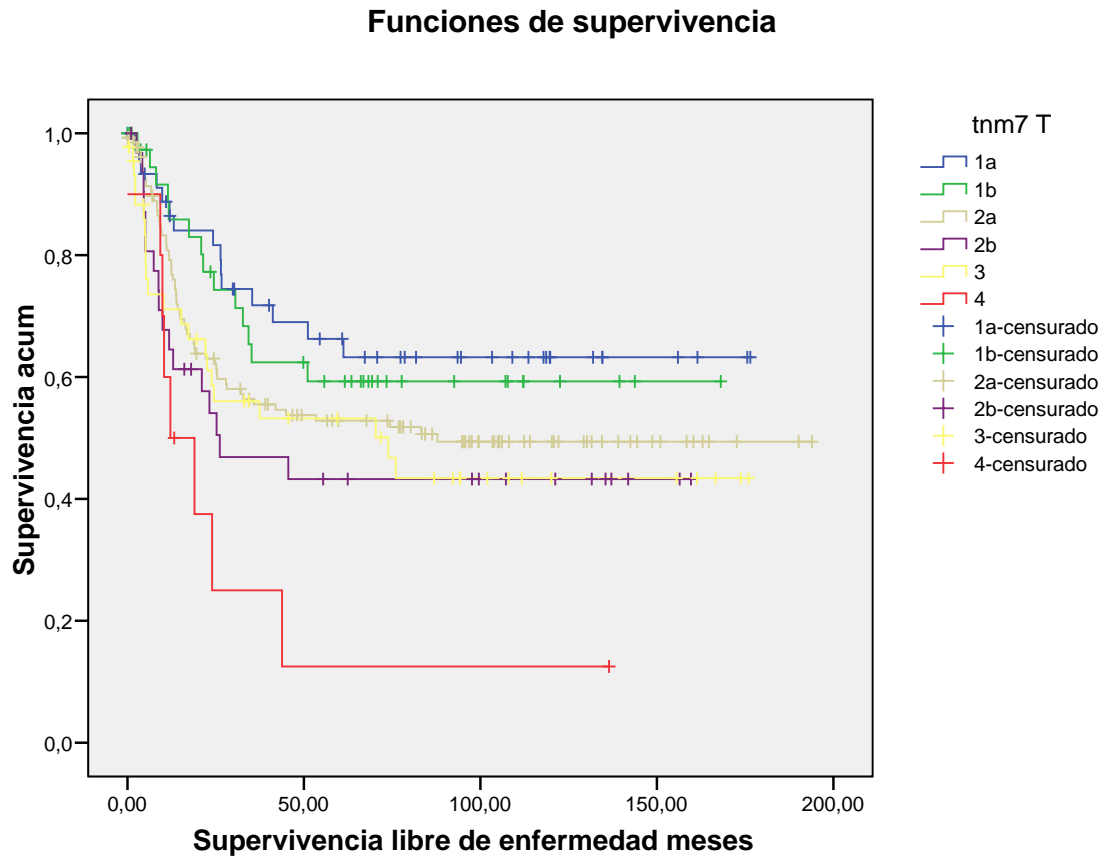
Incluso **comparando** la supervivencia global de los casos de tumores que tienen pérdida de **antígeno del grupo A con todo el resto de casos de la serie** (tumores de pacientes del grupo A sin pérdida de expresión y los de otros grupos sanguíneos) es **también significativa**, aunque empeora la significación ($p=0,048$).

Comparando la supervivencia de pacientes del grupo A con los que no son de dicho grupo la diferencia no es significativa ($p=0,555$). Tampoco para la supervivencia libre de enfermedad.

2.2 SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Supervivencia en relación al TNM y estadificación

Desde el punto de vista de la supervivencia libre de enfermedad relacionada con el TNM es significativa en nuestra serie en **relación con el diámetro tumoral (T)** ($p=0,018$) **aumentando la significación** estadística ($p=0,004$) **cuando se distribuye el diámetro tumoral por centímetros (<0,9, 1-1,9, 2-2,9, >3 cms)**. Los tumores menores de 0,9 cm tienen una supervivencia mejor que el resto; los que miden entre 1 y 1,9 cm y entre 2 y 2,9 cm presentan una supervivencia similar mientras que en los mayores de 3 cm es peor. El **estado ganglionar (N)** ($p<0,001$) y **la distribución por estadios** ($p<0,001$) **también resultaron significativos**. No es significativa en cambio en la distribución según la presencia de metástasis (M) ($p=0,248$).

Supervivencia libre de enfermedad para diferentes niveles de TNM T

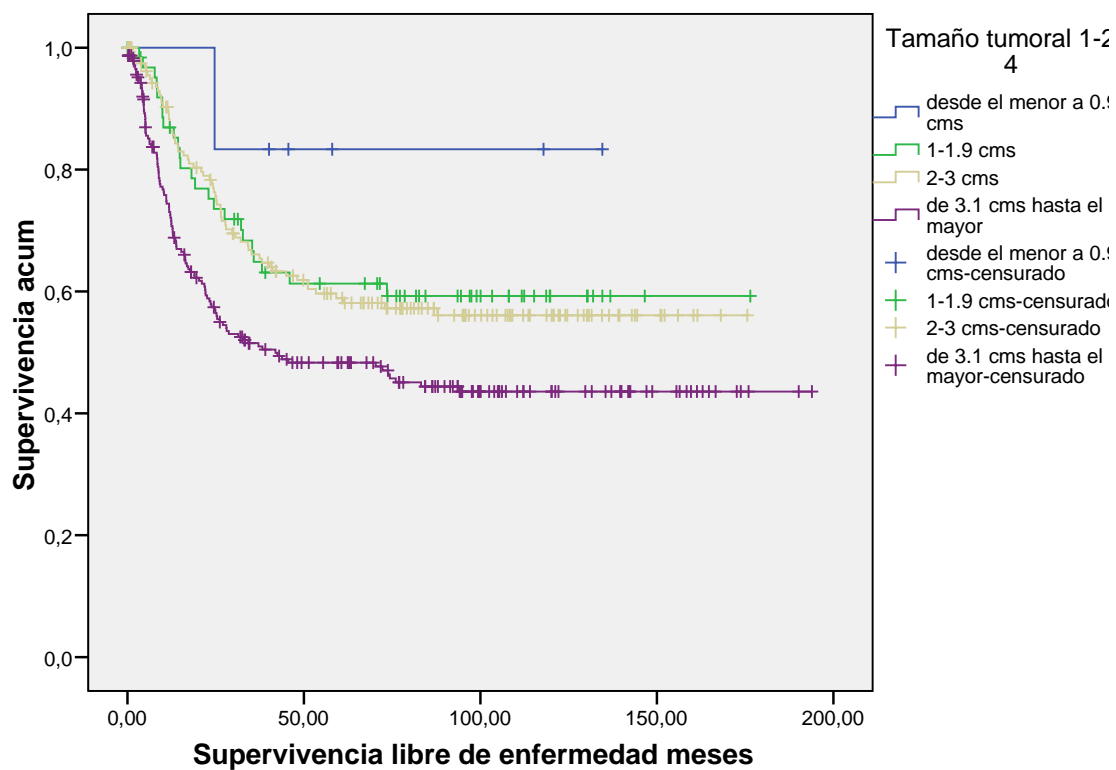
p=0,018

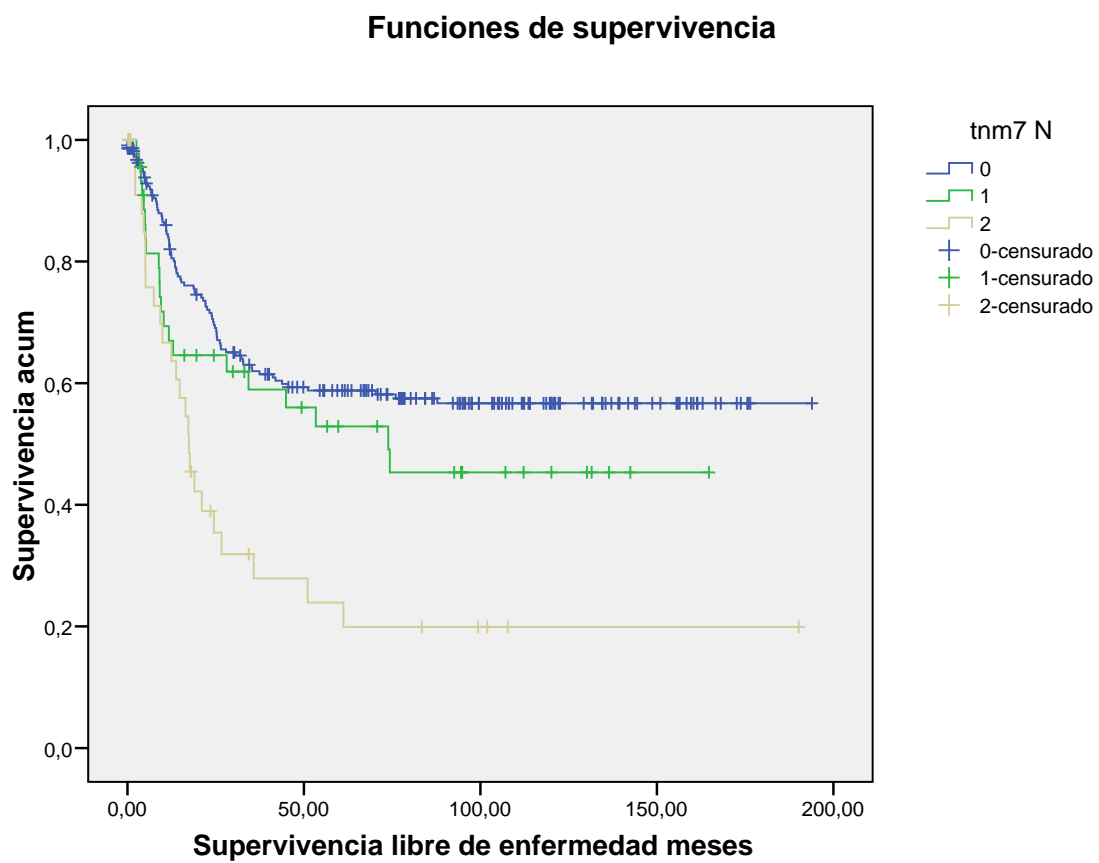
Supervivencia libre de enfermedad para diferentes niveles de Tamaño tumoral 1-2-3-4 cm

Tamaño tumoral	Libres de enfermedad	Evidencia de enfermedad	Total	% SLE
<0,9 cm	5	1	6	83,3
1-1,9cm	41	24	65	63
2-2,9 cm	99	65	164	60,3
>3 cm	117	118	235	49,8
	262	208	470	55,7

p=0,004

Funciones de supervivencia



Supervivencia libre de enfermedad para diferentes niveles de TNM N

P<0,001

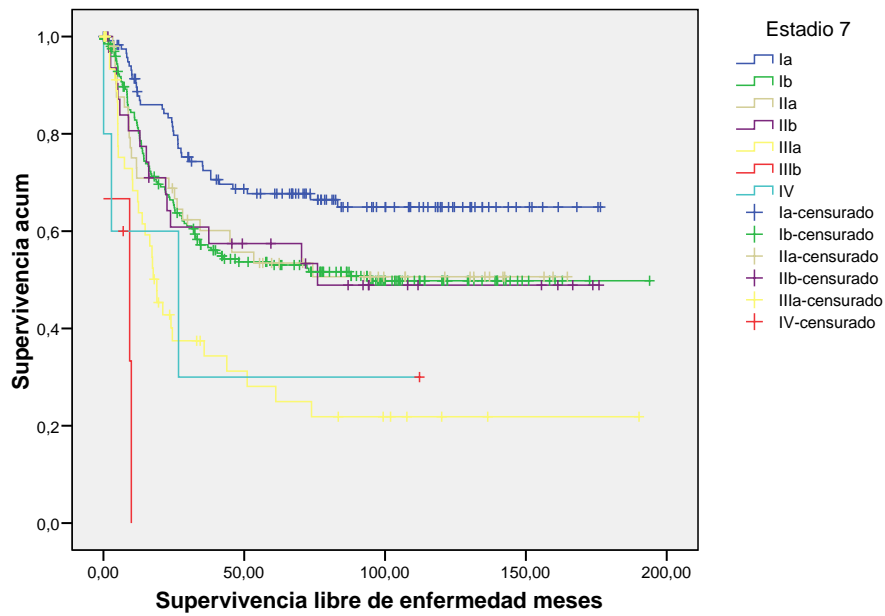
Supervivencia libre de enfermedad para diferentes niveles de estadio

La supervivencia libre de enfermedad está claramente relacionada con el estadio tumoral y resulta significativamente mejor para el estadio Ia que para todos los demás. Comparando sólo estadios I y II la diferencia no es significativa ($p=0,241$), pero desglosándolos en estadio Ia, Ib, IIa y IIb, el **estadio Ia tiene claramente mejor supervivencia mientras que la del Ib se asemeja a la del IIa y IIb** ($p=0,037$).

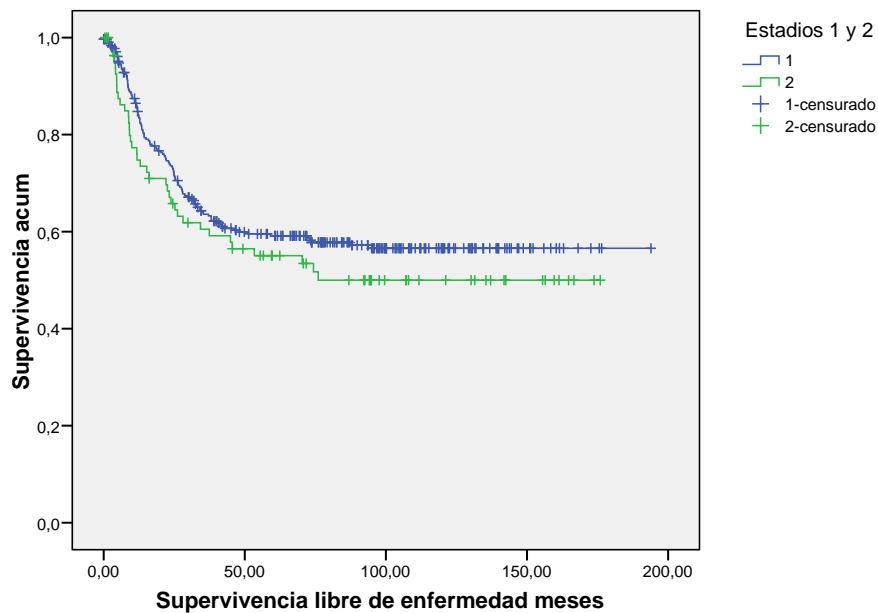
Estadio	Libres de enfermedad	Evidencia de enfermedad	Total	% SLE
Ia	83	36	119	69,7
Ib	111	91	202	55
IIa	29	23	52	55,8
IIb	17	15	32	53,1
IIIa	21	35	56	37,5
IIIb	0	3	3	0
IV	3	3	6	50
	264	206	470	56,1

$p<0,001$

Funciones de supervivencia



Funciones de supervivencia

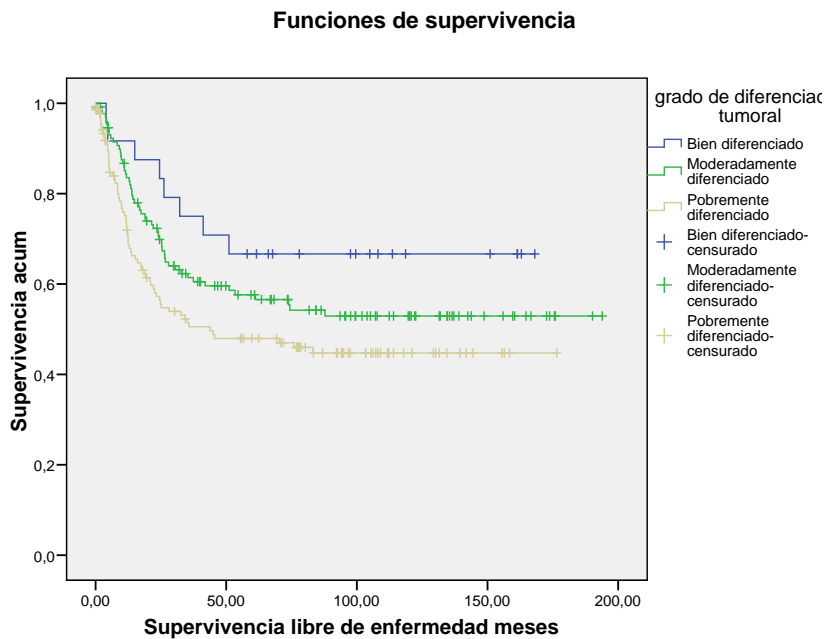


Supervivencia libre de enfermedad en relación con la edad y el sexo

La supervivencia libre de enfermedad con respecto a la edad y el sexo muestran tendencia estadística, aunque **no llegan a ser significativas** ($p=0,082$ y $p=0,093$ respectivamente).

Supervivencia libre de enfermedad en relación con el grado de diferenciación tumoral

Los tumores **bien diferenciados tienen mejor SLE** que los poco diferenciados, mientras que para los moderadamente diferenciados la supervivencia es intermedia.



$p=0,049$

Supervivencia libre de enfermedad para diferentes niveles de EXTENSION DE ATRAPAMIENTO ALVEOLAR

La SLE según la **extensión** del atrapamiento alveolar resultó significativa **dentro de los tumores que presentan atrapamiento**. Aquellos casos con **mayor extensión del atrapamiento alveolar tienen mejor SLE**. También en los estadios I y II es significativa pero en menor grado ($p=0,01$).

Extensión atrapamiento	Libres de enfermedad	Evidencia de enfermedad	Total	% SLE
1	2	7	9	22,2
2	7	7	14	50
3	54	38	92	58,7
	63	52	115	54,8

$p=0,008$

(Gráfico pg. 120)

La significación aumenta ($p=0,002$) cuando se comparan los casos de **extensión** de atrapamiento 1 con los de extensión 2 y 3 agrupados, es decir aquellos que tienen atrapamiento limitado a la periferia tumoral con respecto a los que lo presentan además hacia el interior de la neoplasia.

El resto de parámetros del atrapamiento no son significativos en lo que se refiere a la SLE.

Supervivencia para diferentes niveles de cicatriz

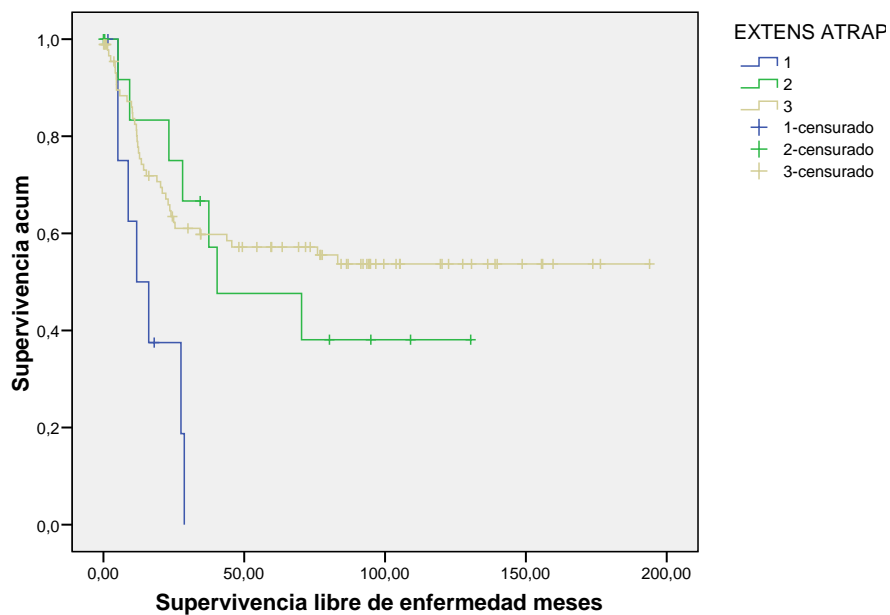
La presencia de **cicatriz tumoral** central está relacionada con **peor SLE** en estadios I y II. En cambio no existe diferencia significativa en cuanto a la supervivencia global ($p=0,634$).

Cicatriz	Libres de enfermedad	Evidencia de enfermedad	Total	% SLE
no	205	123	328	62,5
si	36	41	77	46,7
	241	164	405	59,5

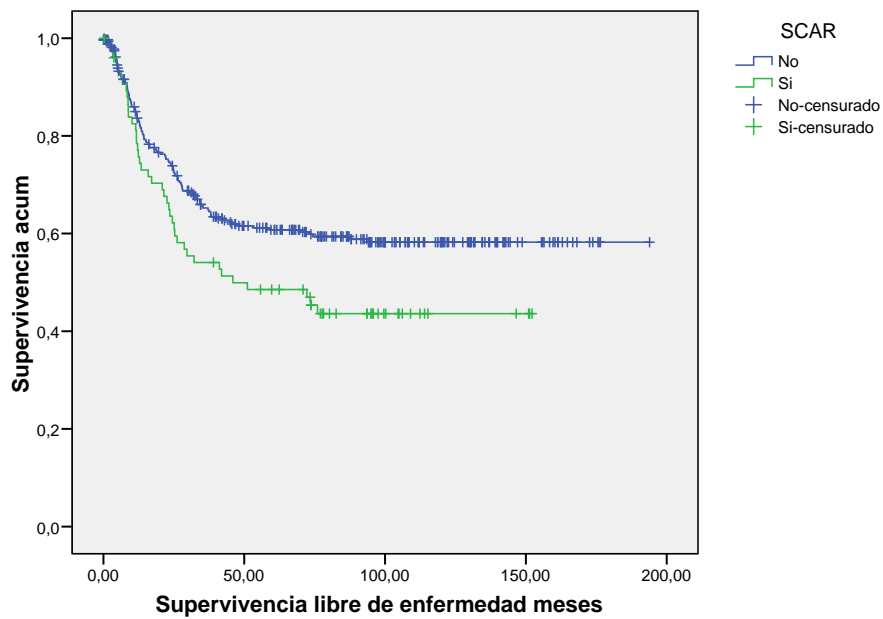
$p=0,025$

(Gráfico pg. 120)

Funciones de supervivencia



Funciones de supervivencia



Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con pérdida de expresión tumoral de la proteína del Grupo A

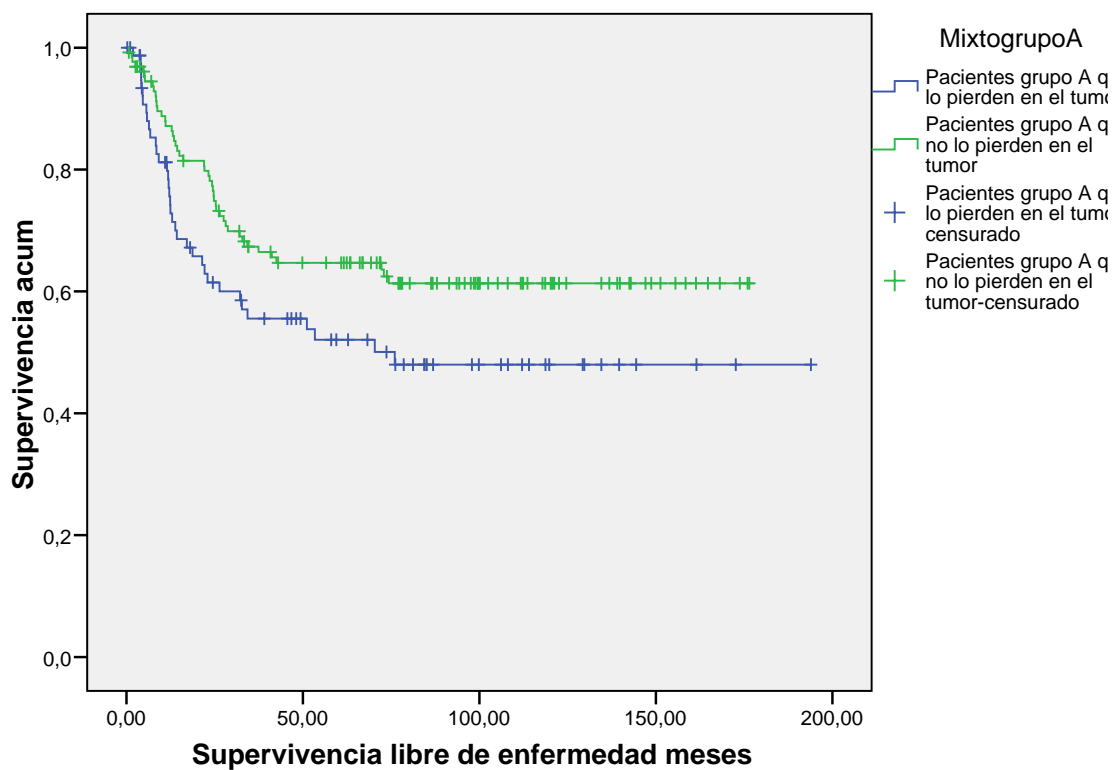
Los pacientes de grupo A en estadios I y II cuyos tumores muestran **pérdida de expresión para la proteína** en el estudio IHQ, tienen **peor SLE** que los pacientes del grupo A que tienen tumores que mantienen la expresión de la proteína ($p=0,049$). En la serie completa, incluyendo todos los estadios la significación es aún mayor ($p=0,017$).

En cambio comparado con todos los demás en conjunto (los del grupo A sin pérdida de expresión y los de otros grupos sanguíneos) dicha diferencia no es significativa ($p=0,48$).

Antígeno grupo A	Libres de enfermedad	Evidencia de enfermedad	Total	% SLE
Perdido en tumor	43	36	79	54,4
Conservado tumor	83	46	129	64,3
	126	82	208	60,6

$p=0,049$

Funciones de supervivencia



Estudio multivariante

Para el estudio multivariante se seleccionaron edad, grado diferenciación, atrapamiento alveolar (grado y extensión), diseminación interalveolar, pérdida expresión grupo A, TNM y estadio.

Resultaron significativos la edad mayor de 65 años ($p < 0,001$), el grado de diferenciación ($p = 0,014$), el nivel ganglionar N ($p < 0,001$) y el estadio ($p < 0,001$).

NO SON SIGNIFICATIVOS:

El **resto de parámetros** en la serie completa y en estadios I y II, supervivencia global y libre de enfermedad, características histológicas, resultados inmunohistoquímicos, supervivencia desglosada en cada uno de los estadios para Hsp70 y Hsp27 y todos los parámetros estudiados de cada uno (intensidad y % de células), combinación triple de Hsp27, grupoA y estadio, combinación triple de Hsp70, grupoA y estadio (todas las posibilidades dentro de cada uno), **no resultaron significativos**.

DISCUSIÓN

El carcinoma de pulmón es el segundo más frecuente entre los varones pero supone la mayor mortalidad global por cáncer.

A pesar de los múltiples los factores pronósticos estudiados en carcinomas pulmonares, algo tan sencillo como el estadificación es el más útil, tanto a la hora de determinar el pronóstico y supervivencia como para determinar qué pacientes son susceptible de recibir un tratamiento quirúrgico y quiénes no lo son (2).

Nosotros hemos estudiado varios factores histológicos y la expresión inmunohistoquímica del histoantígeno del grupo sanguíneo A y de proteínas de choque térmico con el fin de determinar si algunas de las características estudiadas están relacionadas entre sí y sobre todo si tienen relación con la supervivencia del paciente.

1. FACTORES HISTOLÓGICOS

Son numerosos los factores histológicos que clásicamente han sido estudiados en los carcinomas pulmonares, con resultados dispares, de forma que algunas características histológicas son significativas en varios estudios, mientras que esa significación no se demuestra en otros en los que se valoran esas mismas características.

Tipo histológico

El tipo histológico general del carcinoma pulmonar no microcítico clasificado como epidermoide, adenocarcinoma y otros en la mayoría de estudios no es significativo desde el punto de vista del impacto pronóstico **(69,78,130,131)**.

En cambio varios autores encuentran algunos tipos o subtipos tumorales cuya presencia tiene trascendencia pronóstica. Para algunos investigadores los carcinomas epidermoides tienen el doble de supervivencia que los adenocarcinomas y de célula grande (43% versus 21%) **(70)** y para otros los no escamosos muestran peor supervivencia **(72)**. El carcinoma de célula grande, y sobre todo el de células gigantes, también tienen peor pronóstico en algunos trabajos **(71)**. Otras variantes histológicas poco frecuentes como los carcinomas con fenotipo rabdoide conllevan también un curso clínico agresivo **(132,133)**. Entre los adenocarcinomas algunos trabajos muestran peor pronóstico en los que presentan patrón micropapilar **(134)**, o papilas en más del 25% de la neoplasia o un componente sólido **(75)**, teniendo la peor evolución clínica aquellos que además del componente sólido presentan también áreas mucinosas **(135)**.

En lo que parece haber un mayor acuerdo es en el buen pronóstico que conlleva el carcinoma bronquioloalveolar o crecimiento lepidico de las células tumorales a lo largo de los septos alveolares, respetando el estroma subyacente **(2,73,74,136)**. No obstante en los diferentes artículos varía el porcentaje de dicho patrón dentro de la totalidad del tumor a la hora de determinar la influencia sobre el pronóstico. Mientras en la clasificación de la OMS se acepta que la totalidad del tumor tiene que tener ese patrón **(2)**, para otros autores con más del 50% de la extensión de la neoplasia encuentran

mejor pronóstico (137,138) y en algunos la supervivencia es del 100% cuando el componente bronquioloalveolar es mayor del 75% (75).

Con respecto a otras características histológicas Sun (80) encuentra peor pronóstico en los carcinomas epidermoides con queratinización abundante y Yokose (75) no demuestra influencia pronóstica correlacionada con la mucina citoplásmica en las células tumorales de los adenocarcinomas.

Grado de diferenciación

El grado de diferenciación tumoral no tiene significado pronóstico en la mayoría de los trabajos (71,72,130,131), mientras que en otros encuentran valor para los adenocarcinomas (75,139) y de forma aislada en la serie completa incluyendo todos los tipos histológicos, tanto en el estudio univariable como en el multivariable (76).

En nuestra serie el tipo histológico no tiene correlación significativa con la supervivencia global ni SLE, tanto agrupándolos como tipos aislados como considerados en tres grupos: epidermoides, adenocarcinomas y otros. En cambio sí resultó significativo el grado de diferenciación histológica tumoral de manera que los bien diferenciados presentan una supervivencia de casi el doble que los moderada y pobremente diferenciados, mientras que entre estos no existe prácticamente diferencia. La SLE es también mejor, con menor rango estadístico y la significación se mantiene también en el estudio multivariable.

Invasión tejido peritumoral

La interfase del tumor con el tejido adyacente peritumoral es una zona de interacción entre neoplasia y la estructura normal del órgano donde asienta. Si dicha interfase es regular y nítida o invasiva no tiene influencia pronóstica (78), mientras que algunos trabajos demuestran peor pronóstico en los casos con crecimiento invasivo en la periferia tumoral (80). La diseminación interalveolar en la periferia del tumor, con los grupos tumorales avanzando de un alveolo al adyacente a través de los poros de Cohn sin destruir el tejido pulmonar, es un signo de buen pronóstico (140) en 5 carcinomas epidermoides periféricos que los autores consideran in situ al no observar signos de infiltración, sino un mero avance del tumor a través de esas estructuras anatómicas normales. En cambio cuando este tipo de crecimiento no es el exclusivo, si no que se asocia con invasión algunos autores no demuestran que tenga significado (141).

La mayoría de tumores en el presente trabajo (82,3%) presentan diseminación interalveolar en la interfase con el parénquima pulmonar normal, al menos de forma focal. Esos casos tienen supervivencia menor en la serie general pero deja de ser significativo cuando sólo se consideran los estadios I y II, aunque se encuentra próximo a la significación ($p=0,075$). Podría tratarse de una capacidad invasiva mayor de esas neoplasias avanzando en la periferia mientras que las que no tienen ese tipo de diseminación presentan menor grado de avance tumoral y por tanto menor agresividad, con una forma de crecer compresiva o con interposición de una interfase fibrosa pseudocapsular. No se observa diferencia significativa para la supervivencia libre de enfermedad.

Estroma tumoral y cicatriz

Tanto la cantidad del estroma tumoral como su cualidad o la organización que supone la formación de una cicatriz radial han sido estudiadas con diferentes resultados, aunque en general la presencia de desmoplasia como signo de fibrosis establecida y evolucionada, parece coincidir o suponer un tiempo largo de evolución tumoral. Para algunos autores las características del estroma no tiene influencia pronóstica (78) y tampoco la desmoplasia (71), pero esta última característica parece tener peor pronóstico en la mayoría de los trabajos donde se ha estudiado (75,79,80,142,143,144), desde el estudio inicial de Shimosato (142). La disposición central de la fibrosis confiere peor evolución (75).

Una forma específica del estroma o fibrosis es la presencia de cicatriz (scar). Aunque clásicamente se hablaba de un origen tumoral en las cicatrices como estructura que de alguna forma servía de base o asentamiento a la neoplasia (145), los antedichos trabajos de Shimosato (1980) (142) fueron iluminadores a la hora de determinar que se trata más bien de un cambio secundario y asociado con la neoplasia. La reparación de la necrosis y el colapso tumoral centrales dan lugar a la cicatriz que retrae el tumor y estructuras adyacentes produciendo la típica imagen estrellada. La presencia central de vasos esclerosados apoya el origen necrótico-reparativo de la cicatriz. Al evolucionar cronológicamente se produce un depósito sucesivo de colágeno de forma que las cicatrices de mayor edad contienen colágeno más denso, celular y organizado (desmoplasia) lo que supone mayor tiempo de desarrollo del carcinoma asociándose por tanto con un peor pronóstico. En este sentido cuando la cicatriz es menor de 0,5 cm en adenocarcinomas de menos de 3 cm se acompaña de supervivencia de prácticamente el 100% de los casos (75,146), sobre todo si se asocia con preservación de la trama de

fibras elásticas (75). Algunos artículos sin embargo no encuentran influencia en la evolución tumoral (71).

Nosotros hemos estudiado la cantidad de estroma en todos el tumor y en la zona de atrapamiento alveolar, en los casos que presentan esta característica, estando correlacionados entre sí, de manera que el estroma en la zona de atrapamiento es más abundante que en la zona tumoral que no contiene alveolos atrapados dentro de la tumoración. Dicho atrapamiento se encuentra localizado en la mayoría de casos en el seno de los nidos tumorales, de forma que no existe contacto directo entre las estructuras epiteliales atrapadas y el estroma. En los estudios en los que se refiere la característica del atrapamiento, no se hace mención de correlación entre el atrapamiento y el estroma u otras alteraciones mesenquimales (133,140,141,147-151) El atrapamiento no tiene tampoco correlación con la presencia de cicatriz en el tumor, encontrada en el 18,9% de casos. Desde el punto de vista de la supervivencia la presencia de cicatriz está relacionada con peor SLE en los estadios I y II, no siendo significativas para la supervivencia global ni en la serie completa incluyendo todos los estadios. Tampoco existe relación de la cantidad de estroma en el tumor o en la zona de atrapamiento con la supervivencia.

Necrosis

La necrosis es una característica bien reconocida en los tumores malignos. Ampliamente estudiada en los tumores pulmonares es un hallazgo frecuente aunque con resultados dispares desde el punto de vista del pronóstico. Numerosos trabajos encuentran significación pronóstica negativa en los casos que la presentan, sobre todo

de forma extensa, aunque la manera de evaluarla varía de unos autores a otros [Kessler (78) porcentaje de necrosis, Yokose (75) 0:1 ausente:presente, Maeshima (79) ausente:presente, Swinson (131) ausente, <10%, 10-30%, >30%, Mochizuki 2008 (141), <25%, 25-50%, 50-75%, >75%]. Otros autores en cambio no son capaces de demostrar significación pronóstica relacionada con la necrosis (71,72). En algunos trabajos los resultados son dispares según el tipo histológico como en el de Komaki (70) que estudian la apoptosis y observan mejor pronóstico en los carcinomas epidermoides que la presentan y en cambio peor pronóstico cuando los que muestran signos de apoptosis son adenocarcinomas o carcinomas de célula grande. Por otra parte la apoptosis es más frecuente en los epidermoides que en los otros tipos histológicos.

En nuestro estudio de la necrosis en el seno del tumor la hemos encontrado en el 78,5% de tumores siendo moderada o extensa en el 73,4% de estos. Se correlaciona con el grado de diferenciación de forma que los tumores peor diferenciados presentan mayor cantidad de necrosis y con el atrapamiento alveolar: a mayor atrapamiento, necrosis más abundante. No es útil en cambio para la supervivencia pues ni la general ni la libre de enfermedad están relacionadas con la necrosis.

Atrapamiento alveolar

El atrapamiento alveolar dentro de los cánceres pulmonares es un hecho bien conocido (133,140,141,147-151) aunque no extensamente estudiado desde el punto de vista pronóstico ni como factor de supervivencia. Es interpretado como una forma de interacción entre el tumor y el tejido pulmonar no neoplásico, de manera que el tumor en su evolución es capaz de crecer en los alveolos entre la membrana basal y el epitelio

alveolar, desprendiéndolo sin destruirlo y dejando la luz del alveolo, en general comprimida y con un diámetro menor del habitual, en el centro de los nidos tumorales, con un íntimo contacto entre las células neoplásicas y los neumocitos. Estos no parecen dañados ni necrosados **(148)**. En algunos casos, sobre todo en adenocarcinomas, los alveolos atrapados se encuentran además en las zonas de estroma tumoral entre los grupos de células cancerosas. Algunos alveolos son parcialmente destruidos de forma que ocasionalmente se encuentran luces incompletas o pequeños grupos de neumocitos residuales que se ponen mejor de manifiesto con tinciones inmunohistoquímicas para la apoproteína del surfactante pulmonar **(150)** o con el anticuerpo para TTF1 **(133)**. Este marcador es especialmente útil ya que la mayoría de carcinomas epidermoides y de célula grande son negativos. Este hallazgo habla a favor de una sustitución progresiva de dichas luces por el crecimiento tumoral en fases más avanzadas **(133)**. Son mucho más frecuentes en el carcinoma escamoso **(147,148)**, pero también han sido descritos en adenocarcinoma, carcinoma de célula grande, carcinoma pleomófico y carcinoma con fenotipo rabdoide **(133,141,147)**.

Este fenómeno ha sido estudiado generalmente como un hallazgo, pero en una serie de carcinomas pulmonares y su relación con el pronóstico sólo en el trabajo de Mochizuki **(141)** quienes lo encuentran en el 37% de los carcinomas pleomórficos que estudian, no demostrando influencia en el pronóstico de los tumores. Funai **(140)** encuentra el atrapamiento en los casos de carcinoma escamoso que muestra un patrón de relleno alveolar sin destrucción de los septos, patrón que se asociaba con mejor pronóstico aunque no estudian específicamente la característica histológica del atrapamiento alveolar.

Nosotros lo hemos encontrado más frecuentemente en carcinomas epidermoides donde también es más extenso y más abundante aunque este último aspecto no es significativo. Se encuentra más frecuentemente de forma significativa en tumores con necrosis abundante y en los poco diferenciados. Está también relacionado con la diseminación interalveolar, de forma que los tumores que crecen de un alveolo a otro a través de los poros de Cohn, sin destruir las paredes de los alveolos, parecen menos destructivos y por tanto más susceptibles también de preservar el revestimiento neumocitario e incluir incluso las luces completas dentro de los nidos tumorales o, menos frecuentemente, en el estroma entre los grupos del tumor. En cambio no existe correlación con la supervivencia ni con el estadio. Únicamente la supervivencia en estadios I y II es casi significativa ($p=0,057$), mejor en los que no presentan atrapamiento alveolar. Considerando sólo los casos con atrapamiento los que lo tienen en mayor extensión y en mayor abundancia presentan mejor supervivencia que los que lo tienen de forma escasa, tanto en los estadios I y II como si se contemplan todos los estadios. Se puede inferir por tanto que los tumores que son menos destructivos y conservan más luces alveolares en el seno tumoral y de forma más extensa tienen mejor supervivencia que los que conservan escasas estructuras alveolares o sólo en la periferia de la neoplasia, estando ausentes en el interior. Si se agrupan los grados de atrapamiento 2 y 3 y de la extensión del atrapamiento 2 y 3, y se compara con grado 1 y extensión 1 respectivamente, la significación estadística se hace incluso mayor de forma que los grupos 2 y 3 tienen un comportamiento casi similar y claramente diferente del grado 1 y extensión 1. No se observa en cambio diferencia entre los grupos 2 y 3 entre sí. En cuanto a la SLE es sólo significativa para la extensión del atrapamiento, tanto si se incluyen todos los estadios como en estadios I y II. También aumenta la significación si se compara la extensión tipo 1 con el 2 y 3 agrupados.

Los grupos 2 y 3 de atrapamiento presentan una supervivencia similar a la de la serie completa, de forma que la supervivencia peor radica sobre todo en el grupo 1 tanto de grado de atrapamiento como de extensión del mismo.

2. GRUPO SANGUINEO A

El sistema de grupos sanguíneos ABO está regulado por varios genes. El fenotipo del grupo O viene caracterizado por el oligosacárido H sin modificar, que a su vez constituye la base de la que derivan los oligosacáridos específicos del grupo A y B por elongaciones terminales diferentes y específicas de cada uno de los grupos A y B a partir del oligosacárido H. Este proceso se realiza por medio de glicosiltransferasas específicas A y B codificadas respectivamente por los alelos A y B del locus ABO, localizados en el cromosoma 9. Dichas enzimas actúan sobre el oligosacárido H, producto de otra glicosiltransferasa codificada por el gen H localizado en el cromosoma 19 **(152)**. Según el genotipo del sujeto el enzima es diferente y se traduce en una expresión fenotípica de grupo sanguíneo diferente: A, B ó 0 respectivamente. Estas moléculas forman parte de glicoproteínas y glicolípidos unidos al componente proteico o lipídico correspondiente **(152)**. Este proceso se realiza por enzimas oligosacárido-transferasas que transfieren “en bloque” el oligosacárido previamente formado al otro componente proteico o lipídico de la molécula.

Como es bien conocido las moléculas de los grupos sanguíneos son detectadas en las células sanguíneas, principalmente por serología, pero también se expresan ampliamente en tejidos no hematopoyéticos **(153)** dependiendo del status secretor del individuo **(154)** y de la diferenciación del epitelio **(155)**. Están presentes en numerosas moléculas de la superficie celular, con amplia variedad estructural y funcional. Esquemáticamente, todo el conjunto de antígenos de grupos sanguíneos, se dividen en cinco categorías funcionales **(153)**:

- i) transportadores y canales
- ii) receptores para ligandos, virus, bacterias y parásitos
- iii) moléculas de adhesión
- iv) enzimas
- v) proteínas estructurales

El sistema ABO tiene función predominantemente como receptores y como enzimas.

Dentro del proceso de diferenciación que ocurre en las células epiteliales se produce la glicosilación de diferentes antígenos epiteliales, de manera que los tejidos normales expresan antígenos de grupo sanguíneo. Este patrón de expresión puede variar en el proceso de transformación neoplásica de manera que es diferente en las células premalignas y malignas con respecto a sus correspondientes en el tejido normal o no neoplásico, produciéndose lo que se denomina glicosilación anómala que se traduce en una expresión glicoproteica, y por tanto de grupo sanguíneo, diferente por parte de las células tumorales.

Este hecho es bien conocido y ha sido investigado en numerosos tejidos y tumores, tanto para entender y describir las alteraciones de expresión, que traducen anomalías en la glicosilación, como en implicaciones pronósticas en algunos tipos de tumor o de localización u origen neoplásico.

Reducción o pérdida de expresión antigénica se ha descrito en carcinomas de cavidad oral, pulmón, estómago, colon, laringe, ovario, vejiga y mama, y en lesiones potencialmente malignas de mucosa gástrica, próstata, mucosa cervical, hiperplasia

epitelial de mama y mucosa oral (**156,157**), estando relacionada con la infra-regulación de la glicosiltransferasa implicada en la biosíntesis de los antígenos A y B durante la oncogénesis (**158,159**). Esta pérdida de expresión llega hasta un 80% de casos en los carcinomas de la cavidad oral (**160**).

A este respecto están también en relación con la migración tumoral como corresponde a la observación de que al igual que las células normales en migración también las tumorales presentan pérdida de expresión de antígenos A/B (**155**). Las células que migran en la reparación de heridas en cavidad oral presentan igualmente esa pérdida de expresión de antígenos A/B (**161**). Esos mismos estudios indican que la expresión de antígenos A y B inhiben la migración y podrían explicar en parte el hecho de que los tumores que expresan antígeno A tengan mejor pronóstico que los pacientes del grupo 0, por tanto negativos para el antígeno A (**155**).

En mama por ejemplo aunque la expresión de Le (x) se asocia con mal pronóstico, algunos autores no encuentran esta asociación para la expresión de ABH (**162**). Otros en cambio describen peor pronóstico en las pacientes de grupo A, especialmente con Rh (-) (**163**). También se ha encontrado asociación de tumores de menor tamaño (<2cm) con la expresión de grupo A y B, aunque sin influencia sobre la supervivencia (**164**).

Estudios epidemiológicos amplios realizados en cáncer pancreático han mostrado que pacientes del grupo sanguíneo A, AB o B tienen mayor probabilidad de desarrollar un carcinoma pancreático que los del grupo 0 (**165,166**). Iodice (**166**) encontraba esta asociación sólo en carcinomas exocrinos pancreáticos y no en otros tipos de tumores entre los 15359 tumores totales tratados en su centro en 3 años. También en carcinoma gástrico los pacientes del grupo A tienen mayor riesgo de desarrollarlo (**167**). Xie (**168**) por el contrario, en tumores de piel encuentra una disminución del riesgo de padecer

cáncer cutáneo (exceptuando el melanoma) en pacientes que tienen grupo sanguíneo diferente del 0 (A, B, AB). Esta asociación no la encuentran con el melanoma. De Giorgi (169) en cambio encuentra riesgo aumentado de desarrollar melanoma en pacientes del grupo 0, Rh(-).

Gates (170) encuentra presencia de antígeno B positivamente asociada con incidencia de carcinoma de ovario. Asociación que no se encuentra en relación con el grupo A.

Han sido varios los estudios realizados en **tumores pulmonares**. Inicialmente se encontró pérdida de expresión de antígenos de grupo ABH en los carcinomas pulmonares (94), aparte de su expresión en tejido normal y neoplásico (83), en este con menor intensidad, además de demostrarse acumulación de precursores. Así se ha encontrado pérdida de expresión de antígenos de grupo sanguíneo en lesiones intraepiteliales de alto grado en mucosa bronquial (171), también en comparación con las zonas de metaplasia escamosa del epitelio bronquial (84).

Estos estudios adquirieron relevancia al demostrar Lee (97) que la pérdida de expresión de antígeno del grupo A en carcinomas no microcíticos de pacientes de dicho grupo sanguíneo o del AB, tenían supervivencias significativamente más cortas que los que conservaban la expresión. Los resultados posteriores no han sido tan constantes pues junto a trabajos que confirman el hallazgo e incluso lo demuestran como el factor predictivo negativo más importante respecto a la supervivencia (98), otros no encuentran esta correlación con la supervivencia en general (101) o en estadios precoces

(100). Graziano (172) en un estudio posterior de pacientes en estadio IB con tratamiento quimioterápico tampoco encuentra correlación pronóstica con la expresión de grupo A.

Ulger (173) en una serie de 92 casos observa que los tumores A+ y los pacientes del grupo sanguíneo A tienen un pronóstico significativamente mejor que los que no pertenecen a este grupo sanguíneo y Kuemmel (174) en una serie de 83 casos (estadios I-IIIa) encuentra que los pacientes de grupo A y AB tienen mejor supervivencia, sobre todo asociado a positividad para Lewis Y, aunque este estudio es serológico y no inmunohistoquímico.

Estos resultados y los nuestros sugieren, por tanto, que en pulmón el hecho de tener el grupo A conllevaría en general mejor pronóstico, el fenómeno opuesto al que se encuentra en tumores pancreáticos, como ha sido reseñado arriba, aunque para sacar alguna conclusión rigurosa en este sentido habría que realizar estudios amplios de población como se han realizado en los carcinomas de páncreas.

RESUMEN RESULTADOS GRUPO A EN CARCINOMAS PULMONARES

AUTOR	Nº CASOS	RESULTADOS	CONCLUSIONES
Lee et al. 1991 (97)	164. 68 estadio I 32 estadio II 64 estadio III	71 pacientes A y AB +. 43 tumores A+ (71 meses de supervivencia). 28 tumores A- (15 meses de supervivencia) 93 B ó 0 (39 meses supervivencia)	La expresión de Ag de grupo A es un factor pronóstico favorable. Supervivencia más corta si pierden el Ag A La reducción de la supervivencia es más marcada en estadios precoces. En los avanzados no es significativo.
Rice et al. 1995 (100)	103 casos est I Todos grupo A o AB 52 adenoCAs 25 epidermoides 24 CA célula grande 2 adenoescamosos	89 pacientes grupo A, 14 grupo AB 57% tumores A+ 33% tumores A-. Supervivencia global: 75% a 3 años y 66,6% a 5 años.	Los tumores que pierden la expresión de grupo A son más indiferenciados (grado 3) o de célula grande. No es estadísticamente significativa la relación con supervivencia.

AUTOR	Nº CASOS	RESULTADOS	CONCLUSIONES
Dressler et al. 1995 (101)	136 casos T1N0 (estudio en 120) 73 adenos 39 epid 8 indif cel grande	47% pacientes A+. Supervivencia 5 años A+: 53%. Tumores A+:52%. Tumores A-:34% (no significativo)	No resultados estadísticamente significativos. Concluyen que la pérdida de expresión de Ag de grupo sanguíneo (A ó H) no influye en el pronóstico.
Graziano et al. 1997 (98)	260 casos 193 estadio I 67 estadio II	60% A+ 98 meses super est I 70 meses est II. 40% A-: 41 meses superv estadio I 37 meses est II.	La pérdida de expresión de Ag de grupo A empeora significativamente la supervivencia global y la libre de enfermedad.

AUTOR	Nº CASOS	RESULTADOS	CONCLUSIONES
Ulger et al. 2002 (173)	92 casos 77 no microcíticos (34 estadio IV) 15 microcíticos	Pacientes Gr A (37) > superv (p=0,04) Tumor Gr A + (26) (p=0,0019)	Casos + para ag A supervivencia más prolongada. Factor pronóstico favorable, útil para estratificar pacientes
Presente serie	470 casos 405 estadios I y II 65 estadios III y IV	37% de pacientes del grupo A (90/243) pierden expresión en tumor	Tumores + grupo A mejor supervivencia (no signif: p=0,056). Pérdida de histoantígeno A peor supervivencia (p=0,017)

DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE NUESTRA SERIE. GRUPO SANGUINEO A

En nuestra serie el 51,7% de los tumores asientan en pacientes del grupo A, de los cuales un 37.03% presentan pérdida de expresión del antígeno en el tumor, en el estudio inmunohistoquímico realizado, más frecuentemente en epidermoides (37,6%) que en adenocarcinomas (29,8%). En cambio sólo uno de los pacientes que no pertenece al grupo A muestra expresión de dicho antígeno en el tumor.

En los casos en que se encontraba atrapamiento alveolar, este se ponía de manifiesto debido a positividad del epitelio alveolar con el antígeno de grupo A, en aquellos casos en los que el tumor presentaba pérdida del antígeno y era por tanto negativa la tinción, pues cuando el carcinoma era también positivo dicha tinción se solapaba y no ayudaba a discriminar la estructura atrapada. No obstante en algunos casos la tinción de los alveolos era más intensa y permitía discriminar su contorno sobre el fondo del tumor también positivo.

La correlación de la expresión o pérdida de histoantígeno de grupo A, o la pertenencia del paciente a dicho grupo, con las características histológicas estudiadas y la expresión de Hsp27 ó Hsp70 no resultaron estadísticamente significativas.

Los tumores positivos para la proteína del grupo A en el estudio inmunohistoquímico muestran mejor supervivencia global, próxima a la significación estadística ($p=0,056$) comparados con los tumores negativos. En cambio el hecho de que los pacientes sean del grupo A o no, independientemente de si expresan o no el histoantígeno, no es significativo para la supervivencia global ni libre de enfermedad.

Los pacientes de grupo A con pérdida de expresión para el antígeno en el estudio inmunohistoquímico tienen peor supervivencia global que los pacientes del grupo A que mantienen la expresión de la proteína en toda la serie ($p=0,017$) y en los estadios I y II ($p=0,02$). La significación se mantiene para la supervivencia libre de enfermedad pero en menor grado ($p=0,017$ y $p=0,049$ respectivamente).

Comparando la supervivencia global de los casos que tienen pérdida de antígeno del grupo A con todo el resto de casos de la serie (pacientes del grupo A sin pérdida de expresión y pacientes de otros grupos sanguíneos) la diferencia sigue siendo significativa aunque en un rango menor ($p=0,048$).

3. PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO

Las proteínas de choque térmico son una superfamilia de proteínas ampliamente conservadas a todo lo largo de la escala filogenética de manera que son encontradas desde bacterias hasta las especies más evolucionadas. Recibieron este nombre porque fueron descubiertas al incubar células de *Drosophila melanogaster* a temperatura elevada (37° C), encontrándose la aparición de nuevos nodos en sus cromosomas que se correspondían con un aumento de síntesis de unas proteínas de 26 y 70kDa **(106)**. Posteriormente se comprobó que el aumento de la síntesis de esas proteínas no sólo se producía ante el estímulo térmico sino que otros agentes químicos, metales pesados, radiación, estrés oxidativo, fármacos citotóxicos, infecciones o isquemia (anoxia) también inducían dicha síntesis **(175-177)**, teniendo en general una función citoprotectora. Su expresión en condiciones fisiológicas es baja lo que permite y facilita la actividad celular habitual pero su síntesis es inducida intensamente por los diversos estímulos, de manera que algunas proteínas se encuentran constitutivamente en las células en actividad fisiológica habitual mientras que otras se expresan inducidas por alguno de los estímulos referidos. Tienen también un papel en la diferenciación celular.

Se dividen en 5 familias según su peso molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSPs de bajo peso molecular (15–30 kDa) incluyendo HSP27 **(178)**. En general las de alto peso molecular funcionan como chaperonas ATP dependientes, protegiendo otras proteínas de su degradación por alguna de las agresiones citadas y facilitando el plegamiento correcto de la cadena de aminoácidos **(179)** pero sin ser un elemento constitutivo de esa proteína. Las de bajo peso molecular en cambio realizan

esa función de chaperona independientemente del ATP. Hsp27 y Hsp70 son las chaperonas más universales y son inducidas de forma más intensa.

Sus niveles en células malignas son elevados por lo que se cree que participan en la oncogénesis y resistencia a quimioterapia, esta sobre todo relacionada con la capacidad citoprotectora ante la acción de los fármacos citotóxicos **(180)**. Por tanto la inhibición de estas proteínas puede ser una estrategia futura en el tratamiento neoplásico.

Función como chaperonas

Las proteínas de la familia HSP70 funcionan como chaperonas dependientes de ATP que colaboran en el plegamiento y ensamblaje de complejos proteicos **(104)**. Esta actividad está regulada por cochaperonas variando la afinidad de HSP70 para los diversos sustratos.

Las proteínas de bajo peso como HSP27 y α -cristalina realizan su función de chaperonas protegiendo las células de la agregación proteica de forma independiente del ATP **(181)**. La actividad la realizan gracias a la formación de oligómeros de Hsp27 **(182)**. Esta formación de oligómeros se realiza por medio de la fosforilación de la proteína **(183)**, acción realizada a través de la acción de MAPKAP quinasas en respuesta a varios estímulos de estrés **(184,185)**. También puede desarrollarse la oligomerización a través de otros estímulos diferentes de esa fosforilación.

Función en la reacción inmune

También muestran cierta actividad en la reacción inmune ya que algunos antígenos pueden formar complejos al unirse con las proteínas de choque que intervienen en la vía de presentación antigénica relacionada con el sistema de antígenos de histocompatibilidad de clase I **(186)**. La presentación de antígenos tumorales a células inmunoefectoras produce la inducción o activación de linfocitos T específicos antitumorales **(187)**. El estímulo de producción de citoquinas realizado por Hsp70 también se encuadra dentro de esa relación con la respuesta inmune **(188)**.

En lo que se refiere a esta implicación en la respuesta inmune se ha encontrado asociación con diversas patologías inflamatorias como asma, bronquitis crónica o síndrome de distress respiratorio del adulto en los que se hallan niveles elevados de Hsp70 en epitelio y macrófagos pulmonares **(189,190)**. En enfermedades tiroideas autoinmunes se ha demostrado también aumento de Hsp72 **(191)** y en enfermedad hepática alcohólica asimismo están aumentados varios componentes de esta familia de proteínas **(192)**.

Función de inhibición de la apoptosis

Entre sus acciones de protección celular más importantes se encuentra la inhibición de la muerte celular por apoptosis. Esta tiene dos vías una intrínseca y otra

extrínseca. Ambas Hsp27 y Hsp70 actúan sobre efectores de ambas vías a diferentes niveles.

Hsp70 bloquea la vía de la apoptosis previa y posterior a la mitocondria inhibiendo las quinasas activadas por estrés **(193)**, mediando la protección contra la inducción de muerte celular del TNF **(194)**. A nivel mitocondrial previene la permeabilización de la membrana y evita la traslocación de Bax y la liberación de citocromo c y AIF (factor inductor de apoptosis) **(195)**. En el nivel post-mitocondrial inhibe la apoptosis entre la liberación del citocromo c y la activación de caspasa-3 **(196)**. También interactúa con procaspasa-3 y procaspasa-7 inhibiendo la señal apoptótica dependiente de caspasa **(197)**.

La proteína reguladora de la apoptosis Bag-1 interactúa con Hsp70 funcionando como su cochaperona y regulando la actividad de proteínas como Bcl-2 y Raf-1 **(198)**. Finalmente también inhibe la permeabilidad de la membrana lisosomal impidiendo la liberación de catepsinas **(199,200)**.

Hsp27 en cambio actúa como inhibidor de caspasa-3 previniendo la formación del apoptosoma y de la activación de caspasas **(201)**. Puede además captar el citocromo c cuando es liberado desde la mitocondria **(202)**. Presenta también una potente acción antioxidante debido a su capacidad de mantener el glutatión en su forma reducida (no oxidada) **(203)**.

También degrada el inhibidor de NFκB y el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina (p27^{kip1}) **(204)**, potenciando de ese modo la actividad de ambos factores.

Por otra parte cuando no es posible la reparación proteica también pueden colaborar en la degradación de proteínas mal plegadas a través del sistema

ubiquitina/proteosoma (G90) **(205)**. La ubiquitinización de las proteínas las “marca” para ser degradadas por el sistema de las diferentes unidades de proteosomas. De esta forma contribuyen a la degradación rápida de proteínas no deseadas o defectuosas, facilitando la supervivencia celular. Estas acciones se realizan interactuando directamente con ubiquitina o subunidades de proteosomas por parte de Hsp27 o a través de cochaperonas en caso de la Hsp70.

Hsp70 y Hsp27 en cáncer

La acción citoprotectora de Hsp27 y Hsp70 sobre las diferentes estructuras normales del organismo parece tener un efecto negativo a la hora de preservar la integridad celular en el caso de los elementos neoplásicos de manera que se han encontrado niveles elevados de ambas proteínas en células tumorales y se ha comprobado el aumento del potencial de génesis tumoral en modelos animales **(206,207)**, relacionado con la capacidad de inhibición de la apoptosis por parte de estas proteínas, pero también relacionado con el potencial metastásico **(208)**.

Desde el punto de vista de la patogénesis de este aumento de las proteínas de choque en las células tumorales puede ser explicado por las condiciones subóptimas del entorno celular que desencadenan la síntesis de estas proteínas, como son la hipoxia y el déficit relativo de nutrientes **(207,209)**, o bien porque las mutaciones oncogénicas dan lugar a proteínas anormalmente plegadas que requieren un aumento de actividad de chaperonas para ser eliminadas o reparadas. El incremento de diferentes factores producido por la propia oncogénesis como el HSF1, Stat3 o GATA-RE aumentan el

nivel de proteínas de choque en las células tumorales **(210-212)**. Por otra parte la actividad antiapoptótica limita la eficacia del tratamiento anticanceroso haciendo resistentes las células tumorales tanto a la quimioterapia como a la radioterapia. Sin embargo Hsp27 y Hsp70 no son factores pronósticos universales y constantes sino que existen resultados contradictorios en cuanto a dicha influencia.

Hsp70 y Hsp27 como dianas farmacológicas (terapia de modulación de apoptosis en cáncer).

La neutralización de las proteínas de choque es una posibilidad terapéutica para el cáncer. La mayoría de inhibidores específicos encontrados hasta ahora son contra Hsp90. El producto KNK437 es un inhibidor de Hsp70 y de termotolerancia. La inducción de producción de productos “antisense” de Hsp70, que disminuye la concentración intracelular de la proteína, tiene propiedades de sensibilización de las células tumorales a la quimioterapia e incluso puede conducir a la muerte celular **(213,214)**. También es una diana terapéutica útil por el hecho de que al inhibir Hsp70 consiguientemente se bloquea su capacidad de inhibición de la apoptosis **(212,215)**. Sin embargo no se conocen moléculas que inhiban directamente Hsp70. Por eso se han intentado métodos indirectos como péptidos derivados de AIF que disminuyen la capacidad antiapoptótica de la proteína de choque y aumentan la sensibilidad a quimioterapia, en estudios in vitro **(216)**. El uso de estos compuestos en combinación con inhibidores de HSP90 aumenta la quimiosensibilidad del tumor **(217)**.

En cuanto a Hsp27, oligonucleótidos “antisense” de fosforotiorato de Hsp27 son activadores de la apoptosis y retrasan la progresión tumoral (218). La acción de evitar la resistencia a varios quimioterápicos por parte del taxol se ha sugerido que se realiza in vitro por inhibición de Hsp27 (219) y el bloqueo de la proteína por el heptapéptido V5, catalítico de PKC δ puede ayudar a desactivar la radio o quimoresistencia mediada por Hsp27 (220). En los linfomas y mielomas resistentes a dexametasona, Hsp27 está sobreexpresado y la infraexpresión por siRNA restablece la respuesta apoptótica por medio de la activación de caspasas (221). Además la inhibición de Hsp27, que también induce resistencia a bortezomib, sensibiliza las células tumorales a la acción apoptótica de dicho fármaco (221).

Expresión de Hsp27 y Hsp70 en neoplasias no pulmonares

En cuanto a la expresión de proteínas de choque térmico en neoplasias han sido estudiadas en numerosos casos de diferentes tipos y órganos de origen, en general con resultados no uniformes y a veces incluso contradictorios. Se han estudiado múltiples aspectos clínicos como el valor de estas proteínas para el diagnóstico, la importancia como factor predictivo y sus implicaciones en la terapia tumoral (222). Varios trabajos comparan también la expresión tumoral con la encontrada en órganos normales y otros han valorado la cuantificación de niveles de Hsp27 en suero como biomarcador útil en CA de mama, próstata o hígado (223-225) o incluso anticuerpos anti-Hsp en sangre periférica como parámetro para detección de los tumores (226,227).

En **cavidad oral** se ha encontrado expresión de Hsp70 entre el 63,3% y 74% de casos. Los T2 que la expresan tienen una supervivencia 8 veces mejor que los negativos, por lo que estos requerirían una terapia más agresiva **(228)**. En cambio en otras series es un signo de mal pronóstico y está correlacionado con el grado tumoral y de displasia, de forma que al aumentar ambos se incrementa también la expresión de esta proteína, encontrándose también relacionada con el estadificación, el consumo de tabaco y nuez de betel, con un tiempo de progresión de lesión intraepitelial a invasiva más corto y con menor supervivencia libre de enfermedad **(229,230)**.

En esta localización más del 90% de tumores expresan Hsp27 y se ha encontrado aumento de esa expresión en tumor metastásico comparado con el primario (RT-PCR) estando relacionado con la capacidad metastásica y convirtiendo la Hsp27 en una posible diana terapéutica para disminuir la capacidad de metastatizar en estas neoplasias **(231)**. Mese **(232)** también encuentra periodo de supervivencia más corto en los casos positivos, sobre todo con expresión intensa, pero sin relación con el grado, estadio o metástasis ganglionares. En cambio otros autores encuentran disminución de la expresión de Hsp27 (inmunohistoquímica) en casos poco diferenciados, mostrando mejor supervivencia media los que presentan mayor expresión de la proteína **(233-235)**. Lo Muzio **(235)** (inmunohistoquímica) también encuentra correlación con metástasis ganglionares. Otros autores no encuentran relación con supervivencia para ninguna de las proteínas que estudian (Hsp 27, 60, 70 y 90) **(236)**.

La **mama** ha sido uno de los órganos más estudiados con respecto a la expresión de proteínas de choque y sus implicaciones clínicas y pronósticas. Se ha encontrado un aumento significativo de la concentración celular de Hsp27 y Hsp70 en el proceso de transformación neoplásica en tumores mamarios **(237)**. Hsp27 se expresa entre el 40 y

el 64% de casos y esta expresión es alta en tumores HER-2/neu positivos, principalmente la forma fosforilada ya que HER-2/neu regula la fosforilación de Hsp27 a través de la vía MAP quinasa (238). También se correlaciona con otros parámetros clínicos como son la presencia de ganglios positivos (238), supervivencia libre de enfermedad más corta en los estadios iniciales (239), como un predictor de enfermedad de alto riesgo (240), con un menor grado histológico (241) y con la expresión de receptores de estrógenos (239,241-243), receptores de progesterona y aneuploidía (243). Estos hallazgos relacionados con los receptores hormonales, sobre todo de estrógenos, confirman la naturaleza hormonodependiente de la Hsp27 en mama. De hecho parece que corresponde a la proteína previamente descrita como p29, un elemento citoplásmico asociado con el receptor de estrógenos (244). Por el contrario en otros trabajos la positividad para Hsp27 caracteriza un subgrupo de buen pronóstico entre pacientes con tumores negativos para receptores de estrógenos (242). En cambio algunos autores no encuentran correlación con el tamaño tumoral, supervivencia general o libre de enfermedad ni valor pronóstico en pacientes con ganglios axilares negativos (243) mientras otros demuestran lo contrario: supervivencia acortada en pacientes con ganglios axilares negativos (245).

En conjunto los resultados de Hsp27 como marcador pronóstico en carcinoma de mama son variables. Aunque la mayoría lo consideran un marcador desfavorable (239,246), otros no encuentran correlación (247) y aún otros la refieren como marcador de buen pronóstico (242,248).

Con respecto a Hsp70, son positivos un 75% de casos y los casos positivos (en citoplasma; nuclear 45% de casos) asociados con negatividad para p53 presentan una mejor supervivencia global (128) no teniendo en cambio relación con la supervivencia

libre de enfermedad ni otros parámetros (128). Con western blot la elevada expresión se asocia con menor supervivencia libre de enfermedad, especialmente en tumores que miden entre 1 y 3 cm (249). Por el contrario la infraexpresión de Hsp70 inhibe la progresión tumoral inducida por Her2/neu (250). En lo que se refiere a la terapia también se ha encontrado que la disminución de Hsp70 en pacientes tratadas con inhibidores de aromatasa se asocia con mejor respuesta terapéutica que las que no presentan dicha disminución (251), estando por tanto relacionada con los mecanismos moleculares.

Genital femenino: Langdon (252), con la técnica de ELISA, encuentra menor concentración de Hsp27 en tumores ováricos benignos que en los malignos, y de estos la expresión mayor se correspondía con estadio tumoral más avanzado, menor supervivencia y mayor resistencia a la quimioterapia. También está correlacionada positivamente con la expresión de receptores de estrógenos pero no con los de progesterona. Otros autores hallan expresión de Hsp27 en el 86% de los carcinomas, encontrando únicamente que los tumores negativos se asociaban con mayor supervivencia libre de enfermedad, sin asociación con otros parámetros clinicopatológicos (253). Por el contrario otros grupos encuentran correlación de la disminución de expresión con estadios más avanzados y peor supervivencia, pero no con grado ni con tipo histológico (254,255). Elpek (256) concluye que dada la discordancia entre las diferentes series serían necesarios estudios amplios a gran escala para confirmar los resultados. También se observan hallazgos contradictorios en lo que se refiere a la proteína Hsp70 pues así como algunos autores encuentran asociación de su expresión con agresividad en carcinomas ováricos (257) otros no encuentran valor pronóstico en su expresión (256).

En carcinoma endometrial se encuentra Hsp70 en 50% de carcinomas, asociado con peor supervivencia **(258)**. Hsp27 en cambio presentaba mayor tinción en carcinomas de tipo endometriode, en los mejor diferenciados y con menor estadio clínico, además de ser un factor predictivo positivo de supervivencia **(129)**.

En endocérvix se encuentra expresión progresiva de Hsp27 en lesiones de mayor entidad siendo mínima en glándulas normales (10%), incrementándose en lesiones de tipo metaplásico (35%) y resultando mayor en neoplasias, sea intraepiteliales (60%) o invasivas (40%), aunque en estas no guarda relación con el grado tumoral, afectación ganglionar ni invasión linfovascular **(259)**. No parece estar relacionada con la proteína p16 por lo que es poco probable que la sobreexpresión de Hsp27 en cérvix esté mediada por papilomavirus **(260)**. En exocérvix los resultados son superponibles con expresión aumentada de Hsp27 en lesiones intraepiteliales o invasivas, comparadas con el epitelio normal. Las lesiones de alto grado, infiltrantes o intraepiteliales, presentan expresión significativamente mayor que las de bajo grado **(261)**. Como encuentran que en carcinomas invasivos la positividad de Hsp27 es mayor en la periferia de los nidos y en el borde de avance tumoral piensan los autores en un papel adicional en la capacidad de invasión.

En lo que se refiere a los tumores de **aparato digestivo** la sobreexpresión de Hsp27 está asociada con peor supervivencia en cáncer **rectal** pero no en el de **colon** **(262)**. Esa expresión no está alterada por la radioterapia pero está relacionada con la quimioterapia ya que la infraregulación de Hsp27 neutraliza la resistencia a 5-fluoruracilo **(263)**, y se encuentra aumento de Hsp27 en células de carcinomas resistentes a doxorrubicina **(264)**, de manera que Hsp27 es una diana terapéutica en aquellos pacientes con carcinoma de colon resistente a 5-fluoruracilo y doxorrubicina.

En relación con los efectos sobre la terapia se ha encontrado en ratones que el efecto bloqueador sobre Hsp70 por parte del péptido ADD70 sensibiliza las células tumorales a la apoptosis de manera que el aumento de ADD70 disminuye su tumorigenicidad y las hace más susceptibles al tratamiento con cisplatino (265). Esto está en relación con los hallazgos clínicos de Wang (266) ya que encuentran que Hsp70 se expresa en mayor porcentaje de casos de tumores poco diferenciados, en estadios avanzados de Dukes (C y D) y en casos con metástasis. En conjunto encuentran expresión de la proteína en el 92,5% de los casos estudiados. Otros autores, aunque también lo encuentran en un porcentaje elevado de casos (80%), no observan en cambio ninguna correlación con parámetros clínicopatológicos (267).

En tumores **hepáticos y pancreáticos** la radiofrecuencia induce la expresión de Hsp70 que es visto como un potente factor para facilitar la presentación de antígenos tumorales e inducir una respuesta inmune antitumoral (268). Un 77% de hepatocarcinomas expresan Hsp27 y parece asociarse a peores parámetros clínicopatológicos (mayor grado histológico, peor supervivencia global y libre de enfermedad) en aquellos con elevada expresión de la proteína (269). Otro aspecto estudiado ha sido la correlación de p53 con las proteínas de choque. Así se ha encontrado que existe coexpresión de p53 y Hsp70 en el 57% de carcinomas de páncreas mientras ningún tumor de los islotes y ningún caso de pancreatitis crónica presentaba dicha coexpresión (270). Algunos autores han encontrado diferente expresión selectiva según el ambiente en que se desarrolla el tumor. Así líneas tumorales de hepatocarcinoma creciendo rápidamente en cavidad peritoneal muestran expresión elevada de la forma constitutiva de la proteína de la familia HSP70 (Hsc73) y baja de la forma inducida (Hsp70). Lo opuesto se encuentra cuando dichas líneas crecen

en el compartimento subcutáneo (271). En lo referente a la quimioterapia parece que la resistencia a gemcitabina en carcinoma pancreático podría estar en relación con la forma fosforilada de Hsp27, pudiendo ser esta una diana terapéutica adicional (272).

En tumores **gástricos** la Hsp27 está aumentada entre el 50 y 62% de los casos, tanto en western blot como en el estudio inmunohistoquímico (273). También se observa aumento en la mucosa gástrica en casos de infección por helicobacter pilorii. Desde el punto de vista del pronóstico se ha encontrado asociación con mayor tamaño tumoral, presencia de metástasis, estadio avanzado, sexo femenino y menor supervivencia (274,275).

Más del 90% de tumores **esofágicos** son positivos para Hsp70 (276), con mayor expresión y más extensa comparado con tejidos normales adyacentes. Noguchi (277) encuentra correlación entre la expresión de Hsp70 y algunos parámetros clínicos y patológicos en carcinomas escamosos de esófago, como son el sexo, configuración tumoral, metástasis ganglionares e invasión de vasos linfáticos, con un mejor pronóstico en los casos positivos. Kawanishi (278) estudia ambas Hsp27 y 70 en carcinomas escamosos y encuentra que la expresión de ambas está correlacionada. Los que presentaban expresión reducida de ambas se asociaban con peor supervivencia postquirúrgica, siendo el peor factor pronóstico la negatividad para Hsp27. La positividad para ambas se correlacionaba con mejor estadio ganglionar.

En lo que se refiere a **colangiocarcinomas** la expresión de Hsp27 empeoraba significativamente la supervivencia media global, especialmente si se asociaba a negatividad para Hsp70, mientras que la positividad únicamente de este no afectaba la supervivencia. Un 68% de tumores eran positivos para Hsp27 y/o Hsp70 (279).

En neoplasias del **tracto urinario** la proteína Hsp27 es expresada entre el 82 y el 96% de los carcinomas **renales**, de forma significativamente más frecuente en carcinomas de células claras y en tumores de más de 4 centímetros, no encontrándose en cambio correlación con el estadio, grado nuclear de Fuhrman, edad, sexo (280) metástasis ganglionares o metástasis a distancia (281), aunque estos autores encuentran relación entre expresión de Hsp27 y estadio más avanzado. Sakai (282) en cambio encuentra que los casos positivos para Hsp27 tienen peor pronóstico, mientras que la expresión de Hsp70 no muestra esa correlación. En tejido **prostático** aunque Storm (283) no encontraba positividad para Hsp27 en el tejido ni en los carcinomas, Thomas (284) observaba una tinción generalizada, tanto en hiperplasia como en neoplasia intraepitelial mientras que la tinción celular es irregular y variable entre unas zonas y otras en los carcinomas con disminución de expresión en grados mayores de Gleason y en casos con mayor invasividad (284). Desde el punto de vista funcional la acción de tipo chaperona de la Hsp27 sobre el factor de iniciación eIF4E está relacionada en la resistencia del carcinoma de próstata a tratamiento antiandrogénico y quimioterapia (285) (no inmunohistoquímica), y la acción de PKD1 en la represión de la función del receptor de andrógenos está mediada también por Hsp27 (286), por lo que esta proteína sería una buena diana terapéutica en los tumores resistentes a dichas terapias. En el mismo sentido la apoptosis mediada por la depleción de Hsp70 usando oligonucleótidos anti-sense o quercetin es otra vía terapéutica en cáncer de próstata (287).

Los carcinomas de **vejiga** asociados con esquistosomiasis son positivos para Hsp27 y 70 en el 60 y 70% de casos respectivamente (288). Le Bret (289) encuentra disminución de expresión de Hsp27 y 70 con respecto al urotelio normal en 45 y 69% de carcinomas de vejiga, aunque sólo el 8 y el 5% respectivamente eran completamente

negativos. No demostraban relación con el grado tumoral, pronóstico ni recurrencia, pero sí entre la pérdida de Hsp27 y estadios más avanzados. Storm (283) en cambio encontraba tinción para Hsp27 en sólo un 50% de casos y en su serie no demuestran que exista significación diagnóstica o pronóstica, ni le encuentran utilidad como marcador biológico.

En **otras localizaciones**, en tumores no epiteliales, han sido menos estudiadas. Así Strahler (290) encuentran un patrón alterado y específico de fosforilación de Hsp27 en leucemia linfoblástica infantil de tipo pre-B. En citometría de flujo la positividad de membrana para Hsp70, comparada con la positividad citoplásmica se asocia con peor pronóstico en leucemia mieloide aguda (291). En leucemia linfocítica crónica los niveles de Hsp27 se encuentran aumentados con respecto a los controles y se correlacionan con los de caspasa-3. En cambio los niveles de Hsp72 están aumentados en pacientes con enfermedad estable (292,293). Este aumento (292,293) y el de Hsp27 (293) se asocian con pronóstico adverso en leucemias mieloides agudas.

En **cerebro** muestra cierta especificidad de línea celular pues mientras se encuentra expresión de Hsp27 en el 25% de los meningiomas y el 50% de glioblastomas, sólo 1/15 astrocitomas y 1/7 meduloblastomas muestran expresión de la proteína y es negativa en oligodendrogliomas, schwannomas y gangliogliomas (294). Un 25% adicional de glioblastomas y un 43% de meningiomas expresan Hsp70, en cambio la coexpresión de ambas es más rara en esta localización (3/23 meningiomas y 1/3 glioblastomas) (295). En conjunto la positividad para Hsp27 es más frecuente en tumores metastásicos (294-296) y en los primitivos se incrementa con la anaplasia tumoral como ocurre en las variantes anaplásicas de oligodendrogliomas, ependimomas y meningiomas, y en los glioblastomas (296).

Un 60% de **fibrohistiocitomas malignos** son positivos para Hsp27, estando relacionada la positividad con un pronóstico más favorable en lo que se refiere la supervivencia global y libre de metástasis (127). En **neuroblastomas** Hsp27 era menos expresada en áreas inmaduras mientras que Hsp70 estaba sobreexpresada (297). Hsp27 se relaciona con pronóstico favorable y con tipos histológicos menos agresivos. En cambio en **sarcoma de Ewing** no se encontraba ningún patrón característico (297). La sobre regulación de Hsp27 está relacionada con la resistencia in vitro de líneas celulares de osteosarcomas al tratamiento con ácido zolendrónico (298) y por el contrario el aumento de Hsp72 aumenta la sensibilidad al tratamiento quimioterápico (299).

La presencia de niveles elevados de Hsp27 en células de **retinoblastoma** viables después de quimioterapia sugiere que puede proteger las células tumorales de las señales apoptóticas que inducen los quimioterápicos (300). En **melanoma** uveal niveles bajos de Hsp27 se encuentran en casos con monosomía del cromosoma 3 y se relaciona con aumento de mortalidad (301).

DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE NUESTRA SERIE.

PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO

En nuestra serie, de los 470 casos, 64 (13,6%) fueron negativos en el estudio inmunohistoquímico para la proteína Hsp70, con positividad citoplásmica en los 406 restantes (86,4%), presentando 318 (78,3% de ellos) la tinción en más del 50% de sus células y con una intensidad moderada o marcada en 330 (81,2% de ellos). La

intensidad y el porcentaje están relacionados de forma que los casos con mayor porcentaje de células positivas lo son también de forma más intensa ($p=0,000$).

En lo que se refiere a la proteína Hsp27 se estudió en 390 casos de los que 54 (13,8%) resultaron negativos, mostrando tinción citoplásmica los 336 restantes (86,2%) de los que 255 (75,8% de ellos) presentan tinción en más del 50% de las células tumorales, con intensidad moderada o marcada en 300 (89,2% de ellos). Al igual que con la proteína Hsp70, la intensidad y el porcentaje de células positivas están relacionadas entre sí ($p=0,000$). También están relacionadas con alta significación estadística la expresión inmunohistoquímica simultánea de ambas proteínas, de forma que los casos positivos para Hsp70 lo son también para Hsp27 ($p=0,000$) y sólo 20 (5,1%) de los 390 casos estudiados para las dos proteínas eran negativos para ambas. Dicha alta significación se mantiene también para el porcentaje de células positivas y la intensidad de la tinción celular ($p=0,000$).

Con respecto a la relación de la expresión de las proteínas de choque térmico con el resto de parámetros estudiados, el atrapamiento alveolar es más frecuente en los casos negativos para Hsp70 ($p=0,039$), sobre todo en los que expresan débilmente la proteína ($p=0,02$). Por el contrario el atrapamiento es más frecuente en los casos positivos para Hsp27 ($p=0,034$), con porcentaje elevado de células positivas ($p=0,034$), perdiendo la significación para la intensidad de tinción, aunque muestra tendencia estadística ($p=0,059$).

Los casos que presentan estroma más abundante en la zona de atrapamiento alveolar la tinción de Hsp70 es más intensa ($p=0,041$). En cambio no existe correlación con el estroma en el conjunto del tumor. Por el contrario los casos positivos para Hsp27 tienen estroma tumoral escaso ($p=0,034$), relación que se mantiene en el porcentaje de

células positivas ($p=0,032$) siendo mayor la relación con la intensidad de tinción para esta proteína ($p=0,009$).

La diseminación tumoral interalveolar es más frecuente en los casos positivos para Hsp27 ($p=0,000$), relación que se mantiene para el porcentaje de células ($p=0,000$) y para la intensidad de tinción ($p=0,000$).

Del resto de parámetros estudiados en el presente trabajo el grado de diferenciación tumoral está relacionado con el porcentaje de células positivas para Hsp70, resultando este mayor en los tumores poco o moderadamente diferenciados ($p=0,023$).

Los parámetros restantes estudiados: histológicos, clínicos, patológicos, grupo sanguíneo A, TNM, estadificación, supervivencia global y libre de enfermedad no mostraron significación estadística con la positividad de Hsp27, Hsp70, el porcentaje de células positivas ni la intensidad de tinción celular.

Expresión de HSP27 y HSP70 en neoplasias pulmonares

La expresión de proteínas de choque térmico ha sido estudiada en varias series de carcinomas pulmonares, aunque en general con un reducido número de casos, de forma que nuestra serie es la más amplia de las estudiadas hasta el momento en carcinomas de pulmón. Bonay (302) encuentra positividad para alguna de las cuatro proteínas que estudian (Hsp63, Hsp72, Hsp73 y Hsp90) en 14 de sus 15 casos (9/15 para Hsp70), con un patrón heterogéneo que atribuyen a la variación de diferenciación celular dentro del tumor. Sandoval (303) encuentra tinción en 98,9% de casos para Hsp70 y 86,5% para Hsp27 y Moreno (304) en el 80 y 84% respectivamente, tratándose de dos series amplias con 84 (303) y 146 (304) casos de carcinomas pulmonares no

microcíticos, encontrando ambos esa heterogeneidad de distribución de la inmunotinción. En nuestros casos también se encontraba una frecuencia elevada de expresión con el 95% de casos positivos para alguna de las dos proteínas y el 86,4% para Hsp70, y con heterogeneidad de expresión presentando porcentaje e intensidad variables pero en menor grado que en los casos de Bonay (302) ya que la mayoría de nuestros casos presentaba tinción moderada o intensa y en más del 50% de las células neoplásicas.

Volm (305) encontraba expresión de Hsp70 en el 67,9% de sus 53 adenocarcinomas y Koomägi (306) en el 75% de sus casos (15/20) ambos con tinción aumentada en fumadores, además de mayor expresión en el tumor comparado con el tejido pulmonar no tumoral. El efecto oncogénico, y por tanto de estrés, del tabaco justificaría este aumento de proteínas. Otros grupos ya habían encontrado esa sobreexpresión en tumores comparado con tejido no tumoral (302,307-309).

Malusecka (310) encuentran 95/106 (89,6%) de casos positivos para Hsp70, mientras Hsp27 la encuentran en el 70%. La expresión para Hsp27 muestra el mayor score en carcinomas epidermoides, no existiendo correlación con otros tipos histológicos ni en la expresión para Hsp70. En nuestros casos no existía relación con la histología tumoral ni el grado de diferenciación. Este es el único trabajo que estudia Hsp27 en carcinomas pulmonares con inmunohistoquímica, aunque Vargas (311) estudia 111 tumores para la proteína p29 relacionada con el receptor de estrógenos y que parece ser la misma proteína que Hsp27 (244). El 98% tienen expresión de la proteína y se correlacionaba negativamente con supervivencia en las mujeres, hallazgo que no hemos encontrado en nuestra serie.

Michils (312) estudia también Hsp27 y 70, pero con el método ELISA. Encuentran mayores niveles de Hsp70, pero no de Hsp27, en el tejido tumoral comparado con el no tumoral. No muestra correlación con la supervivencia, el tipo tumoral ni la extensión del cáncer.

En los estudios revisados de carcinomas pulmonares Volm (305) encuentra relación positiva de la expresión de Hsp70 con metástasis ganglionares en su serie de 130 carcinomas epidermoides, la más amplia hasta entonces. Moreno (304) demuestra mejor supervivencia libre de enfermedad en los casos positivos para Hsp27 y en los casos negativos para Hsp70; además de la relación referida de peor supervivencia en carcinomas positivos para Hsp27 (p29) en mujeres (311) El resto no encuentran correlación con pronóstico ni supervivencia. En nuestros casos tampoco encontramos correlación significativa entre el marcaje con las dos proteínas de choque y los parámetros de extensión tumoral, estadificación ni supervivencia, sea global o libre de enfermedad.

RESUMEN RESULTADOS Hsp27 v Hsp70 EN CARCINOMAS PULMONARES

AUTOR	Nº CASOS	RESULTADOS	CONCLUSIONES
Bonay et al. 1994 (302)	15 casos 9 epidermoides 5 adenocarcinomas 1 CA célula grande	Hsp70 9/15 positivos Distribución irregular	No correlación con tipo histológico
Volm et al. 1995 (307)	90 casos 63 resistentes a doxorubicina. 27 sensibles 34 adenoCAs 44 epidermoides 12 CA célula grande	Hsp70 Irregular: 44 score 0-3. 46 score 4-6	No relación con resistencia a doxorubicina. Relación con expresión de catepsina.
Volm et al. 1995 (308)	53 adenocarcinomas Hsp70	12/21 no fumadores (57%) y 24/32 fumadores (75%) positivos. >20 cigarros/día 89% positivos (p=0,028)	Correlación entre número de cigarrillos y expresión de Hsp70

AUTOR	Nº CASOS	RESULTADOS	CONCLUSIONES
Koomägi et al. 1996 (306)	20 casos 10 epidermoides, 5 adenoCAs, 3 CA célula grande, 2 CA célula pequeña	Hsp70 2/6 no fumadores y 11/14 fumadores positivos	Hsp70 aumentado en carcinomas comparado con no tumoral. Tabaco puede causar de la sobreexpresión
Malusecka et al. 2001 (310)	106 casos: 65 epidermoides, 32 adenoCAs, 9 CA cel grande Hsp27 y Hsp70	95+ para Hsp70, 83+ para Hsp27 Más intenso en epidermoides	Correlación con la expresión de Ki67 y Ciclina-D1. Relación con la regulación del ciclo celular
Volm et al. 2002 (305)	130 epidermoides 76 metástasis ganglionares	Hsp70 +/- 50% metas ganglionares. Hsp70 ++/+++ 67%	Hsp 70 relacionada con metástasis ganglionares p=0,05

AUTOR	Nº CASOS	RESULTADOS	CONCLUSIONES
Sandoval. 2003 (303)	90 casos 51 epidermoides 25 adenoCAs 6 indif. cel. Grande 2 adenoescamosos 1 microcítico 5 carcinoides	79 positivos para Hsp70 47 positivos para Hsp27	Mayor expresión en carcinoma comparado con tejido no tumoral. Menor expresión Hsp70 en fases avanzadas y de Hsp27 en fases iniciales.
Moreno 2005 (304)	146 casos 70 epidermoides 76 adenoCAs	123 positivos Hsp27 116 positivos Hsp70	Hsp70 más expresado en tumores más indiferenciados Hsp70- y Hsp27+ mayor SLE
Presente serie	470 casos 470 estudiados Hsp70 390 para Hsp27	86,4% (406/470) positivos Hsp70 86,1% (336/390) positivos Hsp27	No presentan correlación con tipo histológico, estadificación ni supervivencia

En resumen como se ha comentado a lo largo de la discusión, tanto de neoplasias pulmonares como no pulmonares, los resultados han sido contradictorios, sin conclusiones claras, y aunque la expresión elevada suele observarse en neoplasias peor diferenciadas y se asocia con factores pronósticos y de supervivencia negativos, en otros estudios la asociación es positiva e incluso en otros no se encuentra correlación alguna. De todas formas dada la perspectiva terapéutica que se abre ante la posibilidad de que sean usadas como dianas terapéuticas, existiendo fármacos que inhiben las proteínas de choque, e incluso la posibilidad de desarrollar vacunas contra proteínas de choque, estudiadas en los últimos años (**313-315**), así como su papel en procesos celulares básicos, se justifican posteriores investigaciones para seguir aclarando sus numerosas e importantes funciones y abrir posibilidades en lo que se refiere a perspectivas terapéuticas trascendentales.

CONCLUSIONES

- 1.- En los casos utilizados para el presente estudio, los parámetros generales de pronóstico para carcinomas pulmonares no microcíticos como son la estadificación (TNM) ($p < 0,0001$) y edad mayor de 65 años ($p < 0,0001$) se correlacionan de manera significativa con la supervivencia, lo que valida la serie estudiada.
- 2.- La subdivisión en el estadio I del diámetro tumoral en 4 grupos, resultó significativa para la supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,004$) pero no para la global ($p = 0,084$), planteando que dicha subdivisión podría ser admisible en la estadificación TNM de los carcinomas pulmonares.
- 3.- Parámetros histológicos generales como son el grado de diferenciación tumoral ($p = 0,005$) y la presencia de cicatriz conllevan peor supervivencia. La presencia de cicatriz en estadios I y II se asocia con peor supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,025$) pero no es significativa para la supervivencia global ($p = 0,634$).
- 4.- El atrapamiento alveolar dentro de los carcinomas pulmonares no microcíticos es un hecho frecuente y poco estudiado; se asocia con peor supervivencia global, hallazgo no estadísticamente significativo aunque se encuentra casi en el rango de la significación ($p = 0,056$) estadística. En cambio la supervivencia libre de enfermedad es claramente no significativa ($p = 0,57$).
- 5.- Los casos en los que el atrapamiento es en cuantía escasa o está localizado sólo en la periferia tumoral son los que muestran peor supervivencia mientras que los que lo tienen en cuantía abundante y/o con una distribución amplia su supervivencia global es similar a los casos que no presentan atrapamiento.

6.- Los casos que presentan diseminación interalveolar, tal y como se ha definido en el presente trabajo, tienen una supervivencia global peor que aquellos que no muestran esta característica (p=0,037).

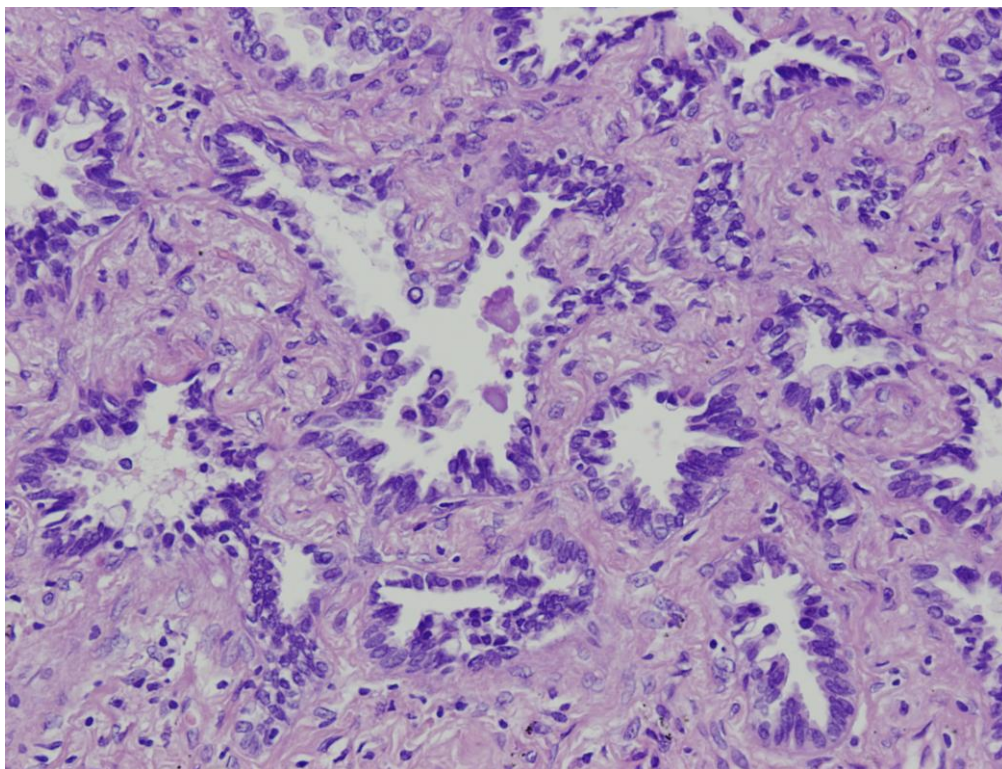
7.- La presencia y la cantidad de necrosis o la cantidad de estroma tumoral no tienen relación con la supervivencia.

8.- Los tumores positivos para el histoantígeno del grupo A tienen mejor supervivencia, casi en la significación estadística (p=0,056).

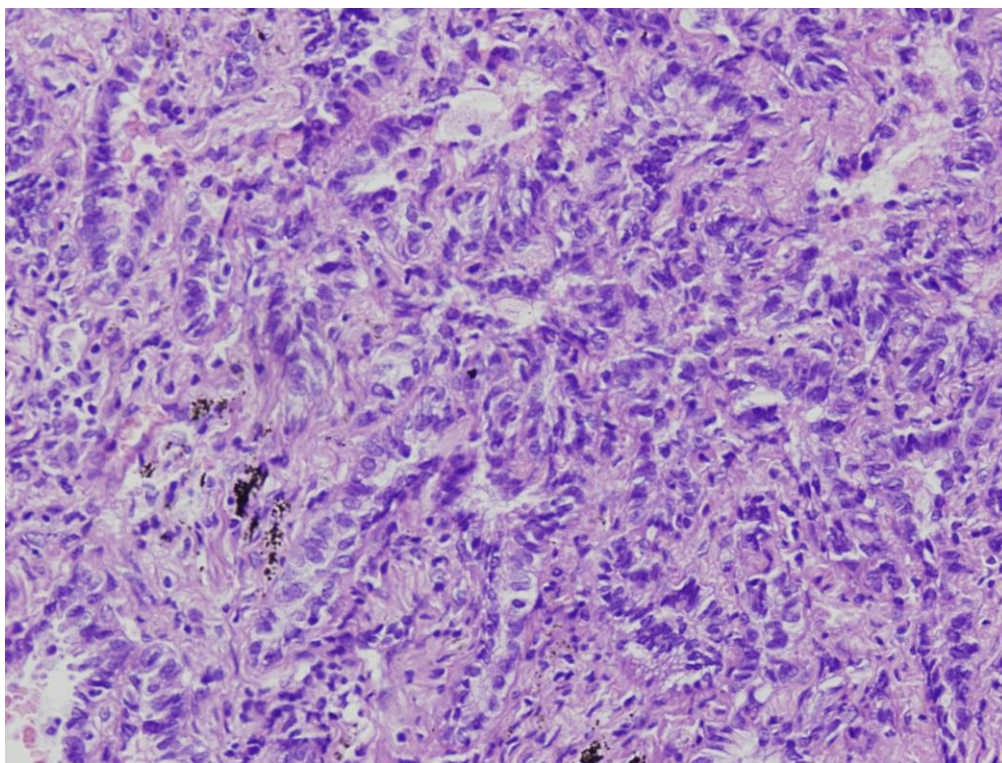
9.- Los pacientes del grupo sanguíneo A que presentan pérdida del marcador en el estudio inmunohistoquímico del tumor tienen peor supervivencia global, tanto en la serie completa (p=0,017) como en estadios I y II (p=0,02), sobre todo comparados con los del grupo A que mantienen la expresión pero también en comparación con el resto de pacientes que no son del grupo A (p=0,048). No es significativo con respecto a la supervivencia libre de enfermedad.

10.- Las proteínas de choque térmico estudiadas (Hsp27 y Hsp70) son positivas en una mayoría de carcinomas pulmonares no microcíticos, sin distribución específica significativa según el tipo histológico, ni correlación significativa con la supervivencia.

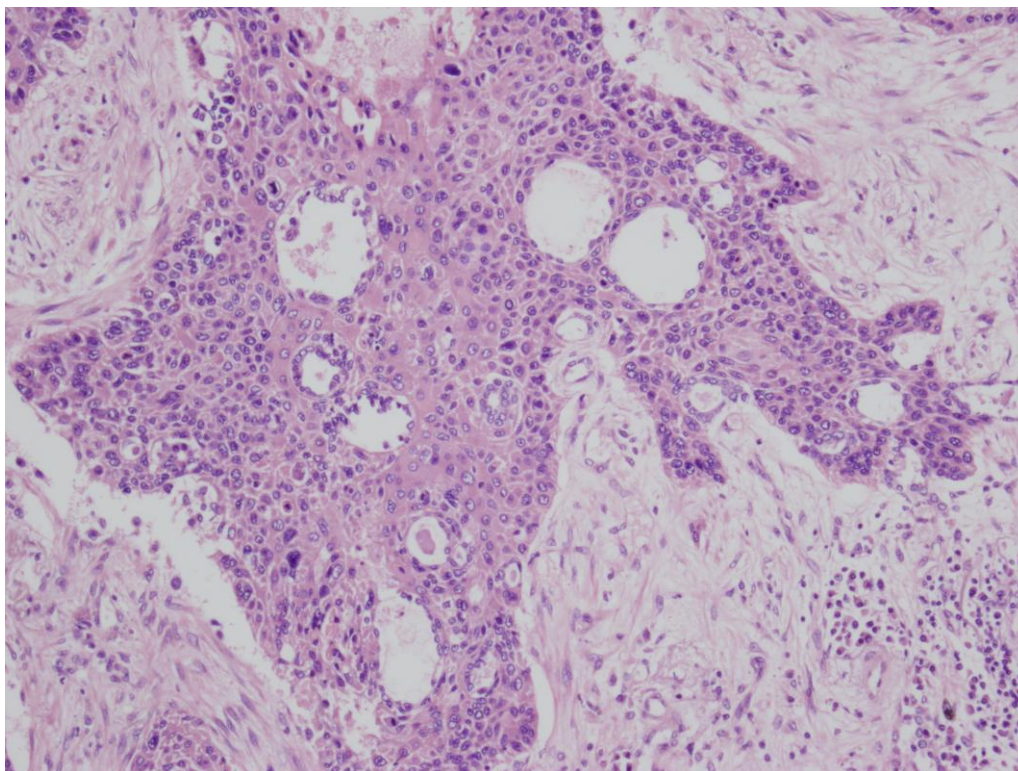
ICONOGRAFIA



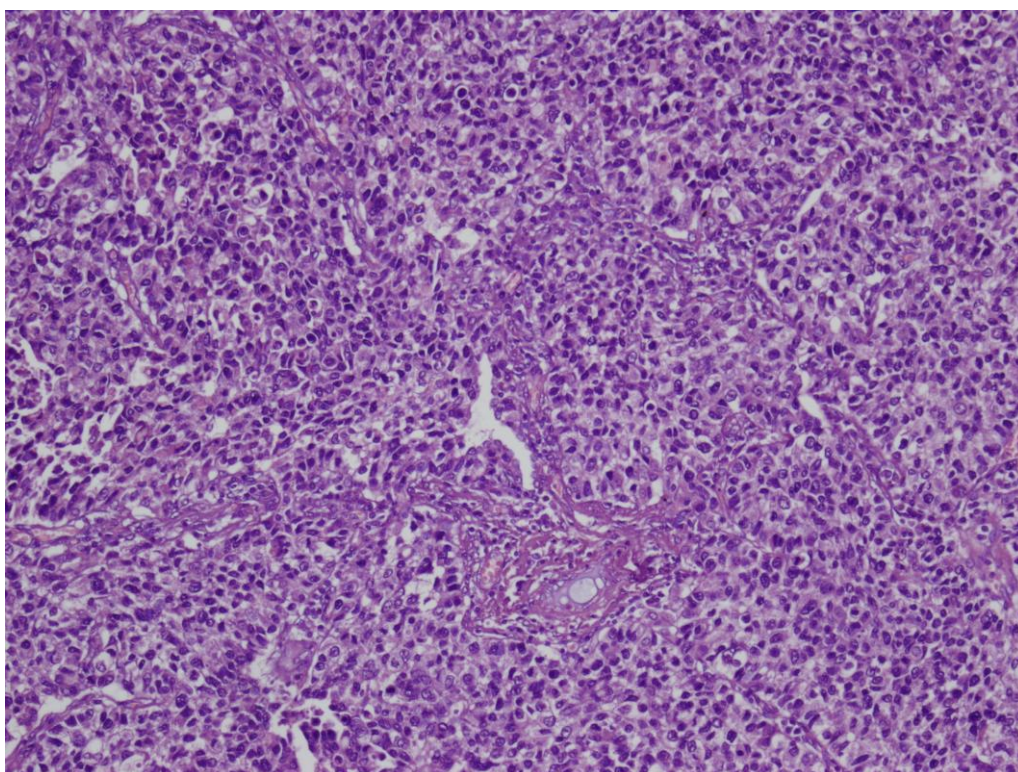
Adenocarcinoma bien diferenciado.



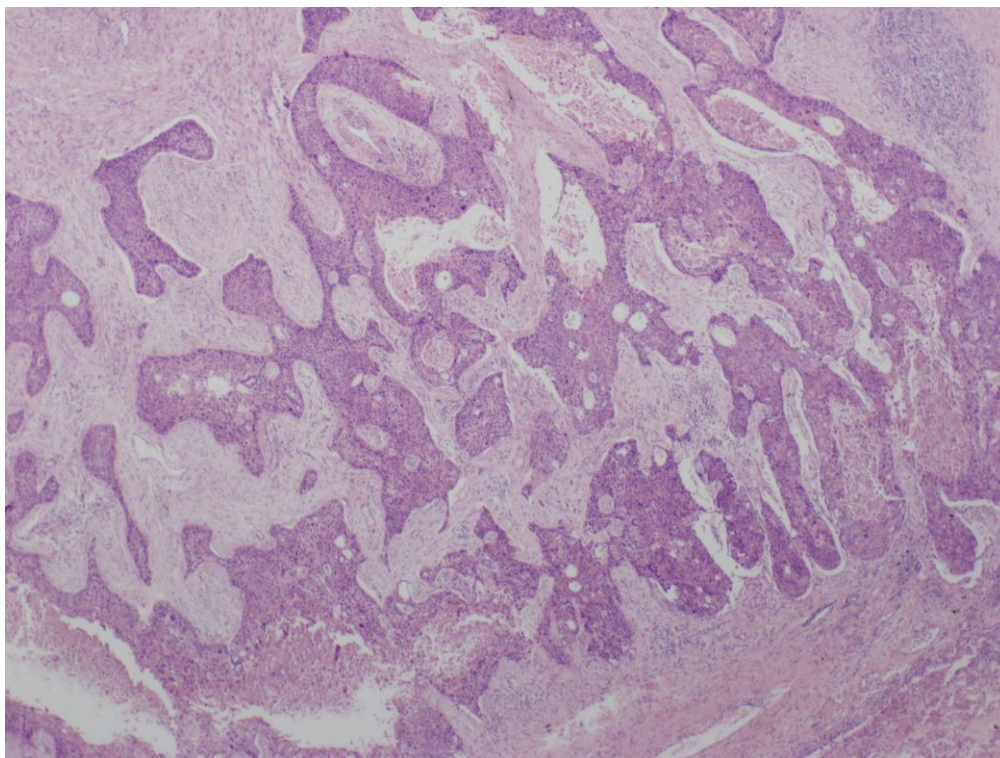
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado.



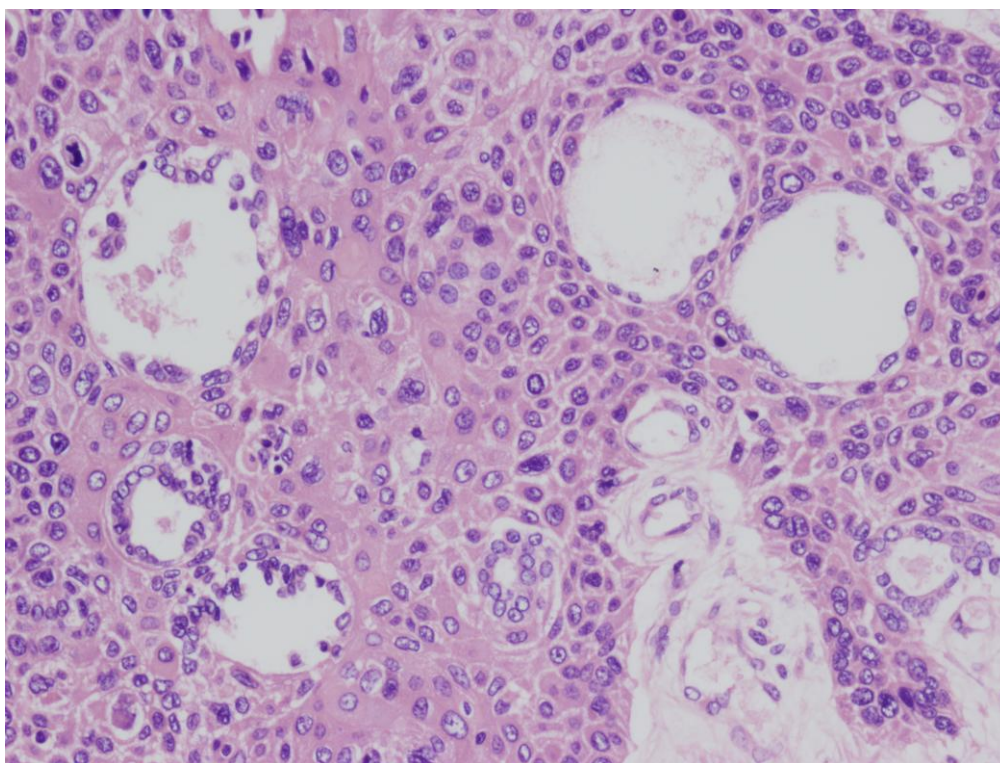
Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado con atrapamiento alveolar grado 3.



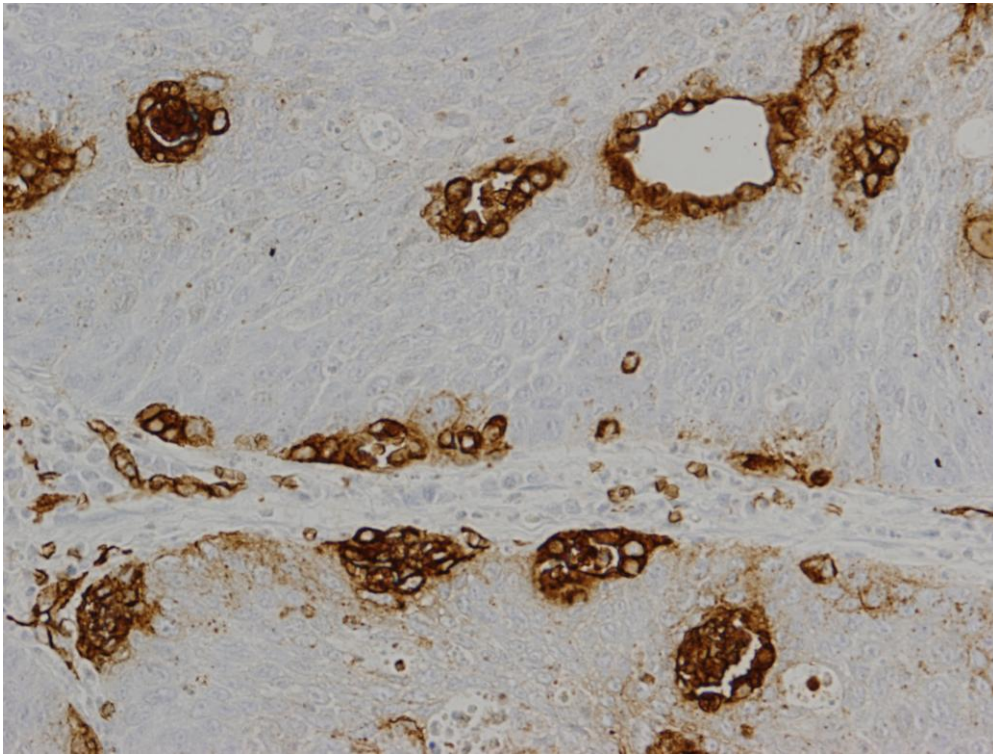
Carcinoma indiferenciado de célula grande con una luz alveolar irregular atrapada, en el centro de la imagen (grado 1).



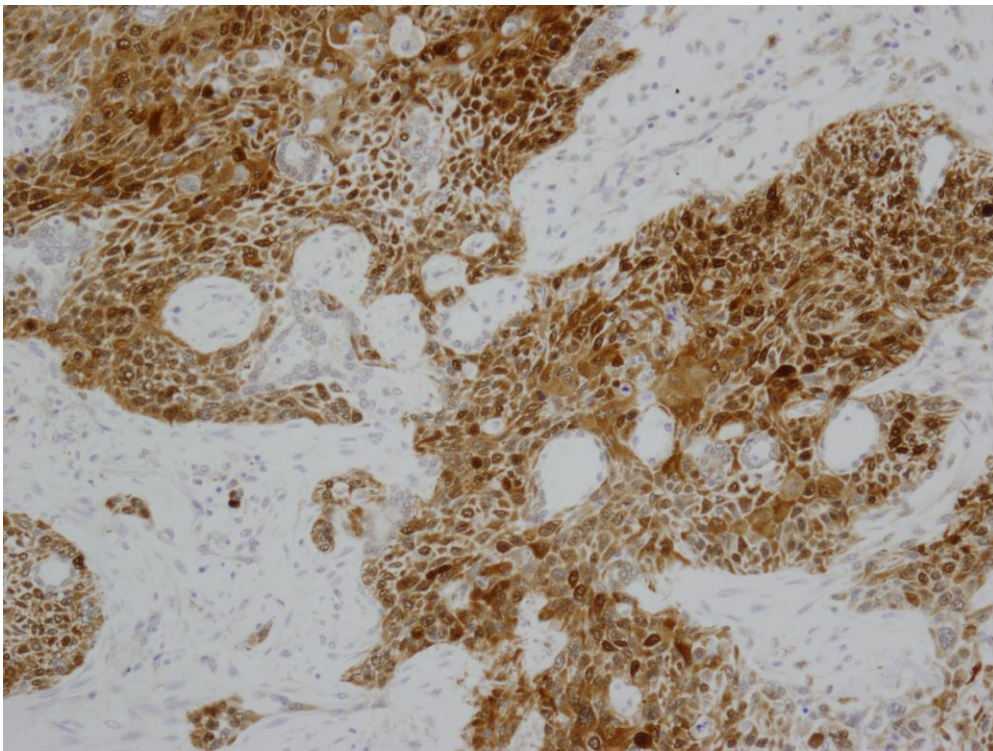
Carcinoma epidermoide. Atrapamiento alveolar grado 3 y extensión 3. Estroma grado 2 y necrosis grado 2.



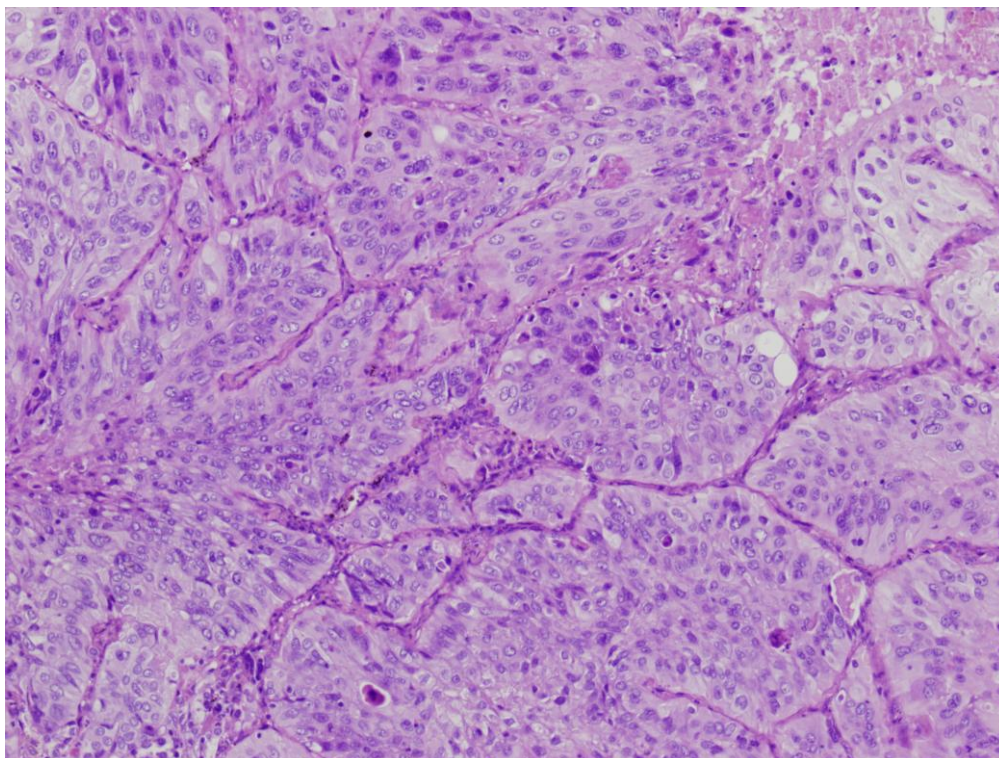
Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Atrapamiento alveolar grado 3. Alveolos en el nido tumoral, en la interfase y en el estroma.



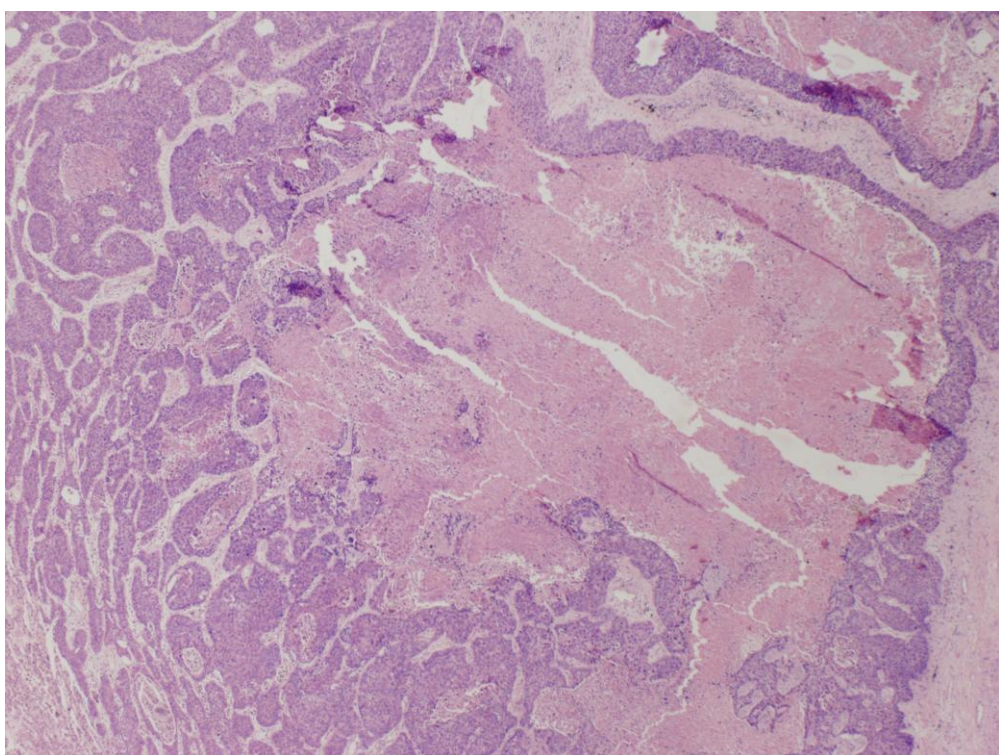
Grupo A. Pérdida de expresión en tumor y positividad en los alveolos atrapados y endotelio. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado.



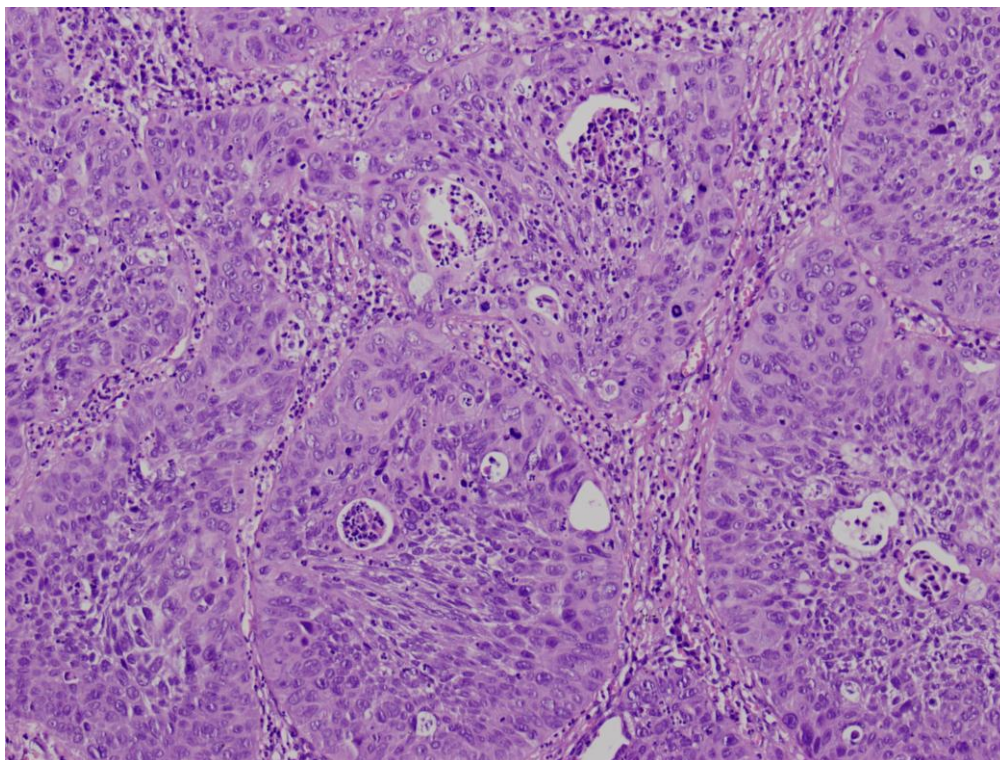
Hsp70. Intensidad 4 en más del 75% de las células. Alveolos atrapados negativos. Imagen opuesta a la anterior



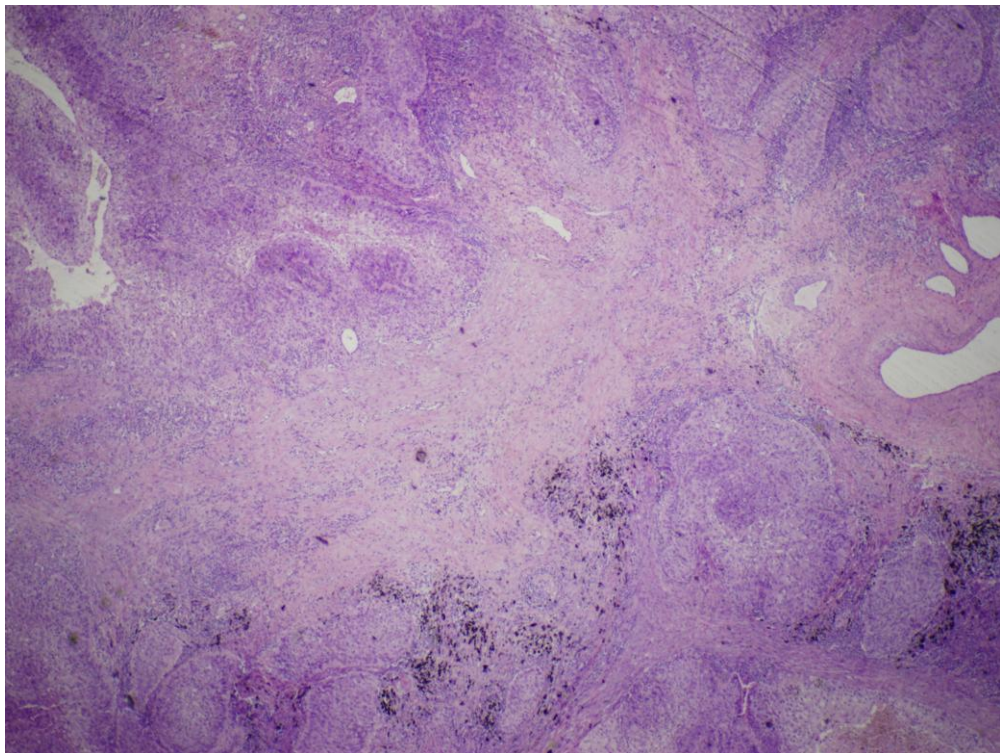
Carcinoma epidermoide poco diferenciado. Estroma grado 1.



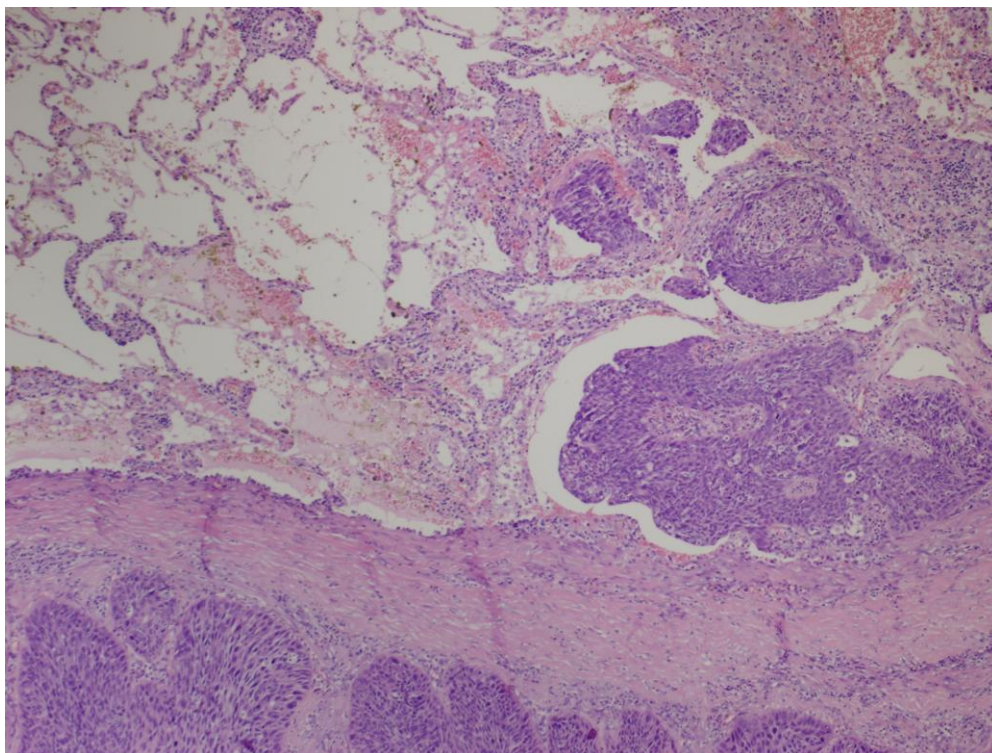
Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Estroma grado 2, necrosis grado 3.



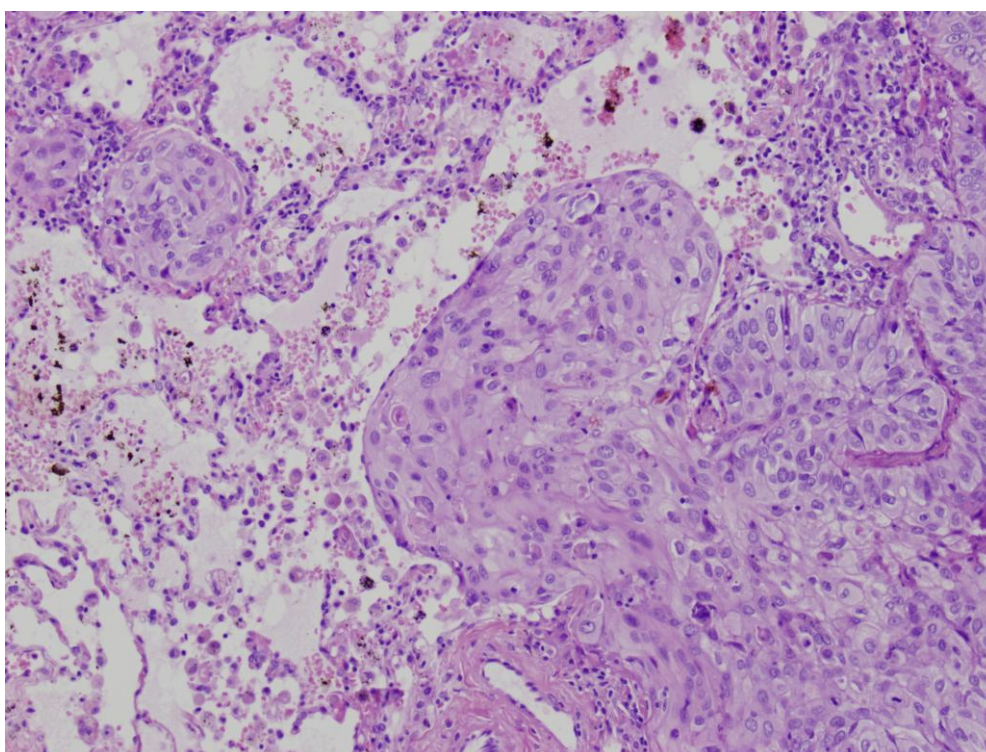
Carcinoma epidermoide poco diferenciado. Necrosis grado 1.



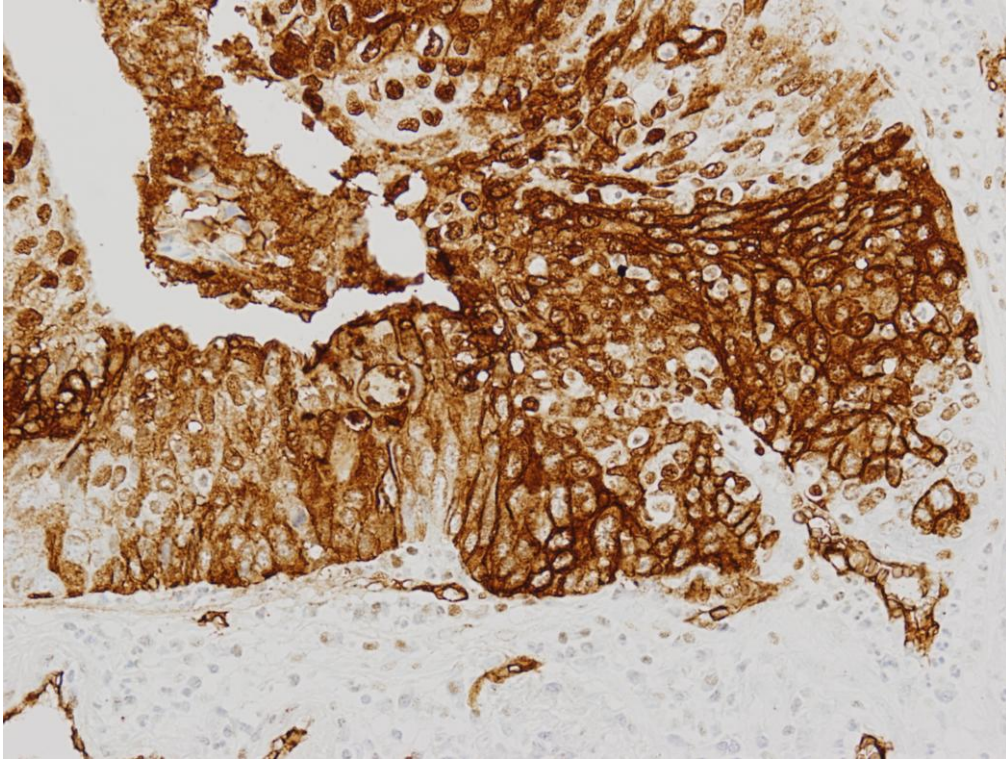
Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado. Cicatriz en el centro del tumor con presencia de vasos residuales y retracción del tejido adyacente.



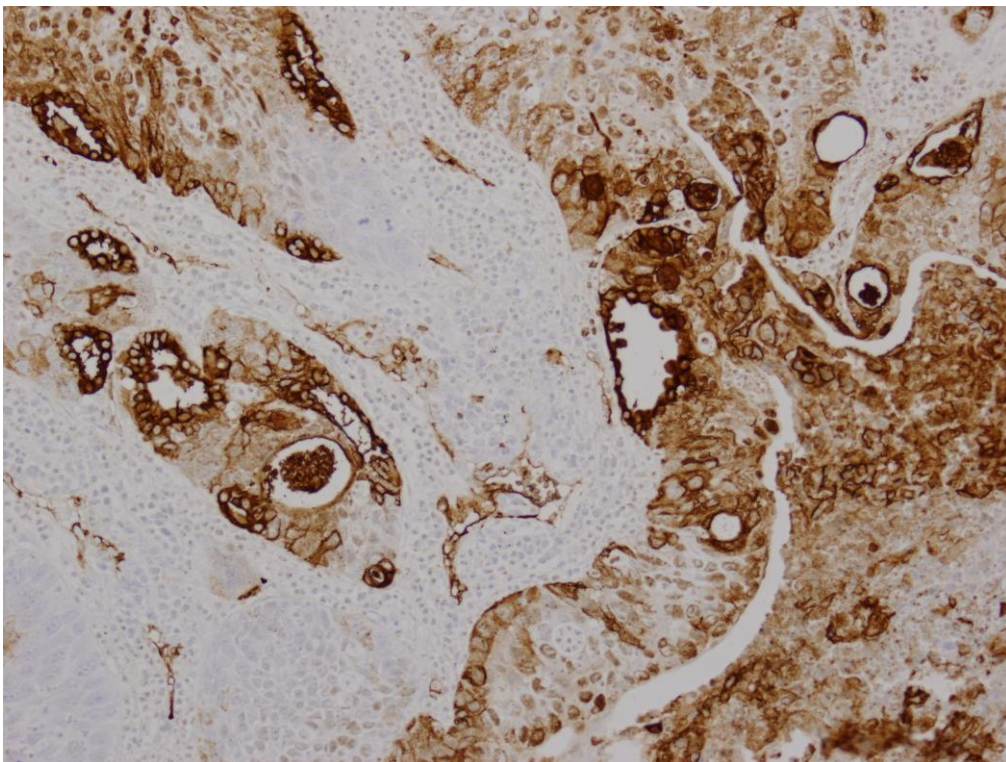
Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado. Pseudocápsula fibrosa con diseminación interalveolar en la zona de rebasamiento.



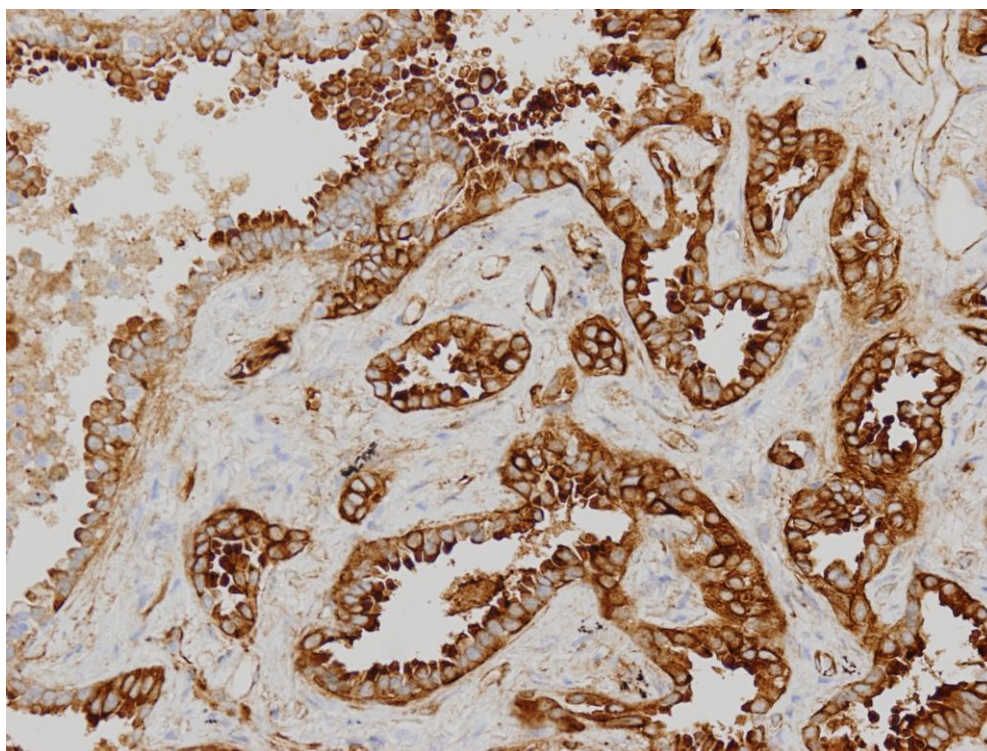
Carcinoma epidermoide pobremente diferenciado. Diseminación interalveolar. Fino revestimiento neumocitario del mamelón tumoral y presencia de macrófagos alveolares en la luz donde crece el tumor.



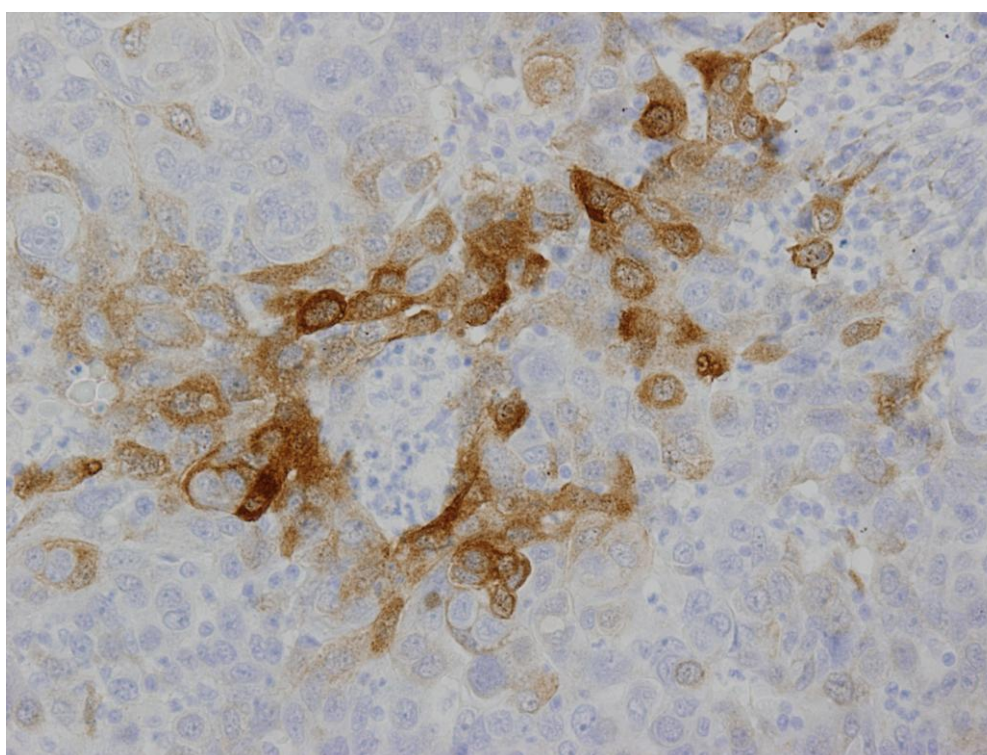
Grupo A. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Intensidad 4 en más del 75% de células. Endotelios vasculares positivos como control interno



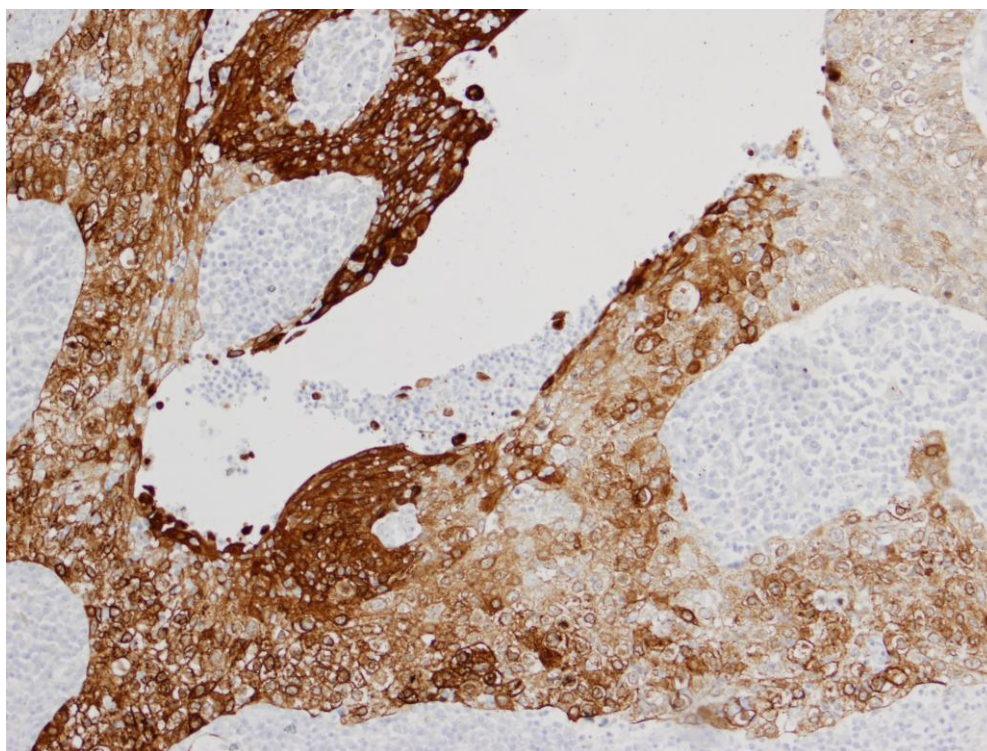
Grupo A. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Intensidad 4 entre el 50-75% de células. Alveolos atrapados que destacan por su mayor intensidad de tinción que las células tumorales.



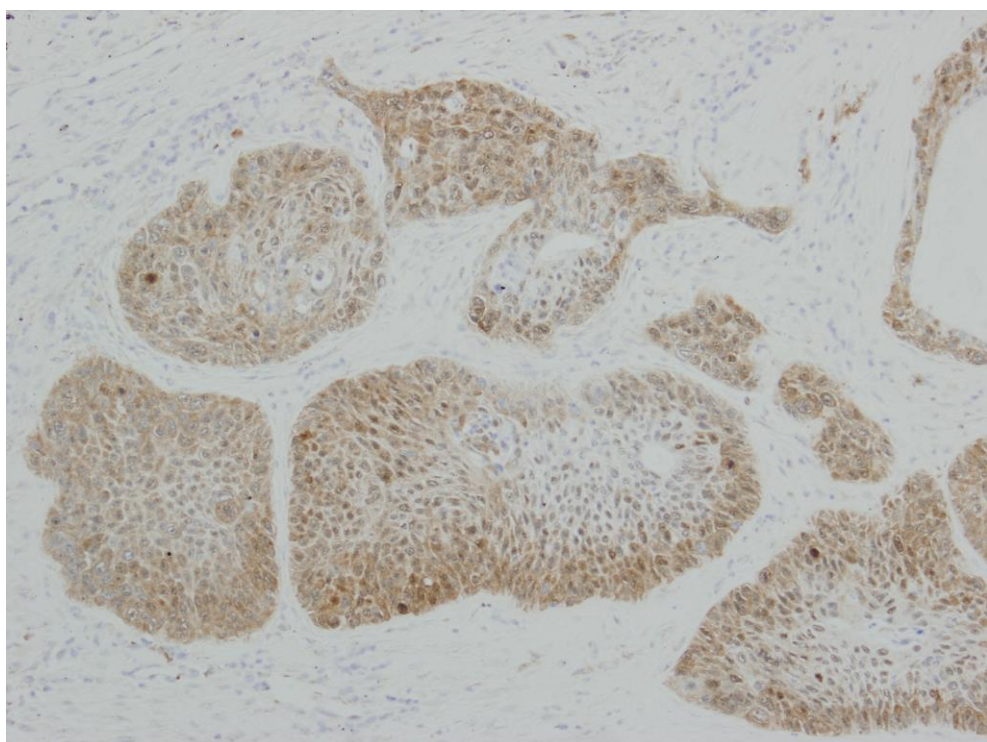
Hsp27. Adenocarcinoma bien diferenciado. Intensidad 4 en más del 75% de células tumorales.



Hsp27. Carcinoma indiferenciado de célula grande. Intensidad 3 entre el 25 y 50% de células tumorales.



Hsp70. Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado. Intensidad 4 en más del 75% de células tumorales.



Hsp70. Carcinoma epidermoide bien diferenciado. Intensidad 3 en más del 75% de células tumorales.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R, Ajani UA, Kohler B, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1672–1694.
2. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, et al. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2004.
3. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16: 481-488.
4. Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli PM, Faivre J, Grosclaude P, Hédelin G, Matsuda T, Møller H, Möller T, Verdecchia A, Capocaccia R, Gatta G, Micheli A, Santaquilani M, Roazzi P, Lisi D; EURO CARE Working Group. EURO CARE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann Oncol* 2003; 14(Suppl 5): v61-118.
5. Centro Nacional de Epidemiología Instituto de Salud Carlos III. 2008. <http://193.146.50.130/ariadna.php>
6. Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer* 2003; 41:245-258.
7. Lopez-Abente G, Pollan M, Aragonés N, Pérez Gómez B, Hernández Barrera V, Lope V, Suárez B. [State of cancer in Spain: incidence]. *An Sist Sanit Navar* 2004; 27:165-173.
8. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung: preliminary report. *Br Med J* 1950; 2:739-748.
9. Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*. 2001;51:15-36.
10. Reif MS, Socinski MA, Rivera MP. Evidence-based medicine in the treatment of non-small cell lung cancer. *Clin Chest Med*. 2000;1:107-120.
11. Henderson BE, Ross RK, Pike MC. Toward the primary prevention of cancer. *Science*. 1991;254:1131-1138.
12. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003;58:892-900.
13. Mandel JS, Oken M. Etiology, prevention, and treatment of breast, prostate, colorectal, and lung cancer. *Minn Med* 1998;81:44-46.
14. Takkouche B, Gestal-Otero JJ. The epidemiology of lung cancer: review of risk factors and Spanish data. *Eur J Epidemiol* 1996;12:341-349.

15. Hammond EC, Selikoff IJ, Seidman H. Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann N Y Acad Sci* 1979; 330:473-490.
16. Ring BZ, Seitz RS, Beck RA, Shasteen WJ, Soltermann A, Arbogast S, Robert F, Schreeder MT, Ross DT. A novel five-antibody immunohistochemical test for subclassification of lung carcinoma. *Mod Pathol*. 2009;22:1032-1043.
17. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M et al International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011;6: 244-285.
18. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1378(1):F21-59.
19. Jensen SM, Gazdar AF, Cuttitta F, Russell EK, Linnoila RI. A comparison of synaptophysin, chromogranin, and L-dopa decarboxylase as markers for neuroendocrine differentiation in lung cancer cell lines. *Cancer Res*. 1990;50:6068-6074.
20. Bartek J, Lukas J, Bartkova J. Perspective: defects in cell cycle control and cancer. *J Pathol*. 1999;187:95-99.
21. Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW 3rd, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*. 2000;60:1949-1960.
22. Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T. Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:9252-9256.
23. Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol*. 1998 ;16:1207-1217.
24. Nelson HH, Wiencke JK, Gunn L, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT. Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos. *Cancer Res*. 1998;58:1804-1807.
25. Richardson GE, Johnson BE. The biology of lung cancer. *Semin Oncol*. 1993;20:105-127.
26. Johnson BE, Russell E, Simmons AM, Phelps R, Steinberg SM, Ihde DC, Gazdar AF. MYC family DNA amplification in 126 tumor cell lines from patients with small cell lung cancer. *J Cell Biochem Suppl*. 1996;24:210-217.
27. Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis*. 1999 20:1507-1510.

28. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Haller A, Lothaire P, Meert AP, Noel S, Lafitte JJ, Sculier JP. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2005 ;92:131-139.
29. Li ZH, Zheng J, Weiss LM, Shibata D. c-k-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol*. 1994;144:303-309.
30. Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal*. 2003;15:463-469.
31. Guerrero S, Casanova I, Farré L, Mazo A, Capellà G, Mangués R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*. 2000;60:6750-6576.
32. Novack DV, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein expression during murine development. *Am J Pathol*. 1994 ;145:61-73.
33. Anton RC, Brown RW, Younes M, Gondo MM, Stephenson MA, Cagle PT. Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Hum Pathol*. 1997;28:1079-1082.
34. Cox G, Louise Jones J, Andi A, Abrams KR, O'Byrne KJ. Bcl-2 is an independent prognostic factor and adds to a biological model for predicting outcome in operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001;34:417-426.
35. Nguyen VN, Mirejovský P, Mirejovský T, Melínová L, Mandys V. Expression of cyclin D1, Ki-67 and PCNA in non-small cell lung cancer: prognostic significance and comparison with p53 and bcl-2. *Acta Histochem*. 2000;102:323-38.
36. Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, Altermatt HJ, Ryder WD, Cerny T, Thatcher N. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1996;73:294-300.
37. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, Cheng CL, Wang CH, Terng HJ, Kao SF, Chan WK, Li HN, Liu CC, Singh S, Chen WJ, Chen JJ, Yang PC. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2007;356:11-20.
38. Hoheisel JD. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet* 2006;7:200-210.
39. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995;270:467-470.
40. Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, Konishi H, Osada H, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative realtime reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2004;22:811-819.
41. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, Levy R. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med* 2004;350:1828-1837.

42. Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, Lin L, Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Lizyness ML, Kuick R, Hayasaka S, Taylor JM, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002;8:816-824.
43. Wigle DA, Jurisica I, Radulovich N, Pintilie M, Rossant J, Liu N, Lu C, Woodgett J, Seiden I, Johnston M, Keshavjee S, Darling G, Winton T, Breitkreutz BJ, Jorgenson P, Tyers M, Shepherd FA, Tsao MS. Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res* 2002;62:3005-3008.
44. Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL, Gullans SR, Blumenstock JE, Ramaswamy S, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R. Translation of microarray data into clinically relevant cancer diagnostic tests using gene expression ratios in lung cancer and mesothelioma. *Cancer Res* 2002;62: 4963-4967
45. Granville CA, Dennis PA. An overview of lung cancer genomics and proteomics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:169-176.
46. Huang YT, Heist RS, Chirieac LR, Lin X, Skaug V, Zienoldiny S, Haugen A, Wu MC, Wang Z, Su L, et al. Genome-wide analysis of survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:2660-2667.
47. Mascaux C, Laes JF, Anthoine G, Haller A, Ninane V, Burny A, Sculier JP. Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. *Eur Respir J* 2009;33:352-359.
48. Ramirez JL, Rosell R, Taron M, Sanchez-Ronco M, Alberola V, de Las Peñas R, Sanchez JM, Moran T, Camps C, Massuti B, Sanchez JJ, Salazar F, Catot S. 14-3-3sigma methylation in pretreatment serum circulating DNA of cisplatin-plus-gemcitabine-treated advanced non-small-cell lung cancer patients predicts survival: The Spanish Lung Cancer Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:9105-9112.
49. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70. [Erratum, *Cancer Res* 1999;59:3853.]
50. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286-298.
51. Esteller M. Epigenetics in Cancer *N Engl J Med* 2008;358:1148-1159.
52. Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, Majem M, Lopez-Vivanco G, Isla D, Provencio M, Insa A, Massuti B, Gonzalez-Larriba JL, Paz-Ares L, Bover I, Garcia-Campelo R, Moreno MA, Catot S, Rolfo C, Reguart N, Palmero R, Sánchez JM, Bastus R, Mayo C, Bertran-Alamillo J, Molina MA, Sanchez JJ, Taron M; Spanish Lung Cancer Group. Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958-967.

53. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947–957.
54. Ray M, Salgia R, Vokes EE. The role of EGFR inhibition in the treatment of non-small cell lung cancer. *Oncologist*. 2009;14:1116–1130.
55. Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Vynnychenko I, Park K, Yu CT, Ganul V, Roh JK, Bajetta E, O'Byrne K, de Marinis F, Eberhardt W, Goddemeier T, Emig M, Gatzemeier U; FLEX Study Team. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet* 2009;373: 1525–1531.
56. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, Leigh N, Mezger J, Archer V, Moore N, Manegold C. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as firstline therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAil. *J Clin Oncol* 2009;27:1227–1234.
57. Pavelic J, Krizanac S, Kapitanovic S, Pavelic L, Samarzija M, Pavicic F, Spaventi S, Jakopovic M, Herceg-Ivanovi Z, Pavelic K. The consequences of insulin-like growth factors/receptors dysfunction in lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:65–71.
58. Dziadziuszko R, Merrick DT, Witta SE, Mendoza AD, Szostakiewicz B, Szymanowska A, Rzyman W, Dziadziuszko K, Jassem J, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M, Hirsch FR. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) gene copy number is associated with survival in operable non-small-cell lung cancer: a comparison between IGF1R fluorescent in situ hybridization, protein expression, and mRNA expression. *J Clin Oncol*. 2010;28:2174-2180
59. Karp DD, Pollak MN, Cohen RB, Eisenberg PD, Haluska P, Yin D, Lipton A, Demers L, Leitzel K, Hixon ML, Terstappen LW, Garland L, Paz-Ares LG, Cardenal F, Langer CJ, Gualberto A. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the insulin-like growth factor type 1 receptor inhibitor figitumumab (CP-751,871) in combination with paclitaxel and carboplatin. *J Thorac Oncol*. 2009;4:1397-1403
60. Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, Yu LK, Song Y. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Thorac Oncol* 2009;4:1094–1103.
61. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2542–2550.
62. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, Solomon B, Stubbs H, Admane S, McDermott U, Settleman J, Kobayashi S, Mark EJ, Rodig SJ, Chirieac LR, Kwak EL, Lynch TJ, Iafrate AJ. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol* 2009;27:4247–4253.

63. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693-1703. Erratum in: *N Engl J Med.* 2011;364:588.
64. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, Serwatowski P, Gatzemeier U, Digumarti R, Zukin M, Lee JS, Mellempgaard A, Park K, Patil S, Rolski J, Goksel T, de Marinis F, Simms L, Sugarman KP, Gandara D. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3543–3551.
65. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM, Langer CJ, DeVore RF 3rd, Gaudreault J, Damico LA, Holmgren E, Kabbinavar F. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22:2184-2191.
66. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest.* 2002;122:1037-1057.
67. Lee BE, Port JL, Stiles BM, Saunders J, Paul S, Lee PC, Altorki N. TNM stage is the most important determinant of survival in metachronous lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1100–1105.
68. Shim HS, Park IK, Lee CY, Chung KY. Prognostic significance of visceral pleural invasion in the forthcoming (seventh) edition of TNM classification for lung cancer. *Lung Cancer* 2009;65:161–165.
69. Takeda S, Fukai S, Komatsu H, Nemoto E, Nakamura K, Murakami M; Japanese National Chest Hospital Study Group. Impact of large tumor size on survival after resection of pathologically node negative (pN0) non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2005;79:1142-1146.
70. Komaki R, Fujii T, Perkins P, Ro JY, Allen PK, Mason KA, Mountain CF, Milas L. Apoptosis and mitosis as prognostic factors in pathologically staged N1 non-small cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;36:601-605.
71. Lipford EH 3rd, Eggleston JC, Lillemoe KD, Sears DL, Moore GW, Baker RR. Prognostic factors in surgically resected limited-stage, non-small cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol.* 1984;8:357-365.
72. Khan OA, Fitzgerald JJ, Field ML, Soomro I, Beggs FD, Morgan WE, Duffy JP. Histological Determinants of Survival in Completely Resected T1-2N1M0 Non-small Cell Cancer of the Lung. *Ann Thorac Surg* 2004;77:1173–1178.
73. Sakao Y, Miyamoto H, Sakuraba M, Oh T, Shiomi K, Sonobe S, Izumi H. Prognostic significance of a histologic subtype in small adenocarcinoma of the lung: the impact of nonbronchioloalveolar carcinoma components. *Ann Thorac Surg.* 2007;83:209-214.

74. Yim J, Zhu LC, Chiriboga L, Watson HN, Goldberg JD, Moreira AL. Histologic features are important prognostic indicators in early stages lung adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 2007;20:233-241.
75. Yokose T, Suzuki K, Nagai K, Nishiwaki Y, Sasaki S, Ochiai A. Favorable and unfavorable morphological prognostic factors in peripheral adenocarcinoma of the lung 3 cm or less in diameter. *Lung Cancer.* 2000;29:179-188.
76. Ichinose Y, Yano T, Asoh H, Yokoyama H, Yoshino I, Katsuda Y. Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small-cell lung cancer. An analysis in each pathologic stage. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;110:601-605.
77. Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y, Harano T, Ogura N, Mitsudomi T, Some M, Yanagisawa K, Takahashi T, Osada H, Takahashi T. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene.* 2004;23:5360-5370.
78. Kessler R, Gasser B, Massard G, Roeslin N, Meyer P, Wihlm JM, Morand G. Blood vessel invasion is a major prognostic factor in resected non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:1489-1493
79. Maeshima AM, Niki T, Maeshima A, Yamada T, Kondo H, Matsuno Y. Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma. *Cancer.* 2002;95:2546-2554.
80. Sun Z, Yang P. Gene Expression Profiling on Lung Cancer Outcome Prediction: Present Clinical Value and Future Premise. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:2063–2068
81. Bréchet JM, Chevret S, Charpentier MC, Appere de Vecchi C, Capron F, Prudent J, Rochemaure J, Chastang C. Blood vessel and lymphatic vessel invasion in resected nonsmall cell lung carcinoma. Correlation with TNM stage and disease free and overall survival. *Cancer.* 1996;78:2111-2118
82. Szulman AE. Chemistry, distribution, and function of blood group substances. *Annu Rev Med.* 1966;17:307-322
83. Hirohashi S, Ino Y, Kodama T, Shimosato Y. Distribution of blood group antigens A, B, H, and I(Ma) in mucus-producing adenocarcinoma of human lung. *J Natl Cancer Inst.* 1984;72:1299-1305.
84. Alvarez-Fernandez E, Carretero-Albiñana L. Expression of blood group antigens by normal bronchopulmonary tissues and common forms of pulmonary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med.* 1991;115:42-49
85. Breimer ME, Jovall PA. Structural characterization of a blood group A heptaglycosylceramide with globo-series structure. The major glycolipid based blood group A antigen of human kidney. *FEBS Lett.* 1985;179:165-172
86. Le Pendu J, Lemieux RU, Lambert F, Dalix AM, Oriol R. Distribution of H type 1 and H type 2 antigenic determinants in human sera and saliva. *Am J Hum Genet.* 1982;34:402-415.

87. Oriol R, Le Pendu J, Mollicone R. Genetics of ABO, H, Lewis, X and related antigens. *Vox Sang.* 1986;51:161-171.
88. Szulman AE, Marcus DM. The histologic distribution of the blood group substances in man as disclosed by immunofluorescence. VI. The Le and Le antigens during fetal development. *Lab Invest.* 1973;28:565-574.
89. Juhl BR. Semiquantitative immunohistochemical evaluation of H-antigen expression in human ureters of different ABO- and Lewis types. *J Histochem Cytochem.* 1985;33:867-874.
90. Cordon-Cardo C, Lloyd KO, Finstad CL, McGroarty ME, Reuter VE, Bander NH, Old LJ, Melamed MR. Immunoanatomic distribution of blood group antigens in the human urinary tract. Influence of secretor status. *Lab Invest.* 1986;55:444-454.
91. Orntoft TF. Expression and biosynthesis of ABH-related carbohydrate antigens in normal and pathologic human urothelium. *APMIS Suppl.* 1990;17:1-34.
92. Nudelman E, Lavery SB, Kaizu T, Hakomori S. Novel fucolipids of human adenocarcinoma: characterization of the major Ley antigen of human adenocarcinoma as trifucosylnonaosyl Ley glycolipid (III3FucV3FucVI2FucnLc6). *J Biol Chem.* 1986;261:11247-11253.
93. Ruggiero F, Cooper HS, Steplewski Z. Immunohistochemical study of colorectal adenomas with monoclonal antibodies against blood group antigens (sialosyl-Le(a), Le(a), Le(b), Le(x), Le(y), A, B, and H). *Lab Invest.* 1988;59:96-103.
94. Davidsohn I, Ni LY. Loss of isoantigens A, B, and H in carcinoma of the lung. *Am J Pathol.* 1969;57:307-334.
95. Masamune H, Kawasaki H, Abe S, Oyama K, Yamaguchi Y. Molischpositive mucopolysaccharides of gastric cancers as compared with the corresponding components of gastric mucosae. 1. Fractionation procedure of gastric cancer and gastric mucosa. *Tohoku J Exp Med.* 1958 25;68:81-91.
96. Davidsohn I, Kovarik S, Ni LY. Isoantigens A, B, and H in benign and malignant lesions of the cervix. *Arch Pathol.* 1969;87:306-314.
97. Lee JS, Ro JY, Sahin AA, Hong WK, Brown BW, Mountain CF, Hittelman WN. Expression of blood-group antigen A—a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 1991;324:1084-1090.
98. Graziano SL, Tatum AH, Gonchoroff NJ, Newman NB, Kohman LJ. Blood group antigen A and flow cytometric analysis in resected early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3:87-93.
99. Pujol JL, Simony J, Demoly P, Charpentier R, Laurent JC, Daurès JP, Lehmann M, Guyot V, Godard P, Michel FB. Neural cell adhesion molecule and prognosis of surgically resected lung cancer. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148:1071-1075.

100. Rice TW, Tubbs RR, Hoeltge GA, Kirby TJ, Meeker DP, Medendorp SV, Bukowski RM. Expression of blood group antigen A by stage I non-small cell lung carcinomas. *Ann Thorac Surg.* 1995;59:568-572
101. Dresler CM, Ritter JH, Wick MR, Roper CL, Patterson GA, Cooper JD. Immunostains for blood group antigens lack prognostic significance in T1 lung carcinoma. *Ann Thorac Surg.* 1995;59:1069-1073.
102. Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem.* 1990;265:12111-12114.
103. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 1988;22:631-677.
104. Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science.* 1990;248:850-854.
105. Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature.* 1992;355:33-45.
106. Ritossa FM. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-573.
107. Gerner EW, Schneider MJ. Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature.* 1975;256:500-502.
108. Jornot L, Mirault ME, Junod AF. Differential expression of hsp70 stress proteins in human endothelial cells exposed to heat shock and hydrogen peroxide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991;5:265-275
109. Aucoin MM, Barhoumi R, Kochevar DT, Granger HJ, Burghardt RC. Oxidative injury of coronary venular endothelial cells depletes intracellular glutathione and induces HSP 70 mRNA. *Am J Physiol.* 1995;268:1651-1658.
110. Di Cesare S, Poccia F, Mastino A, Colizzi V. Surface expressed heat-shock proteins by stressed or human immunodeficiency virus (HIV)-infected lymphoid cells represent the target for antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Immunology.* 1992;76:341-343.
111. Fuller KJ, Issels RD, Slosman DO, Guillet JG, Soussi T, Polla BS. Cancer and the heat shock response. *Eur J Cancer.* 1994;30:1884-1891.
112. Botzler C, Issels R, Multhoff G. Heat-shock protein 72 cell-surface expression on human lung carcinoma cells is associated with an increased sensitivity to lysis mediated by adherent natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 1996;43:226-230.
113. Ferrarini M, Pupa SM, Zoocchi MR, Rugarli C, Ménard S. Distinct pattern of HSP72 and monomeric lamin receptor expression in human lung cancers infiltrated by $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Int J Cancer* 1994;57:486-490.
114. Udono H, Srivastava PK. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90 and hsp70. *Journal of Immunology* 1994;152: 5398-5403.

115. Vanbuskirk A, Crump BL, Margoliash E, Pierce SK. A peptide binding protein having a role in antigen presentation is a member of the HSP70 heat shock family. *J Exp Med* 1989;170:1799-1809.
116. Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C. Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 1992;51:613-619.
117. Mehlen P, Preville X, Chareyron P, Briolay J, Klemenz R, Arrigo AP. Constitutive expression of human hsp27, *Drosophila* hsp27, or human α B-Crystallin confers resistance to TNF and oxidative stress induced cytotoxicity in stably transfected murine L929 fibroblasts. *J Immunol* 1995;154:363-374.
118. Jäättelä M. Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor-induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 1993;151:4286-4294.
119. Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A, Oren M. Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins. *Nature* 1986;320:182-185.
120. Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988;8:531-539.
121. Edwards DP, Adams DJ, McGuire WL. Estradiol stimulates synthesis of a major intracellular protein in human breast cancer cell line (MCF-7). *Breast Cancer Res Treat* 1981;1:209-223.
122. Hettinga JV, Lemstra W, Meijer C, Los G, de Vries EG, Konings AW, Kampinga HH. Heat-shock protein expression in cisplatin-sensitive and resistant human tumor cells. *Int J Cancer* 1996;67:800-807.
123. Ciocca DR, Fuqua SA, Lock-Lim S, Toft DO, Ch WJ, McGuire WL. Response of human breast cancer cells to heat shock and chemotherapeutic drugs. *Cancer Res* 1992;52:3648-3654.
124. Moseley PL, York SJ, York J. Bleomycin induces the HSP-70 heat shock promoter in cultured cells. *Am J Resp Cell Mol Biol* 1989;1:89-93.
125. Volm M, Samsel B, Mattern J. Relationship between chemoresistance of lung tumours and cigarette smoking. *Br J Cancer* 1990;62:255-256.
126. Volm M, Mattern J. Resistance mechanisms and their regulation in lung cancer. *Crit Rev Oncog* 1996;7:227-244.
127. Têtu B, Lacasse B, Bouchard HL, Lagacé R, Huot J, Landry J. Prognostic influence of HSP-27 expression in malignant fibrous histiocytoma: a clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Research* 1992;52:2325-2328.
128. Elledge RM, Clark GM, Fuqua SA, Yu YY, Alfred DC. P53 protein accumulation detected by five different antibodies: Relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Res* 1994;54:3752-3757.

129. Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Miller GA, Wiemann MC, Zhou Z. A study of heat shock protein 27 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999;72:347-350.
130. Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chinè S, Lucchi M, Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR, Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G, Ciardiello F. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res*. 1998;4:241-249.
131. Swinson DE, Jones JL, Richardson D, Cox G, Edwards JG, O'Byrne KJ. Tumour necrosis is an independent prognostic marker in non-small cell lung cancer: correlation with biological variables. *Lung Cancer*. 2002;37:235-240.
132. Shimazaki H, Aida S, Sato M, Deguchi H, Ozeki Y, Tamai S. Lung carcinoma with rhabdoid cells: a clinicopathological study and survival analysis of 14 cases. *Histopathology*. 2001;38:425-434.
133. Izquierdo-Garcia FM, Moreno-Mata N, Herranz-Aladro ML, Cañizares MA, Alvarez-Fernandez E. Lung carcinoma with rhabdoid component. A series of seven cases associated with uncommon types of non-small cell lung carcinomas and alveolar entrapment. *Histol Histopathol*. 2010;25:1287-1295.
134. Sánchez-Mora N, Presmanes MC, Monroy V, Moreno N, Lara-Martínez JM, Aladro MH, Alvarez-Fernández E. Micropapillary lung adenocarcinoma: a distinctive histologic subtype with prognostic significance. Case series. *Hum Pathol*. 2008;39:324-330.
135. Riquet M, Foucault C, Berna P, Assouad J, Dujon A, Danel C. Prognostic value of histology in resected lung cancer with emphasis on the relevance of the adenocarcinoma subtyping. *Ann Thorac Surg*. 2006;81:1988-1995.
136. Terasaki H, Niki T, Matsuno Y, Yamada T, Maeshima A, Asamura H, Hayabuchi N, Hirohashi S. Lung adenocarcinoma with mixed bronchioloalveolar and invasive components: clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci, and immunohistochemical characterization. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:937-951.
137. Higashiyama M, Kodama K, Yokouchi H, Takami K, Mano M, Kido S, Kuriyama K. Prognostic value of bronchiolo-alveolar carcinoma component of small lung adenocarcinoma. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:2069-2073.
138. Castro CY, Coffey DM, Medeiros LJ, Cagle PT. Prognostic significance of percentage of bronchioloalveolar pattern in adenocarcinomas of the lung. *Ann Diagn Pathol*. 2001;5:274-284.
139. Sobue T, Suzuki T, Fujimoto I, Doi O, Tateishi R, Sato T. Prognostic factors for surgically treated lung adenocarcinoma patients, with special reference to smoking habit. *Jpn J Cancer Res*. 1991;82:33-39
140. Funai K, Yokose T, Ishii G, Araki K, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Nishiwaki Y, Ochiai A. Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 2003;27:978-984.

141. Mochizuki T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Mizuno T, Yokose T, Suzuki K, Ochiai A Pleomorphic carcinoma of the lung: clinicopathologic characteristics of 70 cases. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:1727-1735.
142. Shimosato Y, Suzuki A, Hashimoto T, Nishiwaki Y, Kodama T, Yoneyama T, Kameya T. Prognostic implications of fibrotic focus (scar) in small peripheral lung cancers. *Am J Surg Pathol.* 1980;4:365-373
143. Clayton F. The spectrum and significance of bronchioloalveolar carcinomas. *Pathol Annu.* 1988;23 Pt 2:361-394.
144. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki M, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, Kondo H, Shimosato Y. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer.* 1995 ;75:2844-2852.
145. Raeburn C, Spencer H. A study of the origin and development of lung cancer. *Thorax.* 1953;8:1-10.
146. Suzuki K, Yokose T, Yoshida J, Nishimura M, Takahashi K, Nagai K, Nishiwaki Y. Prognostic significance of the size of central fibrosis in peripheral adenocarcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg.* 2000 ;69:893-897.
147. Alvarez-Fernández E. Alveolar trapping in pulmonary carcinomas. *Diagn Histopathol.* 1982;5:59-64.
148. Dingemans KP, Mooi WJ. Invasion of lung tissue by bronchogenic squamous-cell carcinomas: interaction of tumor cells and lung parenchyma in the tumor periphery. *Int J Cancer.* 1986;37:11-19.
149. Pääkkö P, Risteli J, Risteli L, Autio-Harmanen H. Immunohistochemical evidence that lung carcinomas grow on alveolar basement membranes. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:464-473.
150. Nakanishi K, Kawai T, Suzuki M, Torikata C. Bronchogenic squamous cell carcinomas with invasion along alveolar walls. *Histopathology.* 1996;29:363-368.
151. Kobayashi H, Nagao H, Kanoh S, Motoyoshi K, Ozeki Y, Aida S. Squamous Cell Carcinoma of the Lung Spreading Along the Alveolar Walls With a Bubblelike Appearance on HRCT. *J Thorac Imaging.* 2006;21:57-59.
152. Ito N, Hirota T. Histochemical and cytochemical localization of blood group antigens. *Prog Histochem Cytochem.* 1992;25:1-85.
153. Cartron JP, Colin Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol.* 2001;8:163-199.
154. Ravn V, Dabelsteen E. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS.* 2000;108:1-28
155. Dabelsteen E, Gao S. ABO blood-group antigens in oral cancer. *J Dent Res.* 2005;84:21-28.
156. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Clément M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *APMIS.* 2001;109:9-31.

157. Moro-Rodríguez E, Alvarez-Fernández E. Losses of expression of the antigens A, Lea and Lex and over-expression of Ley in carcinomas and HG-SIL of the uterine cervix. *Diagn Pathol.* 2008;3:38.
158. Mandel U, Langkilde NC, Orntoft TF, Therkildsen MH, Karkov J, Reibel J, White T, Clausen H, Dabelsteen E. Expression of histo-blood-group-A/B-gene-defined glycosyltransferases in normal and malignant epithelia: correlation with A/B-carbohydrate expression. *Int J Cancer.* 1992;52:7-12.
159. Orntoft TF, Meldgaard P, Pedersen B, Wolf H. The blood group ABO gene transcript is down-regulated in human bladder tumors and growth-stimulated urothelial cell lines. *Cancer Res.* 1996;56:1031-1036.
160. Gao S, Worm J, Guldberg P, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Reibel J, Dabelsteen E. Genetic and epigenetic alterations of the blood group ABO gene in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2004;109:230-237.
161. Dabelsteen E. ABO blood group antigens in oral mucosa. What is new? *J Oral Pathol Med.* 2002;31:65-70.
162. Nakagoe T, Fukushima K, Itoyanagi N, Ikuta Y, Oka T, Nagayasu T, Ayabe H, Hara S, Ishikawa H, Minami H. Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128:257-264.
163. Stamatakos M, Kontzoglou K, Safioleas P, Safioleas C, Manti C, Safioleas M. Breast cancer incidence in Greek women in relation to ABO blood groups and Rh factor. *Int Semin Surg Oncol.* 2009;6:14.
164. Klimant E, Glurich I, Mukesh B, Onitilo A. Blood Type, Hormone Receptor Status, HER2/neu Status, and Survival in Breast Cancer: A Retrospective Study Exploring Relationships in a Phenotypically Well-Defined Cohort. *Clin Med Res.* 2011;9:111-118.
165. Wolpin BM, Chan AT, Hartge P, Chanock SJ, Kraft P, Hunter DJ, Giovannucci EL, Fuchs CS. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:424-431.
166. Iodice S, Maisonneuve P, Botteri E, Sandri MT, Lowenfels AB. ABO blood group and cancer. *Eur J Cancer.* 2010;46:3345-3350.
167. Edgren G, Hjalgrim H, Rostgaard K, Norda R, Wikman A, Melbye M, Nyrén O. Risk of gastric cancer and peptic ulcers in relation to ABO blood type: a cohort study. *Am J Epidemiol.* 2010;172:1280-1285.
168. Xie J, Qureshi AA, Li Y, Han J. ABO blood group and incidence of skin cancer. *PLoS One.* 2010 Aug 4;5(8):e11972.
169. de Giorgi V, Grazzini M, Gori A, Alfaioli B, Rossari S, Crocetti E, Vocioni F, Lotti T. ABO blood group and risk of cutaneous malignant melanoma. *Eur J Cancer Prev.* 2011;20:121-122.
170. Gates MA, Wolpin BM, Cramer DW, Hankinson SE, Tworoger SS. ABO blood group and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2011;128:482-486.

171. Sánchez-Mora N, Cebollero Presmanes M, Monroy V, Herranz Aladro M, Alvarez-Fernández E. Expression of histo-blood group antigens in bronchial squamous metaplasia. *Eur Respir J.* 2007;29:268-272.
172. Graziano SL, Gu L, Wang X, Tatum AH, Vollmer RT, Strauss GM, Kratzke R, Dudek AZ, Vokes EE, Green MR. 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;5:810-817.
173. Ulger AF, Keklik T, Kumbasar OO, Arbak P, Demirkazık A, Güngör A, Ereku S, Alper D. Prognostic significance of blood group antigen expression of tumor tissue in lung cancer patients. *Tumori.* 2002;88:395-399.
174. Kuemmel A, Single K, Bittinger F, Faldum A, Schmidt LH, Sebastian M, Taube C, Buhl R, Wiewrodt R. The prognostic impact of blood group-related antigen Lewis Y and the ABH blood groups in resected non-small cell lung cancer. *Tumour Biol.* 2007;28:340-349.
175. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998;80:183-201.
176. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;286:433-442.
177. Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304:505-512.
178. Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 2001;81:1461-1497.
179. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock.* 1999;11:1-12 y su comentario: Wong HR. Heat shock proteins. Facts, thoughts, and dreams. A. De Maio. *Shock* 11:1-12, 1999. *Shock.* 1999;12:323-325
180. Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res.* 1999;248:30-43.
181. Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 1997;16:221-229.
182. Shashidharamurthy R, Koteiche HA, Dong J, McHaourab HS. Mechanism of chaperone function in small heat shock proteins: dissociation of the HSP27 oligomer is required for recognition and binding of destabilized T4 lysozyme. *J Biol Chem.* 2005;280:5281-5289.
183. Thériault JR, Lambert H, Chávez-Zobel AT, Charest G, Lavigne P, Landry J. Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J Biol Chem.* 2004;279:23463-71.
184. Dorion S, Landry J. Activation of the mitogen-activated protein kinase pathways by heat shock. *Cell Stress Chaperones.* 2002;7:200-206.

185. Casado P, Zuazua-Villar P, del Valle E, Martínez-Campa C, Lazo PS, Ramos S. Vincristine regulates the phosphorylation of the antiapoptotic protein HSP27 in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2007;247:273-282.
186. Castellino F, Boucher PE, Eichelberg K, Mayhew M, Rothman JE, Houghton AN, Germain RN. Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J Exp Med.* 2000;191:1957-1964.
187. Wells AD, Malkovsky M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol Today.* 2000;21:129-132.
188. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 2000;6:435-442.
189. Wong HR, Wispé JR. The stress response and the lung. *Am J Physiol.* 1997;273:L1-L9.
190. Vignola AM, Chanez P, Polla BS, Vic P, Godard P, Bousquet J. Increased expression of heat shock protein 70 on airway cells in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1995;13:683-691.
191. Heufelder AE, Goellner JR, Wenzel BE, Bahn RS. Immunohistochemical detection and localization of a 72-kilodalton heat shock protein in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;74:724-731.
192. Omar R, Pappolla M, Saran B. Immunocytochemical detection of the 70-kd heat shock protein in alcoholic liver disease. *Arch Pathol Lab Med.* 1990;114:589-592.
193. Park HS, Lee JS, Huh SH, Seo JS, Choi EJ. Hsp72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase. *EMBO J.* 2001;20:446-456.
194. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7146-7159.
195. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J Biol Chem.* 2005;280:38729-39.
196. Li CY, Lee JS, Ko YG, Kim JI, Seo JS. Heat shock protein 70 inhibits apoptosis downstream of cytochrome c release and upstream of caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 2000;275:25665-71.
197. Komarova EY, Afanasyeva EA, Bulatova MM, Cheetham ME, Margulis BA, Guzhova IV. Downstream caspases are novel targets for the antiapoptotic activity of the molecular chaperone hsp70. *Cell Stress Chaperones.* 2004;9:265-275.
198. Song J, Takeda M, Morimoto RI. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol.* 2001;3:276-282.

199. Bivik C, Rosdahl I, Ollinger K. Hsp70 protects against UVB induced apoptosis by preventing release of cathepsins and cytochrome c in human melanocytes. *Carcinogenesis*. 2007;28:537-544.
200. Gyrd-Hansen M, Nylandsted J, Jäättelä M. Heat shock protein 70 promotes cancer cell viability by safeguarding lysosomal integrity. *Cell Cycle*. 2004;3:1484-1485.
201. Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J*. 1999;13:2061-2070.
202. Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*. 2000;2:645-652.
203. Mehlen P, Kretz-Remy C, Préville X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human alphaB-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNFalpha-induced cell death. *EMBO J*. 1996;15:2695-2706.
204. Parcellier A, Brunet M, Schmitt E, Col E, Didelot C, Hammann A, Nakayama K, Nakayama KI, Khochbin S, Solary E, Garrido C. HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27Kip1 and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J*. 2006;20:1179-1181.
205. Garrido C, Solary E. A role of HSPs in apoptosis through "protein triage"? *Cell Death Differ*. 2003;10:619-620.
206. Jäättelä M. Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer*. 1995;60:689-693.
207. Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E. Heat shock protein 27 enhances the tumorigenicity of immunogenic rat colon carcinoma cell clones. *Cancer Res*. 1998;58:5495-5499.
208. Lemieux P, Oesterreich S, Lawrence JA, Steeg PS, Hilsenbeck SG, Harvey JM, Fuqua SA. The small heat shock protein hsp27 increases invasiveness but decreases motility of breast cancer cells. *Invasion Metastasis*. 1997;17:113-123.
209. Garrido C, Ottavi P, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Chauffert B, Mehlen P. HSP27 as a mediator of confluence-dependent resistance to cell death induced by anticancer drugs. *Cancer Res*. 1997;57:2661-2667.
210. Hoang AT, Huang J, Rudra-Ganguly N, Zheng J, Powell WC, Rabindran SK, Wu C, Roy-Burman P. A novel association between the human heat shock transcription factor 1 (HSF1) and prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2000;156:857-864.
211. Song H, Ethier SP, Dziubinski ML, Lin J. Stat3 modulates heat shock 27kDa protein expression in breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314:143-150.

-
212. Ray S, Lu Y, Kaufmann SH, Gustafson WC, Karp JE, Boldogh I, Fields AP, Brasier AR. Genomic mechanisms of p210BCR-ABL signaling: induction of heat shock protein 70 through the GATA response element confers resistance to paclitaxel-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279:35604-15.
213. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jäättelä M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:7871-7876.
214. Zhao ZG, Shen WL. Heat shock protein 70 antisense oligonucleotide inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901. *World J Gastroenterol.* 2005;11:73-78.
215. Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, Annavarapu S, Mouttaki A, Sondarva G, Wei S, Wu J, Djeu J, Bhalla K. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood.* 2005;105:1246-1255.
216. Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales MC, Hunt CR, Dix DJ, Kroemer RT, Giordanetto F, Jäättelä M, Penninger JM, Pance A, Kroemer G, Garrido C Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res.* 2003;63:8233-8240.
217. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle.* 2006;5:2592-2601.
218. Rocchi P, So A, Kojima S, Signaevsky M, Beraldi E, Fazli L, Hurtado-Coll A, Yamanaka K, Gleave M. Heat shock protein 27 increases after androgen ablation and plays a cytoprotective role in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2004;64:6595-6602.
219. Tanaka Y, Fujiwara K, Tanaka H, Maehata K, Kohno I. Paclitaxel inhibits expression of heat shock protein 27 in ovarian and uterine cancer cells. *Int J Gynecol Cancer.* 2004;14:616-620.
220. Lee HJ, Kim EH, Seo WD, Choi TH, Cheon GJ, Lee YJ, Lee YS. Heat Shock Protein 27-Targeted Heptapeptide of the PKCA Catalytic V5 Region Sensitizes Tumors with Radio- and Chemoresistance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 80:221-230.
221. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Catley L, Tai YT, Hayashi T, Shringarpure R, Burger R, Munshi N, Ohtake Y, Saxena S, Anderson KC. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood.* 2003;102:3379-3386.
222. Ciocca DR, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones.* 2005;10:86-103.
223. De AK, Roach SE. Detection of the soluble heat shock protein 27 (hsp27) in human serum by an ELISA. *J Immunoassay Immunochem.* 2004;25:159-170.

224. Feng JT, Liu YK, Song HY, Dai Z, Qin LX, Almofti MR, Fang CY, Lu HJ, Yang PY, Tang ZY. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome analysis. *Proteomics*. 2005;5:4581-4588.
225. Abe M, Manola JB, Oh WK, Parslow DL, George DJ, Austin CL, Kantoff PW. Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 2004;3:49-53.
226. Conroy SE, Sasieni PD, Fentiman I, Latchman DS. Autoantibodies to the 90kDa heat shock protein and poor survival in breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 1998;34:942-943.
227. Olejek A, Damasiewicz-Bodzek A, Bodzek P, Wielkoszyński T, Zamłyński J, Stołtny P, Skutil M. Concentrations of antibodies against heat shock protein 27 in the sera of women with ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19:1516-1520.
228. Tavassol F, Starke OF, Kokemüller H, Wegener G, Müller-Tavassol CC, Gellrich NC, Eckardt A. Prognostic significance of heat shock protein 70 (HSP70) in patients with oral cancer. *Head Neck Oncol*. 2011;3:10.
229. Kaur J, Das SN, Srivastava A, Ralhan R. Cell surface expression of 70 kDa heat shock protein in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathological features. *Oral Oncol*. 1998;34:93-98.
230. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Expression of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress or pathogenicity. *Oral Oncol*. 1998;34:496-501.
231. Zhu Z, Xu X, Yu Y, Graham M, Prince ME, Carey TE, Sun D. Silencing heat shock protein 27 decreases metastatic behavior of human head and neck squamous cell cancer cells in vitro. *Mol Pharm*. 2010;7:1283-1290.
232. Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Yoshioka N, Yoshihama Y, Kishimoto K, Matsumura T. Prognostic significance of heat shock protein 27 (HSP27) in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2002;9:341-344.
233. Wang A, Liu X, Sheng S, Ye H, Peng T, Shi F, Crowe DL, Zhou X. Dysregulation of heat shock protein 27 expression in oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2009;9:167.
234. Lo Muzio L, Leonardi R, Marigiò MA, Mignogna MD, Rubini C, Vinella A, Pannone G, Giannetti L, Serpico R, Testa NF, De Rosa G, Staibano S. HSP 27 as possible prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*. 2004;19:119-128.
235. Lo Muzio L, Campisi G, Farina A, Rubini C, Ferrari F, Falaschini S, Leonardi R, Carinci F, Staibano S, De Rosa G. Prognostic value of HSP27 in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective analysis of 57 tumours. *Anticancer Res*. 2006;26:1343-1349.
236. Ito T, Kawabe R, Kurasono Y, Hara M, Kitamura H, Fujita K, Kanisawa M. Expression of heat shock proteins in squamous cell carcinoma of the tongue: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 1998;27:18-22.

237. Calderwood SK. Heat shock proteins in breast cancer progression--a suitable case for treatment? *Int J Hyperthermia*. 2010;26:681-685.
238. Zhang D, Wong LL, Koay ES. Phosphorylation of Ser78 of Hsp27 correlated with HER-2/neu status and lymph node positivity in breast cancer. *Mol Cancer*. 2007;6:52.
239. Thor A, Benz C, Moore D 2nd, Goldman E, Edgerton S, Landry J, Schwartz L, Mayall B, Hickey E, Weber LA. Stress response protein (srp-27) determination in primary human breast carcinomas: clinical, histologic, and prognostic correlations. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83:170-178.
240. Storm FK, Mahvi DM, Gilchrist KW. Lack of association between tumor necrosis and hsp-27 expression in primary breast cancer. *Surg Oncol*. 1996;61:14-16.
241. Ioachim E, Tsanou E, Briasoulis E, Batsis Ch, Karavasilis V, Charchanti A, Pavlidis N, Agnantis NJ. Clinicopathological study of the expression of hsp27, pS2, cathepsin D and metallothionein in primary invasive breast cancer. *Breast*. 2003;12:111-119.
242. Hurlimann J, Gebhard S, Gomez F. Oestrogen receptor, progesterone receptor, pS2, ERD5, HSP27 and cathepsin D in invasive ductal breast carcinomas. *Histopathology*. 1993;23:239-248.
243. Oesterreich S, Hilsenbeck SG, Ciocca DR, Allred DC, Clark GM, Chamness GC, Osborne CK, Fuqua SA. The small heat shock protein HSP27 is not an independent prognostic marker in axillary lymph node-negative breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 1996;2:1199-1206.
244. Ciocca DR, Luque EH. Immunological evidence for the identity between the hsp27 estrogen-regulated heat shock protein and the p29 estrogen receptor-associated protein in breast and endometrial cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1991;20:33-42.
245. Thanner F, Sütterlin MW, Kapp M, Rieger L, Morr AK, Kristen P, Dietl J, Gassel AM, Müller T. Heat shock protein 27 is associated with decreased survival in node-negative breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2005;25:1649-1653.
246. Love S, King RJ. A 27 kDa heat shock protein that has anomalous prognostic powers in early and advanced breast cancer. *Br J Cancer*. 1994;69:743-748.
247. Têtu B, Brisson J, Landry J, Huot J. Prognostic significance of heat-shock protein-27 in node-positive breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36:93-97.
248. Seymour L, Bezwoda WR, Meyer K. Tumor factors predicting for prognosis in metastatic breast cancer. The presence of P24 predicts for response to treatment and duration of survival. *Cancer*. 1990;66:2390-2394.
249. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:570-574.

250. Meng L, Hunt C, Yaglom JA, Gabai VL, Sherman MY. Heat shock protein Hsp72 plays an essential role in Her2-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene*. 2011;30:2836-2845.
251. Yiu CC, Chanplakorn N, Chan MS, Loo WT, Chow LW, Toi M, Sasano H. Down-regulation of heat-shock protein 70 (HSP-70) correlated with responsiveness to neoadjuvant aromatase inhibitor therapy in breast cancer patients. *Anticancer Res*. 2010;30:3465-3472.
252. Langdon SP, Rabiasz GJ, Hirst GL, King RJ, Hawkins RA, Smyth JF, Miller WR. Expression of the heat shock protein HSP27 in human ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 1995;1:1603-1609.
253. Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willemse PH, De Vries EG, Kampinga HH, Van der Zee AG. Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis. *Int J Cancer*. 1999;84:234-238.
254. Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. Heat shock protein 27: an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1998;69:14-16.
255. Geisler JP, Tammela JE, Manahan KJ, Geisler HE, Miller GA, Zhou Z, Wiemann MC. HSP27 in patients with ovarian carcinoma: still an independent prognostic indicator at 60 months follow-up. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2004;25:165-168.
256. Elpek GO, Karaveli S, Simşek T, Keles N, Aksoy NH. Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries. *APMIS*. 2003;111:523-530.
257. Annunziata CM, Kleinberg L, Davidson B, Berner A, Gius D, Tchabo N, Steinberg SM, Kohn EC. BAG-4/SODD and associated antiapoptotic proteins are linked to aggressiveness of epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:6585-6592.
258. Nanbu K, Konishi I, Mandai M, Kuroda H, Hamid AA, Komatsu T, Mori T. Prognostic significance of heat shock proteins HSP70 and HSP90 in endometrial carcinomas. *Cancer Detect Prev*. 1998;22:549-555.
259. El-Ghobashy AA, Shaaban AM, Innes J, Prime W, Herrington CS. Upregulation of heat shock protein 27 in metaplastic and neoplastic lesions of the endocervix. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15:503-509.
260. El-Ghobashy AA, Herrington CS. Overexpression of heat shock protein 27 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol*. 2009;40:1668-1669.
261. Ono A, Kumai T, Koizumi H, Nishikawa H, Kobayashi S, Tadokoro M. Overexpression of heat shock protein 27 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a proteomic analysis using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol*. 2009;40:41-49.

262. Tweedle EM, Khattak I, Ang CW, Nedjadi T, Jenkins R, Park BK, Kalirai H, Dodson A, Azadeh B, Terlizzo M, Grabsch H, Mueller W, Myint S, Clark P, Wong H, Greenhalf W, Neoptolemos JP, Rooney PS, Costello E. Low molecular weight heat shock protein HSP27 is a prognostic indicator in rectal cancer but not colon cancer. *Gut*. 2010;59:1501-1510.
263. Tsuruta M, Nishibori H, Hasegawa H, Ishii Y, Endo T, Kubota T, Kitajima M, Kitagawa Y. Heat shock protein 27, a novel regulator of 5-fluorouracil resistance in colon cancer. *Oncol Rep*. 2008;20:1165-1172.
264. Garrido C, Mehlen P, Fromentin A, Hammann A, Assem M, Arrigo AP, Chauffert B. Inconstant association between 27-kDa heat-shock protein (Hsp27) content and doxorubicin resistance in human colon cancer cells. The doxorubicin-protecting effect of Hsp27. *Eur J Biochem*. 1996;237:653-659.
265. Schmitt E, Maingret L, Puig PE, Rerole AL, Ghiringhelli F, Hammann A, Solary E, Kroemer G, Garrido C. Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res*. 2006;66:4191-4197.
266. Wang XP, Qiu FR, Liu GZ, Chen RF. Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1056-1059.
267. Kanazawa Y, Isomoto H, Oka M, Yano Y, Soda H, Shikuwa S, Takeshima F, Omagari K, Mizuta Y, Murase K, Nakagoe T, Ohtsuka K, Kohno S. Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in colorectal cancer. *Med Oncol*. 2003;20:157-164.
268. Teng LS, Jin KT, Han N, Cao J. Radiofrequency ablation, heat shock protein 70 and potential anti-tumor immunity in hepatic and pancreatic cancers: a minireview. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2010;9:361-365.
269. King KL, Li AF, Chau GY, Chi CW, Wu CW, Huang CL, Lui WY. Prognostic significance of heat shock protein-27 expression in hepatocellular carcinoma and its relation to histologic grading and survival. *Cancer*. 2000;88:2464-2470.
270. Lee CS, Montebello J, Rush M, Georgiou T, Wawryk S, Rode J. Overexpression of heat shock protein (hsp) 70 associated with abnormal p53 expression in cancer of the pancreas. *Zentralbl Pathol*. 1994;140:259-264.
271. Cairo G, Schiaffonati L, Rappocciolo E, Tacchini L, Bernelli-Zazzera A. Expression of different members of heat shock protein 70 gene family in liver and hepatomas. *Hepatology*. 1989;9:740-746.
272. Taba K, Kuramitsu Y, Ryozaawa S, Yoshida K, Tanaka T, Maehara S, Maehara Y, Sakaida I, Nakamura K. Heat-shock protein 27 is phosphorylated in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Anticancer Res*. 2010;30:2539-2543.
273. Huang Q, Ye J, Huang Q, Chen W, Wang L, Lin W, Lin J, Lin X. Heat shock protein 27 is over-expressed in tumor tissues and increased in sera of patients with gastric adenocarcinoma. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:263-269.

274. Kapranos N, Kominea A, Konstantinopoulos PA, Savva S, Artelaris S, Vadoros G, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. Expression of the 27-kDa heat shock protein (HSP27) in gastric carcinomas and adjacent normal, metaplastic, and dysplastic gastric mucosa, and its prognostic significance. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2002;128:426-432.
275. Giaginis C, Daskalopoulou SS, Vgenopoulou S, Sfiniadakis I, Kouraklis G, Theocharis SE. Heat Shock Protein-27, -60 and -90 expression in gastric cancer: association with clinicopathological variables and patient survival. *BMC Gastroenterol.* 2009;9:14.
276. Wang XP, Liu GZ, Song AL, Chen RF, Li HY, Liu Y. Expression and significance of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2005;11:429-432.
277. Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Müller W. Expression of heat shock protein 70 in grossly resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg.* 2002;74:222-226.
278. Kawanishi K, Shiozaki H, Doki Y, Sakita I, Inoue M, Yano M, Tsujinaka T, Shamma A, Monden M. Prognostic significance of heat shock proteins 27 and 70 in patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer.* 1999;85:1649-1657.
279. Romani AA, Crafa P, Desenzani S, Graiani G, Lagrasta C, Sianesi M, Soliani P, Borghetti AF. The expression of HSP27 is associated with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *BMC Cancer.* 2007;7:232.
280. Valera VA, Li-Ning-T E, Walter BA, Roberts DD, Linehan WM, Merino MJ. Protein expression profiling in the spectrum of renal cell carcinomas. *J Cancer.* 2010;1:184-196.
281. Erkizan O, Kirkali G, Yörükoğlu K, Kirkali Z. Significance of heat shock protein-27 expression in patients with renal cell carcinoma. *Urology.* 2004;64:474-478.
282. Sakai I, Miyake H, Takenaka A, Fujisawa M. Expression of potential molecular markers in renal cell carcinoma: impact on clinicopathological outcomes in patients undergoing radical nephrectomy. *BJU Int.* 2009;104:942-946.
283. Storm FK, Mahvi DM, Gilchrist KW. Hsp-27 has no diagnostic or prognostic significance in prostate or bladder cancers. *Urology.* 1993;42:379-382.
284. Thomas SA, Brown IL, Hollins GW, Hocken A, Kirk D, King RJ, Leake RE. Detection and distribution of heat shock proteins 27 and 90 in human benign and malignant prostatic tissue. *Br J Urol.* 1996;77:367-372.
285. Andrieu C, Taieb D, Baylot V, Ettinger S, Soubeyran P, De-Thonel A, Nelson C, Garrido C, So A, Fazli L, Bladou F, Gleave M, Iovanna JL, Rocchi P. Heat shock protein 27 confers resistance to androgen ablation and chemotherapy in prostate cancer cells through eIF4E. *Oncogene.* 2010;29:1883-1896.
286. Hassan S, Biswas MH, Zhang C, Du C, Balaji KC. Heat shock protein 27 mediates repression of androgen receptor function by protein kinase D1 in prostate cancer cells. *Oncogene.* 2009;28:4386-4396.

287. Jones EL, Zhao MJ, Stevenson MA, Calderwood SK. The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in prostate cancer. *Int J Hyperthermia*. 2004;20:835-849.
288. El-Meghawry El-Kenawy A, El-Kott AF, Hasan MS. Heat shock protein expression independently predicts survival outcome in schistosomiasis-associated urinary bladder cancer. *Int J Biol Markers*. 2008;23:214-218.
289. Lebet T, Watson RW, Molinié V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer*. 2003;98:970-977.
290. Strahler JR, Kuick R, Hanash SM. Diminished phosphorylation of a heat shock protein (HSP 27) in infant acute lymphoblastic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;175:134-142.
291. Steiner K, Graf M, Hecht K, Reif S, Rossbacher L, Pfister K, Kolb HJ, Schmetzer HM, Multhoff G. High HSP70-membrane expression on leukemic cells from patients with acute myeloid leukemia is associated with a worse prognosis. *Leukemia*. 2006;20:2076-2079.
292. Chant ID, Rose PE, Morris AG. Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry. *Br J Haematol*. 1995;90:163-168.
293. Thomas X, Campos L, Mounier C, Cornillon J, Flandrin P, Le QH, Piselli S, Guyotat D. Expression of heat-shock proteins is associated with major adverse prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2005;29:1049-1058.
294. Kato M, Herz F, Kato S, Hirano A. Expression of stress-response (heat-shock) protein 27 in human brain tumors: an immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*. 1992;83:420-422.
295. Kato S, Hirano A, Kato M, Herz F, Ohama E. Comparative study on the expression of stress-response protein (srp) 72, srp 27, alpha B-crystallin and ubiquitin in brain tumours. An immunohistochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1993;19:436-442.
296. Hitotsumatsu T, Iwaki T, Fukui M, Tateishi J. Distinctive immunohistochemical profiles of small heat shock proteins (heat shock protein 27 and alpha B-crystallin) in human brain tumors. *Cancer*. 1996;77:352-361.
297. Zanini C, Pulerà F, Carta F, Giribaldi G, Mandili G, Maule MM, Forni M, Turrini F. Proteomic identification of heat shock protein 27 as a differentiation and prognostic marker in neuroblastoma but not in Ewing's sarcoma. *Virchows Arch*. 2008;452:157-167.
298. Morii T, Ohtsuka K, Ohnishi H, Mochizuki K, Satomi K. Inhibition of heat-shock protein 27 expression eliminates drug resistance of osteosarcoma to zoledronic acid. *Anticancer Res*. 2010;30:3565-3371.
299. Trieb K, Lechleitner T, Lang S, Windhager R, Kotz R, Dirnhofer S. Heat shock protein 72 expression in osteosarcomas correlates with good response to neoadjuvant chemotherapy. *Hum Pathol*. 1998;29:1050-1055.

300. Kase S, Parikh JG, Rao NA. Expression of heat shock protein 27 and alpha-crystallins in human retinoblastoma after chemoreduction. *Br J Ophthalmol.* 2009;93:541-544.
301. Jmor F, Kalirai H, Taktak A, Damato B, Coupland SE. HSP-27 protein expression in uveal melanoma: correlation with predicted survival. *Acta Ophthalmol.* 2010 Nov 26. doi: 10.1111/j.1755-3768.2010.02038.x. [Epub ahead of print].
302. Bonay M, Soler P, Riquet M, Battesti JP, Hance AJ, Tazi A. Expression of heat shock proteins in human lung and lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;10:453-461.
303. Sandoval P. Estudio Inmunohistoquímico de la Expresión de Proteínas de Choque Térmico (HSP 70 y HSP 27) en Pulmón Humano Normal y Tumoral. Tesis Doctoral Universidad Complutense, 2003.
304. Moreno N. Expresión Tumoral de Proteínas de Choque Térmico En el Carcinoma Pulmonar no Células Pequeñas en Estadio I tras Resección Quirúrgica y su Influencia en la Supervivencia. Tesis Doctoral Universidad Complutense, curso 2004-2005.
305. Volm M, Koomägi R, Mattern J, Efferth T. Protein expression profile of primary human squamous cell lung carcinomas indicative of the incidence of metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2002;19:385-390.
306. Koomägi R, Stammler G, Manegold C, Mattern J, Volm M. Expression of resistance-related proteins in tumoral and peritumoral tissues of patients with lung cancer. *Cancer Lett.* 1996;110:129-136.
307. Volm M, Koomägi R, Mattern J, Stammler G. Heat shock (hsp70) and resistance proteins in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Lett.* 1995;95:195-200.
308. Volm M, Mattern J, Stammler G. Up-regulation of heat shock protein 70 in adenocarcinomas of the lung in smokers. *Anticancer Res.* 1995;15:2607-2609.
309. Stammler G, Koomagi R, Mattern J, Volm M. Comparison of the mRNA expression of factors related to drug resistance in lung tumors and adjacent normal tissue. *Int J Oncol.* 1996;8:537-542.
310. Malusecka E, Zborek A, Krzyzowska-Gruca S, Krawczyk Z. Expression of heat shock proteins HSP70 and HSP27 in primary non-small cell lung carcinomas. An immunohistochemical study. *Anticancer Res.* 2001;21:1015-1021.
311. Vargas SO, Leslie KO, Vacek PM, Socinski MA, Weaver DL. Estrogen-receptor-related protein p29 in primary nonsmall cell lung carcinoma: pathologic and prognostic correlations. *Cancer.* 1998;82:1495-1500.
312. Michils A, Redivo M, Zegers de Beyl V, de Maertelaer V, Jacobovitz D, Rocmans P, Duchateau J. Increased expression of high but not low molecular weight heat shock proteins in resectable lung carcinoma. *Lung Cancer.* 2001;33:59-67.

313. Graner MW, Bigner DD. Chaperone proteins and brain tumors: potential targets and possible therapeutics. *Neuro Oncol.* 2005;7:260-278.
314. Yang I, Fang S, Parsa AT. Heat shock proteins in glioblastomas. *Neurosurg Clin N Am.* 2010;21:111-123.
315. Liu B, Nash J, Runowicz C, Swede H, Stevens R, Li Z. Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges. *J Hematol Oncol.* 2010;3:7.

RESUMEN EN INGLÉS
(ENGLISH SUMMARY)

Introduction

Lung carcinoma is the second most common cancer worldwide, following prostatic carcinoma in incidence but it remains the highest in mortality. The five year survival varies depending on the geographical areas but it ranges between 6 and 14% for males and between 7 and 18% for females, in such way that the total deaths due to pulmonary carcinoma are higher than those caused by colonic, mammary and prostatic carcinomas together, in spite of the advances in diagnosis and therapeutics. Even among patients with localized disease who are treated with surgical resection, 73% and 58% of them, respectively in stage IA and IB, live longer than 5 years. Further studies in order to discriminate which cases purported either a favorable or dismal clinical course are pivotal to know the patients who will need additional treatment and to look for new and more specific therapies.

Nowadays, in the molecular age, a so classic and conventional procedure as staging constitutes the most important isolated factor to determine the survival, predict the prognosis, select the therapies and stratify the patients. Histological features of the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) as prognostic factors have been variously studied with diverse and not uniform results. So the histologic type of the tumor, grade of differentiation, growth pattern at the periphery of the tumor, necrosis, presence of scar and desmoplasia inside the neoplasm, vascular invasion either lymphatic, venous or even arterial; mitotic count have been studied with diverse and sometimes contradictory results depending on the different series. Among the most constant microscopic features with prognostic implications are: vascular invasion, desmoplasia and some histologic patterns or variations as micropapillar areas in adenocarcinoma (AC), carcinomas with

rhabdoid differentiation as unfavorable factors or bronchioloalveolar carcinoma (BC) or extensive areas with this bronchioloalveolar pattern as favorable ones.

On the other hand numerous molecular changes and diverse profiles of expression of different markers have been found, some of them with important consequences for the treatment and survival of the patients. Immunohistochemical features of several components of the ABH blood group have been studied both in NSCLCs and non-tumor pulmonary tissue. The loss of staining in lung carcinoma with antibodies against the histoantigen of blood-group A among the patients who belong to this blood group is associated with worse clinical survival.

Heat shock proteins (HSP) are ubiquitous proteins present in practically each cell, varying their amount and type or family of HSP depending of the tissue and its pathophysiological status. Although their roles in cancer are not completely understood it seems to be that HSPs are involved in numerous functions. The different families of these proteins have been widely studied in many types of tumors. They are frequently demonstrated in neoplasms but their implications as predictive or prognostic factors have resulted contradictory.

Objectives

1.-To study in our surgical series of 470 NSCLCs the next histological characteristics:
1) histologic type, 2) grade of differentiation, 3) entrapment of normal alveoli (AE) inside the tumor, 4) volume of the stroma in the area where the alveoli are entrapped and in the areas lacking such entrapment, 5) presence and amount of tumor necrosis, 6)

presence of scar either central or peripheral, 7) presence of tumor spreading from one alveolus to another at the periphery.

2.- To determine the immunohistochemical expression of blood-group antigen A, trying to establish the relationship between that expression and the blood-group of the patient: loss of the antigen A in blood-group A patients or aberrant expression in the patients with other blood-group; these findings are correlated with the characteristics of paragraph 1.

3.- To determine the immunohistochemical expression of heat shock proteins Hsp27 and Hsp70; these findings are correlated with the characteristics of paragraphs 1 and 2.

4.- To correlate in this series of non-small cell lung cancers the different characteristics studied in the three paragraphs above referred with TNM staging, overall survival and disease free survival trying to establish prognostic signification of such parameters, possible prognostic characteristics, both in the complete series and mainly in localized tumors (stage I and II). To correlate the diverse characteristics in multivariate analysis studying the relationships of the expression of different proteins, blood-group antigen A and the histological features.

Results

Clinical data: Patients: 425 were men (90.4%) and 45 women (9.6%), whose age ranged from 33 to 82 years (mean age: 64 years, median age: 65 years). Surgical

resection was performed in all cases: 309 lobectomies, 15 bilobectomies, 82 pneumonectomies and 64 wedge resections.

Tumor stage was Ia in 119 patients, Ib in 202 patients, IIa in 52 patients, IIb in 32 patients, IIIa in 56 patients, IIIb in 3 patients and IV in 6 patients.

Histological findings

Histological distribution: 219 tumors corresponded to squamous cell carcinomas (SCs), 186 to ACs, 15 to BACs, 31 to NSCLC-NOS, 11 to adenosquamous carcinomas (ASC) and 8 to other types.

Grade of differentiation: Among the 310 cases studied for grade of differentiation of the tumor 25 were well differentiated, 135 moderately differentiated and 150 poorly differentiated.

Alveolar entrapment was present in 115 out of 470 cases. It was more common among SCs, 43.4% (95 cases) of which showed this histological characteristic, whereas it was demonstrated in only 5.9% of the ACs and 12.9% of NSCLC-NOS. 36,3% of ASCs, mainly in squamous areas, displayed AE, but it was absent in all BACs ($p < 0.0001$). In most of tumors with AE this was moderate (45/115) or abundant (43/115) in grade, and extensively distributed within the tumor with 92 cases showing alveolar lumina 2mm inside the tumor limit. The entrapped alveoli were localized just inside the limit of the tumor solely in 9 cases. Grade and extension of AE were correlated in such way that most of cases displayed abundant entrapment extensively distributed ($p < 0.0001$) and all the cases with abundant entrapment (grade 3) showed extensively distribution of the included alveoli.

Stroma: it was abundant in 64% of cases and it correlated with the grade of differentiation.

Necrosis: most tumors showed moderate (155/470) or abundant (116) necrosis, whereas 101 cases did not displayed necrosis. The well differentiated tumors had less necrosis than moderate or poorly differentiated and tumors with AE had more necrosis than tumors without AE.

Interalveolar spreading: it was present in 284 out of 345 cases studied for this feature. It was more frequent in tumors with AE and in tumors with scar.

Scar: it was found in 89 of the 470 cases, more common in ACs (56/186) compared with SCs (20/219). The neoplasm with scar presented lesser grade of necrosis.

Immunohistochemical results

Blood-group A antigen

57.1% of the patients belonged to blood-group A; 37% of them presented loss of expression of the antigen of blood-group A in their tumors.

Heat shock proteins Hsp27 and Hsp70

Hsp27 was positive in 86% of cases and Hsp70 in 87% of cases, both proteins in a majority of cells and with moderate or intense staining. Most tumors were positive for both proteins in such way that only 5% of cases were negative with both antibodies.

Survival results

Overall survival

Overall survival was statistically related with **staging** ($p < 0.001$) and **age**, being worse for patients older than 65 year, the median age of the series ($p < 0.001$). Male **sex** was a feature of higher mortality, not significant although with statistical trend ($p = 0.063$).

Well **differentiated** tumors displayed better survival than moderate or poorly differentiated ones ($p = 0.005$).

Alveolar entrapment was not significant for survival but among the cases with AE those with higher grade of AE or with extensive AE presented better survival than the cases with scanty and/or localized AE ($p = 0.03$ and $p = 0.04$ respectively).

The **remainder histological features** that we studied were not significant for survival.

Tumors positive for **blood group A** antigen on the immunohistochemical study had better survival although it does not reach statistical significance ($p = 0.056$) and patients of blood-group A whose tumor showed loss of immunohistochemical expression of blood-group A antigen had worse survival ($p = 0.017$).

Disease free survival

Disease free survival (DFS) was statistically related with **staging** ($p < 0.001$) and the tumor diameter inside T1 tumor classification, dividing the tumors in $< 1\text{cm}$, $> 1\text{cm}-3\text{cm}$ and $> 3\text{cm}$ ($p = 0.004$).

Likewise well **differentiated** tumors displayed better DFS than moderate or poorly differentiated ones ($p = 0.049$) and **alveolar entrapment** was not significant but cases with higher extensive AE presented better DFS than cases with localized AE ($p = 0.008$).

Cases with scar in their tumors presented worse DFS ($p=0.025$) and those patients of **blood-group A** whose tumor showed loss of immunohistochemical expression of blood-group A antigen had worse DFS ($p=0.017$).

Multivariant statistical study

Only age higher than 65 years ($p<0.001$), lymph node involvement ($p<0.001$), staging ($p<0.001$) and grade of differentiation ($p=0.014$) resulted significant in statistical study.

Non statistical significant results

The rest of histological characteristics, immunohistochemical results of Hsp27 and Hsp70 and different combinations of results resulted non-significant from the point of view of OS or DFS.

CONCLUSIONS

- 1.-** In the cases of present study the general prognostic parameters for NSCLCs as staging ($p<0.001$) and age older than 65 years ($p<0.001$) are significantly correlated with survival what validates our series.
- 2.-** The subdivision of stage I depending of the tumor diameter in 3 groups (<1cm, >1cm-3cm and >3cm) was significant for OFS ($p=0.004$) rising the substaging according to this range of tumor measures.
- 3.-** Histologic findings as poor differentiation ($p=0.005$) and scar ($p=0.025$) purport worse survival, the later only for OFS.

4.- Alveolar entrapment inside NSCLCs is a frequent and poorly studied phenomenon, associated with worse OS, although it does not reach statistical significance ($p=0.056$).

5.- Cases with scanty AE or in which it is limited to the periphery of the tumor show worse survival whereas the cases with abundant and/or extensive AE present survival similar to cases without AE.

6.- Cases with interalveolar tumor spreading at the interphase between the neoplasm and the adjacent lung tissue have worse OS ($p=0.037$).

7.- The amount of necrosis and stroma is not related with survival.

8.- Tumors positive for blood-group A antigen on the immunohistochemical study display better survival, although it does not reach statistical significance ($p=0.056$).

9.- Patients of blood-group A whose carcinoma present loss of blood-group A antigen on the immunohistochemical study have worse OS ($p=0.017$).

10.- The heat shock proteins Hsp27 and Hsp70 that we studied are positive in most NSCLCs but without specific distribution from the viewpoint of the histologic type or survival.

REFERENCES

1. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R, Ajani UA, Kohler B, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1672–1694.
2. Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, et al. Pathology and genetics of tumors of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press; 2004.
3. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003;58:892-900.

4. Huang YT, Heist RS, Chirieac LR, Lin X, Skaug V, Zienolddiny S, Haugen A, Wu MC, Wang Z, Su L, et al. Genome-wide analysis of survival in early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:2660–2667.
5. Lee BE, Port JL, Stiles BM, Saunders J, Paul S, Lee PC, Altorki N. TNM stage is the most important determinant of survival in metachronous lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2009;88:1100–1105.
6. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*. 2002;122:1037-1057.
7. Yim J, Zhu LC, Chiriboga L, Watson HN, Goldberg JD, Moreira AL. Histologic features are important prognostic indicators in early stages lung adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2007;20:233-241.
8. Ichinose Y, Yano T, Asoh H, Yokoyama H, Yoshino I, Katsuda Y. Prognostic factors obtained by a pathologic examination in completely resected non-small-cell lung cancer. An analysis in each pathologic stage. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110:601-605.
9. Sánchez-Mora N, Presmanes MC, Monroy V, Moreno N, Lara-Martínez JM, Aladro MH, Alvarez-Fernández E. Micropapillary lung adenocarcinoma: a distinctive histologic subtype with prognostic significance. Case series. *Hum Pathol*. 2008;39:324-330.
10. Alvarez-Fernández E. Alveolar trapping in pulmonary carcinomas. *Diagn Histopathol*. 1982;5:59-64.
11. Izquierdo-Garcia FM, Moreno-Mata N, Herranz-Aladro ML, Cañizares MA, Alvarez-Fernandez E. Lung carcinoma with rhabdoid component. A series of seven cases associated with uncommon types of non-small cell lung carcinomas and alveolar entrapment. *Histol Histopathol*. 2010;25:1287-1295.
12. Mochizuki T, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Mizuno T, Yokose T, Suzuki K, Ochiai A. Pleomorphic carcinoma of the lung: clinicopathologic characteristics of 70 cases. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1727-1735.
13. Iodice S, Maisonneuve P, Botteri E, Sandri MT, Lowenfels AB. ABO blood group and cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46:3345-3350.
14. Lee JS, Ro JY, Sahin AA, Hong WK, Brown BW, Mountain CF, Hittelman WN. Expression of blood-group antigen A--a favorable prognostic factor in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 1991;324:1084-1090.
15. Alvarez-Fernandez E, Carretero-Albiñana L. Expression of blood group antigens by normal bronchopulmonary tissues and common forms of pulmonary carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. 1991;115:42-49
16. Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem*. 1990;265:12111-12114.