



Universidad de Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO: AVANCES EN MEDICINA

**EXPRESIÓN DE MUC1. VALOR PREDICTIVO Y PRONÓSTICO EN EL
ADENOCARCINOMA DE PULMÓN**

ANA MARÍA BLANCO BADILLO

**EXPRESIÓN DE MUC1.
VALOR PREDICTIVO Y
PRONÓSTICO EN EL
ADENOCARCINOMA DE
PULMÓN.**

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa.”

Mahatma Gandhi

A MI MADRE.

AGRADECIMIENTOS

Es este un momento especial en el que sin duda alguna la palabra GRACIAS adquiere un valor especial.

El camino andado ha sido duro, especialmente en algunos tramos, en los cuales encontrar de nuevo la senda llana...se antojaba casi imposible.

Mi primer recuerdo y agradecimiento siempre, por haber luchado conmigo por volver a vivir e iniciarme en mis primeros pasos en la investigación con mi tesina, al Prof. Dr. Luciano Muñoz Barragán, Profesor Emérito de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Un encuentro en el aeropuerto con un ser humano único, un profesional reconocido mundialmente, un luchador invencible por la vida, un ejemplo en todo y para todo; Prof. Dr. Jaime Martínez González-Del Río, director de esta tesis; Jefe de Servicio de Neumología del Instituto Nacional de Silicosis durante muchos años, hizo plantar la primera semilla de esta tesis, que hoy por fin sale a la luz. Jaime... sin tu apoyo, tu cariño incondicional, tu saber hacer y estar, esta tesis nunca hubiera concluido. A veces hay cosas inexplicables que unen ... la fuerza por seguir en la escena de la vida, en los que casi la perdemos...eso no es expresable. Esta tesis es tan tuya como mía.

Gracias a la Prof^a. Dra. Adonina Tardón, directora de esta tesis, por su buena disposición y enseñanza a lo largo de estos años.

Gracias al Departamento de Inmunología del Hospital Universitario Central de Asturias, por su exquisito cuidado y trabajo con las muestras necesarias para la realización de la tesis.

Gracias al Dr. Jaime Baladrón Romero, Director del Curso MIR Asturias, magnífico Cirujano Máxilo-Facial, compañero y amigo. Su constancia en el trabajo, su afán por la perfección, su mano siempre tendida para levantarme...ha sido vital para seguir.

Gracias a la Dra. Paula Jiménez Fonseca, Oncóloga brillante del Hospital Universitario Central de Asturias. Difícil por no decir imposible, encontrar una persona que reúna tantas virtudes...a su profesionalidad ingente se le une un corazón plagado de ternura, una capacidad de trabajo indescriptible. Es un honor, Paula, formar parte de tu vida. No tengo palabras para expresarte lo que te debo.

Gracias a la Dra. Guadalupe De la Riva, Jefa del Servicio de Urgencias del Hospital de Cabueñes de Gijón. Quien desde la comprensión y la serenidad me ha ayudado en muchos oscuros momentos de esta etapa.

Gracias a la Dra. Pilar Tamayo. Desde hace muchos años su trabajo impecable y su rostro amable en circunstancias durísimas marcaron una huella imborrable en mi camino.

Gracias a Fernando Sánchez por el manejo de los datos epidemiológicos y estadísticos y su enorme paciencia para aclararme tantas dudas del trabajo.

Gracias a Mercedes Fernández, mi secretaria y amiga; quien ha hecho que las tardes de consulta hayan sido relajadas y llevaderas...haciéndome olvidar mi cansancio, durante muchos meses.

Gracias a Ana Torradas, enfermera intachable y amiga. Sin ella la extracción de las muestras hubiera sido imposible. Su buen humor, apoyo constante y cariño infinito hoy me laten.

Gracias a mis amigos, quienes han soportado durante mucho tiempo mis impertinencias, ausencias, malos ratos, en especial a Marian, Ángeles, Lydia (desde tu querida Sevilla, siempre te he sentido a mi lado), Juanjo, Myriam, Javier, Tita, Águeda y María Jesús, Pili, Isabel, Pilar, Tomás, Laura y Héctor, Martín, Lucía y Paula.

A la memoria de mi prima, Carmen Morán. Desde el cielo sé que celebras este momento como celebraste mi triunfo sobre el dolor en aquellos difíciles momentos.

A mi familia, a mi padre, mi hermano Ricardo y a Mari Carmen.

A mi madre, a quien va dedicada esta tesis y toda mi vida. Por tu confianza en mí siempre, por tu grandísima capacidad de sacrificio, por tu enorme sentido de la responsabilidad, por tu constante motivación, por tu inmensa paciencia, por tu lucha diaria porque siempre llegara a lo más alto y consiguiera todos mis sueños. Gracias Mamá sin ti...nada de lo más hermoso que me ha pasado en esta vida hubiese sido posible. Los errores han sido sólo míos...y gracias por hacérmelos hecho ver desde el lado más liviano y ayudarme a superarlos. Dios me ha dado la madre más buena que pueda existir.

Gracias a Dios...quien me ha puesto muchas dificultades a lo largo de mi vida pero siempre me ha dado la fuerza necesaria y las mejores personas para salir adelante.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DEL CÁNCER.....	2
1.2. CÁNCER DE PULMÓN.....	4
1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
1.2.2. FACTORES DE RIESGO PARA CÁNCER DE PULMÓN.....	13
1.2.2.1. TABACO.....	13
1.2.2.2. FACTORES OCUPACIONALES.....	15
1.2.2.3. DIETA Y NUTRIENTES.....	16
1.2.2.4. ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.....	16
1.2.2.5. FACTORES ATMOSFÉRICOS.....	17
1.2.2.6. FACTORES GENÉTICOS.....	17
1.2.2.6.1. FACTORES DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGFR).....	17
1.2.2.6.2. OTROS BIOMARCADORES.....	23
1.2.2.6.3. BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....	25
1.2.2.6.4. BIOMARCADORES PRONÓSTICO.....	25
1.2.3. HISTOGÉNESIS Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PULMÓN.....	27
1.2.3.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN.....	31
1.2.3.2. TNM-Estadios 2009 IASLC – UICC – AJCC. Séptima edición.....	32
1.2.4. TRATAMIENTO.....	36
1.2.4.1. MODALIDADES TERAPÉUTICAS.....	36
1.2.4.2. TRATAMIENTO POR ESTADIOS.....	38
2. HIPÓTESIS.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	43
3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	43

4.	MATERIAL Y MÉTODO	44
4.1.	MATERIAL.....	45
4.1.1.	FUENTE DE INFORMACIÓN	45
4.1.2.	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	45
4.1.2.1.	TIPO DE ESTUDIO	45
4.1.2.2.	DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN (PACIENTES)	45
4.1.2.2.1.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	45
4.1.2.2.2.	PERÍODO DE OBSERVACIÓN.....	46
4.1.3.	DEFINICIÓN Y ENUMERACIÓN DE VARIABLES DEL ESTUDIO	46
4.2.	MÉTODO	48
4.2.1.	MUC1	48
4.2.2.	TÉCNICA DE ESTUDIO DE MUC1.....	52
4.2.2.1.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	52
4.2.2.2.	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO REAL (RT-PCR)	53
4.2.2.3.	EQUIPOS PARA RT-PCR.....	57
4.2.2.4.	VENTAJAS DE LA PCR A TIEMPO REAL.....	59
4.2.2.5.	NUESTRO MÉTODO DE DETERMINACIÓN.....	60
4.2.3.	METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.....	61
4.2.3.1.	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	61
4.2.3.2.	ESTADÍSTICA INFERENCIAL UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE	61
4.2.4.	ASPECTOS ÉTICOS	62
4.2.4.1.	CONSIDERACIONES GENERALES.....	62
4.2.4.2.	EVALUACIÓN BENEFICIO-RIESGO.....	63
4.2.4.3.	PROCESO, ALMACENAMIENTO Y CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS	63
4.2.4.4.	INTERFERENCIA CON LOS HÁBITOS DE PRESCRIPCIÓN DEL MÉDICO	63
4.2.4.5.	PROCEDIMIENTOS DE COMUNICACIÓN DE REACCIONES ADVERSAS (RA)	64
5.	RESULTADOS	65

5.1.	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA	66
5.1.1.	EDAD.....	67
5.1.2.	SEXO.....	68
5.1.3.	MUC1.....	69
5.1.4.	HÁBITAT.....	70
5.1.5.	HÁBITO TABÁQUICO.....	71
5.1.6.	CÁNCER PREVIO.....	72
5.1.7.	APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO	72
5.1.8.	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA.....	73
5.2.	ANÁLISIS DE LA NORMALIDAD DE LAS VARIABLES.....	74
5.3.	ESTADÍSTICA INFERENCIAL	76
5.3.1.	GLICOPROTEÍNA MUC1	76
5.3.2.	TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES.....	78
5.3.3.	MODELO DE REGRESIÓN DE COX O MODELO DE RIESGOS PROPORCIONALES	82
5.3.4.	ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA A LOS 18 MESES A TRAVÉS DE UN MODELO DISCRIMINANTE.....	84
6.	DISCUSIÓN	86
7.	CONCLUSIONES	93
8.	BIBLIOGRAFÍA	95
9.	INDICES.....	101

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DEL CÁNCER

La historia del cáncer es tan antigua como la historia de la propia humanidad. El cáncer ya se menciona en el papiro descubierto por Ebers en 1872 y anterior al 1500 a. de C. Documentos similares se hallan en las literaturas hindú y persa.

La que es probablemente la primera referencia escrita a un cáncer, fue recogida por Herodoto, hacia el año 520 a. de C. Atossa, hija de Ciro II y esposa de Darío I, tenía un tumor en su mama izquierda que después de un tiempo, se abrió y extendió considerablemente. Mientras el tumor fue pequeño lo ocultó y no lo comunicó a nadie; cuando el tumor creció llamó a Democedes y se lo mostró.

Hipócrates (460-375 a. de C) conocido hoy en día como el “padre de la Medicina”, propuso la denominada Teoría Humoral, basándose en Empédocles, que describe que el cuerpo humano está compuesto de cuatro fluidos; la sangre, la flema, la bilis amarilla y la bilis negra. Hipócrates atribuyó el exceso de bilis negra al desarrollo del cáncer. Fue el primero en usar las palabras “carcinosis” y “carcinoma” para describir los tumores y así nació el uso del término “cáncer”. La palabra “cáncer” deriva del término griego “*karkinos*” o cangrejo. Se piensa que se refiere a la apariencia de los vasos sanguíneos que se parecen a las pinzas del cangrejo. Hipócrates creía que era mejor el dejar al cáncer quieto porque aquellos que recibían tratamiento no sobrevivían tanto como los que no lo recibían.

Galeno (129-200) profundizó las teorías de Empédocles e Hipócrates. Para Galeno el cáncer se desarrollaba por la concentración excesiva de bilis negra o atrabilis, debido a distintas causas que impedían su descarga. Creía que era posible curar el cáncer en sus etapas tempranas, y que los tumores avanzados deberían ser operados cortando alrededor del área afectada o usando cauterización.

Estas teorías fueron aceptadas durante muchos siglos. Pero no es hasta el Renacimiento en que el progreso de las ciencias incide positivamente en la cancerología. Así pues Fabricio (1537-1619) abogó a favor de la extirpación completa de los cánceres y señaló el riesgo de las extirpaciones incompletas.

Paracelso (1493-1541) luchó contra la inexistente capacidad de observación y el dogmatismo que imperaba en la Edad Media. A él se deben los primeros datos sobre el cáncer de pulmón.

John Hunter (1750) fue partidario de la teoría de la linfa del cáncer. De acuerdo a los autores Stahl y Hofman, el cáncer está compuesto por linfa de diferente pH y densidad en proceso de fermentación. Hunter creía que el cáncer se podía extirpar si todavía no se había extendido a los tejidos vecinos.

Bernardino Ramazzini (1663-1714): “*De Morbis Artificum*” (1713), propuso una mayor incidencia de cáncer mamario en monjas por el celibato. Más tarde, en 1775, Percival Pott descubrió en sus “*Observaciones Quirúrgicas*” la relación entre el hollín y el cáncer escrotal en varones jóvenes.

En 1761 Giovanni Morgagni: comenzó a hacer autopsias para relacionar las enfermedades con los hallazgos patológicos. Esto ayudó a fijar la base para el estudio del cáncer.

En 1779 se funda en Reims (Francia), el primer hospital de cáncer, situado fuera de la ciudad por la creencia de que el cáncer era contagioso.

Johannes Muller demuestra que el cáncer está compuesto de células y en 1829 Joseph Claude Anthelm Recamier reconoce la metástasis del cáncer.

En 1878 Teodoro Billroth, cirujano alemán, llevó a cabo la primera extirpación pilórica para extraer un carcinoma.

Wilhelm Conrad Röntgen en 1895 descubrió los rayos X. Esto facilitó la detección de tumores utilizando un proceso mucho más fácil y no invasivo. Becquerel investigó las radiaciones emitidas por el uranio y Rutherford identificó las partículas α y β . Un nuevo y trascendental descubrimiento fue el de los esposos Marie y Pierre Curie que descubren el rádium en 1899.

Theodor Boveri en 1914 propuso la teoría de la Mutación Somática del cáncer; creía que el cáncer se producía por cromosomas anormales.

En 1960 Howard Temin propuso la hipótesis del provirus de ADN. Afirmaba que ciertos virus de ARN son capaces de introducir su material genético en el ADN de las células huésped. Estos provirus inactivos pueden eventualmente ser expresados y contribuir a la formación de un cáncer.¹

Se estima que las **infecciones víricas son la causa de uno de cada siete cánceres humanos en todo el mundo**. En el 80% de estos casos, el cáncer es la secuela de la infección por dos virus de DNA, el virus de la hepatitis B y el **virus del papiloma humano** (relacionados con carcinoma hepatocelular y de cuello de útero respectivamente

Varmus y Bishop describieron el primer oncogén celular (1911) : *SRC (virus del sarcoma de Rous aviar.*². En 1986 Friend y otros aislaron el primer gen supresor de tumores, *Rb (retinoblastoma hereditario)*, que interactúa con ciclina/cdk; y regula al factor de transcripción E2F.

Fue en 1999 la primera vez que en un laboratorio, células epiteliales y fibroblastos humanos fueron transformados a células tumorales. Se logró por la coexpresión de la telomerasa (h TERT), de la oncoproteína T-grande del virus simiano 40 y el alelo oncogénico de *H-ras*.³

1.2. CÁNCER DE PULMÓN

1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

En la actualidad, el cáncer es la primera causa de mortalidad en los países desarrollados y la segunda en los países en vías de desarrollo. El **cáncer de pulmón (CP)** es el tumor más frecuente en el mundo además de ser el de mayor mortalidad.⁴

El cáncer ha supuesto en los últimos años la primera causa de muerte en varones y la segunda en mujeres (debido a que se cuenta como única causa las enfermedades cardiovasculares, no sólo cardiopatías isquémicas) lo que ha supuesto el 26% de las muertes de la población española: concretamente, el 31% de las muertes en varones y el 20% de las muertes en mujeres. No obstante, el riesgo de mortalidad por cáncer ha ido disminuyendo desde 1990 hasta 2007 considerablemente.

Las estimaciones se basan en los datos más recientes de la IARC (International Agency for Research on Cancer) y de la información pública disponible en Internet, no obstante los datos más recientes pueden estar disponibles directamente de fuentes locales.⁴

La Asociación Internacional de Denver para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) es la única organización mundial dedicada al estudio del cáncer de pulmón. Fundada en 1972, incluye a más de 3.500 especialistas en cáncer de pulmón en 80 países.

Los datos de GLOBOCAN del año 2008, estimaron que la incidencia de cáncer en todo el mundo fue de 12,7 millones de casos, con 7,6 millones de muertes. El proyecto GLOBOCAN tiene como objetivo proporcionar estimaciones actualizadas sobre la incidencia, mortalidad y prevalencia de la mayoría de los cánceres, a nivel nacional de

184 países. Las estimaciones de GLOBOCAN son de 2008 y se presentan de forma separada según sexo y los datos de incidencia y mortalidad en grupos de 10 años (Fig.1 y Fig 2). Pudiéndose observar los índices de incidencia y la mortalidad del cáncer de pulmón.

En cuanto a los datos de GLOBOCAN 2012, la incidencia de cáncer en España en 2012 era de 215.534 casos, con una tasa estandarizada por edad de 215,5 casos por 100.000 habitantes por año, y con un riesgo de presentar cáncer antes de los 75 años de 25,1%.

En 2012 el cáncer más frecuente en ambos sexos fue el colorrectal así como el de mayor mortalidad y prevalencia a los 5 años (Fig: 3-4-5).⁵

En los varones el cáncer más frecuente, con mayor mortalidad y prevalencia a 5 años fue el cáncer de próstata (Fig: 6-7-8).⁵

En las mujeres el cáncer más frecuente con mayor mortalidad y prevalencia a los 5 años fue el cáncer de mama (Fig: 9-10-11).⁵

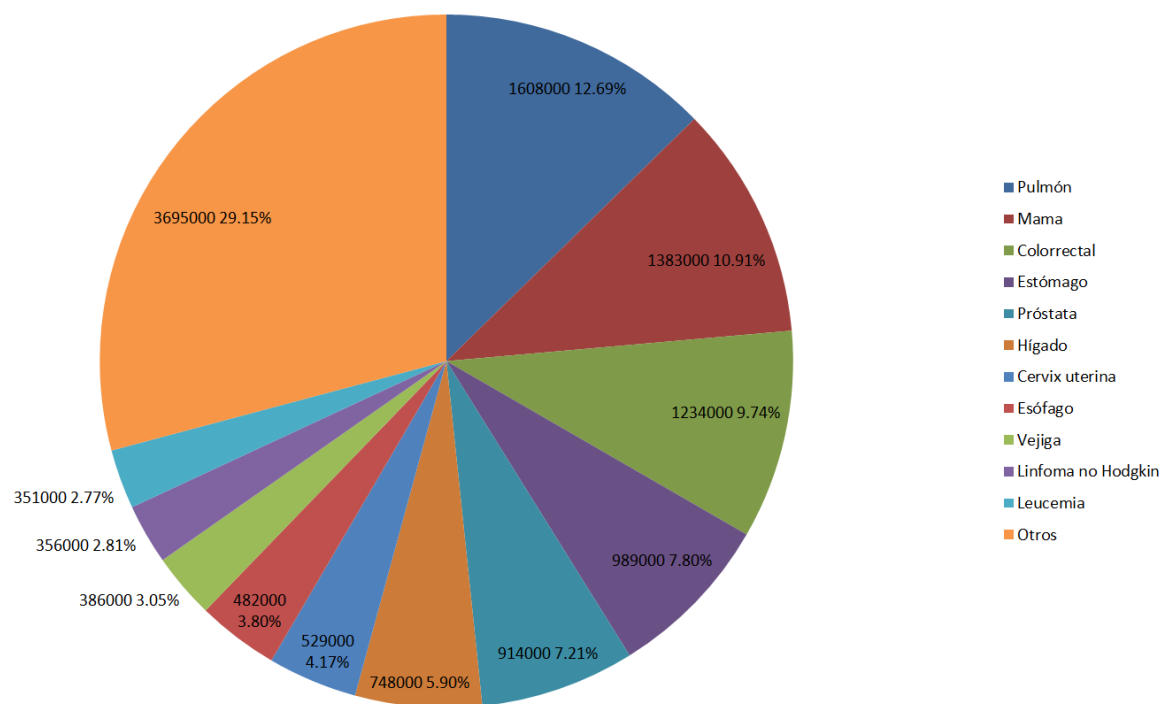


Figura 1. Incidencia cáncer 2008 ambos sexos.

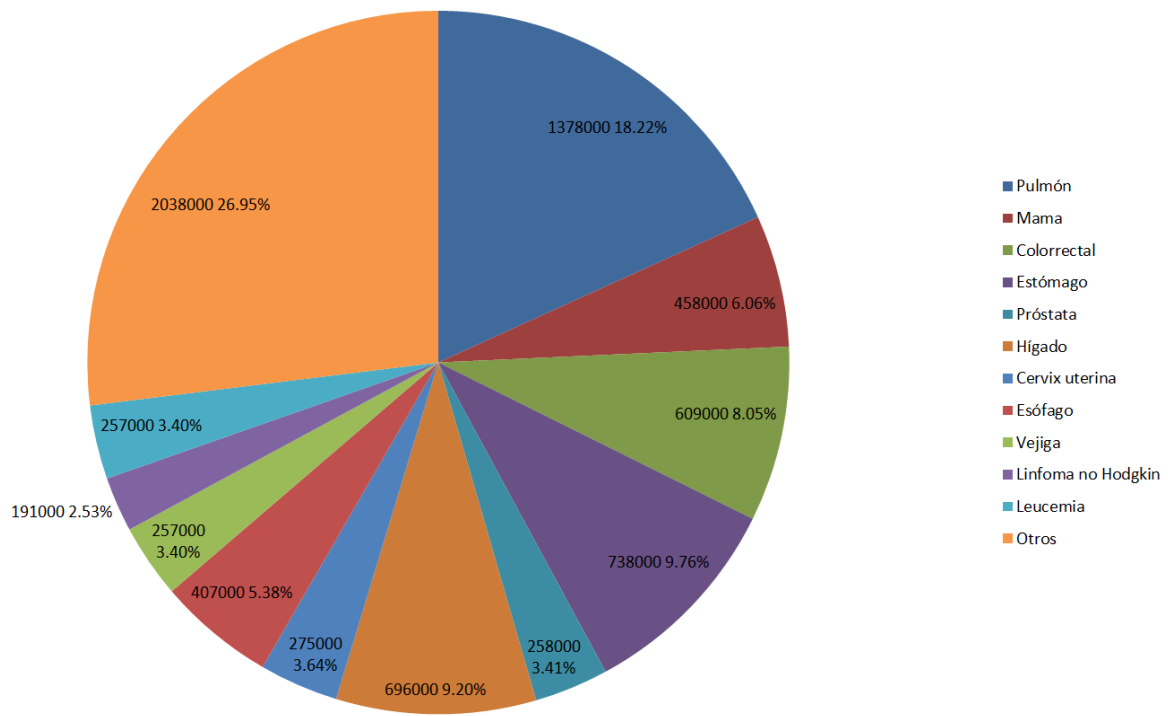


Figura 2. Mortalidad cáncer 2008 ambos sexos.

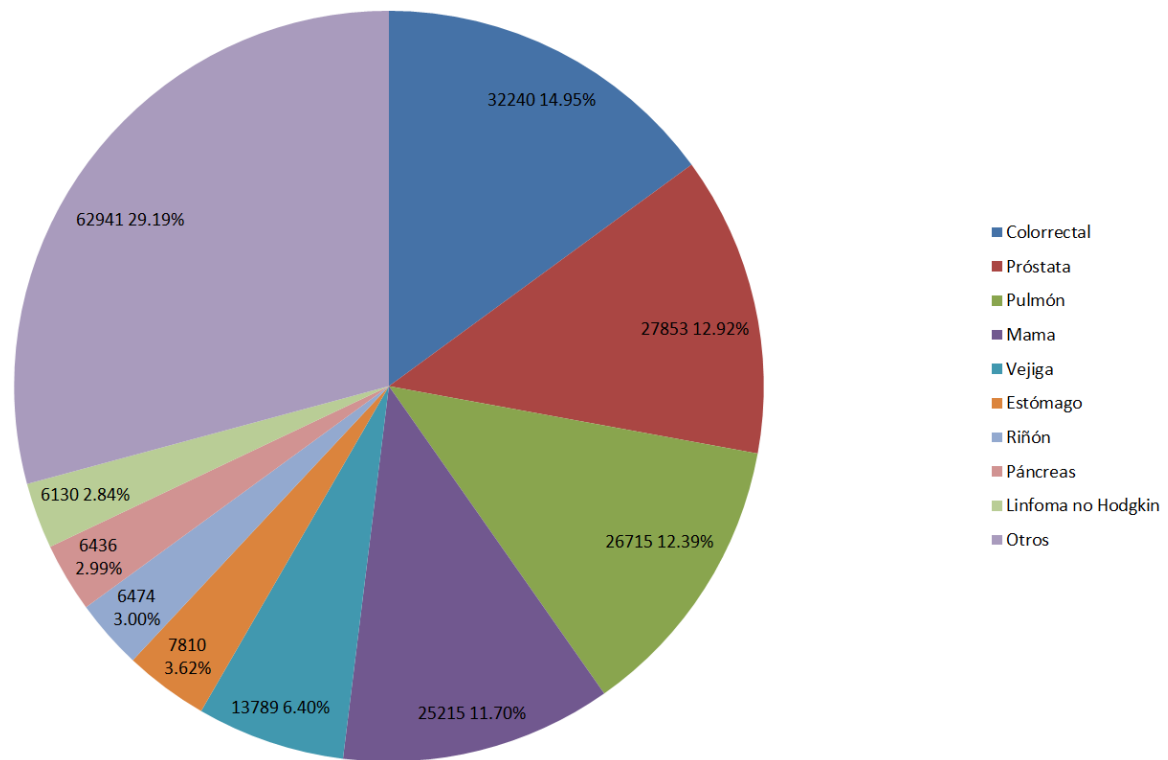


Figura 3. Incidencia cáncer ambos sexos 2012.

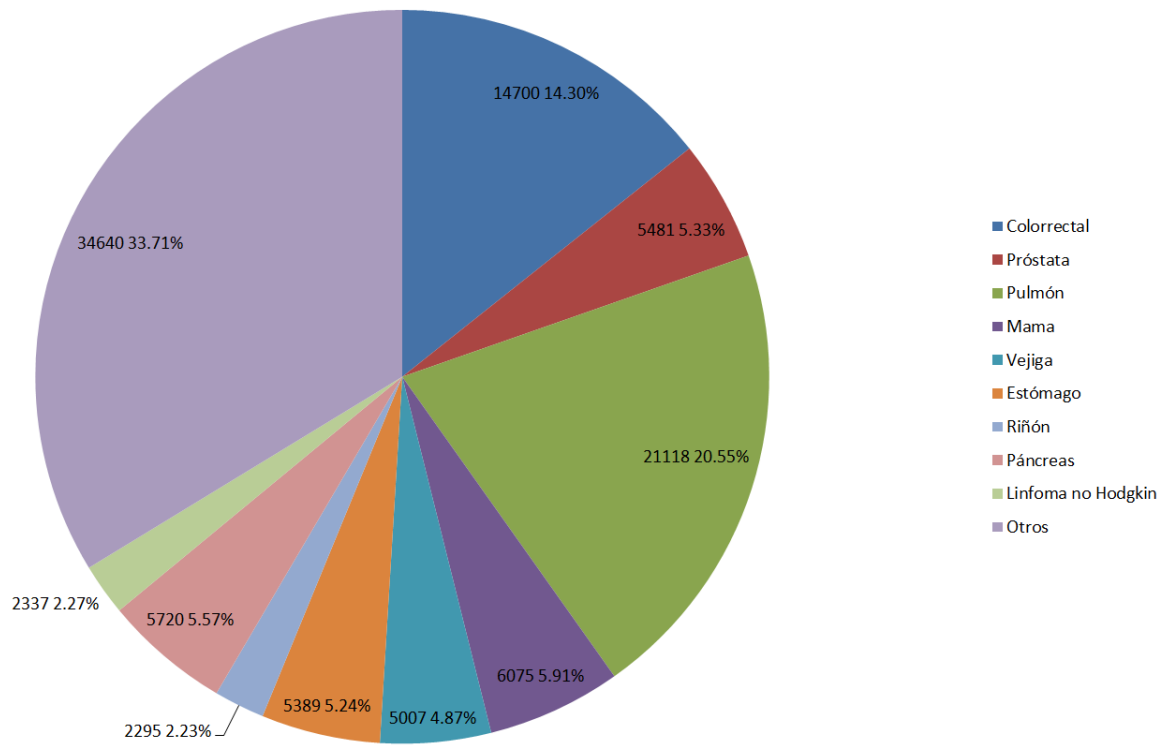


Figura 4. Mortalidad cáncer ambos sexos 2012.

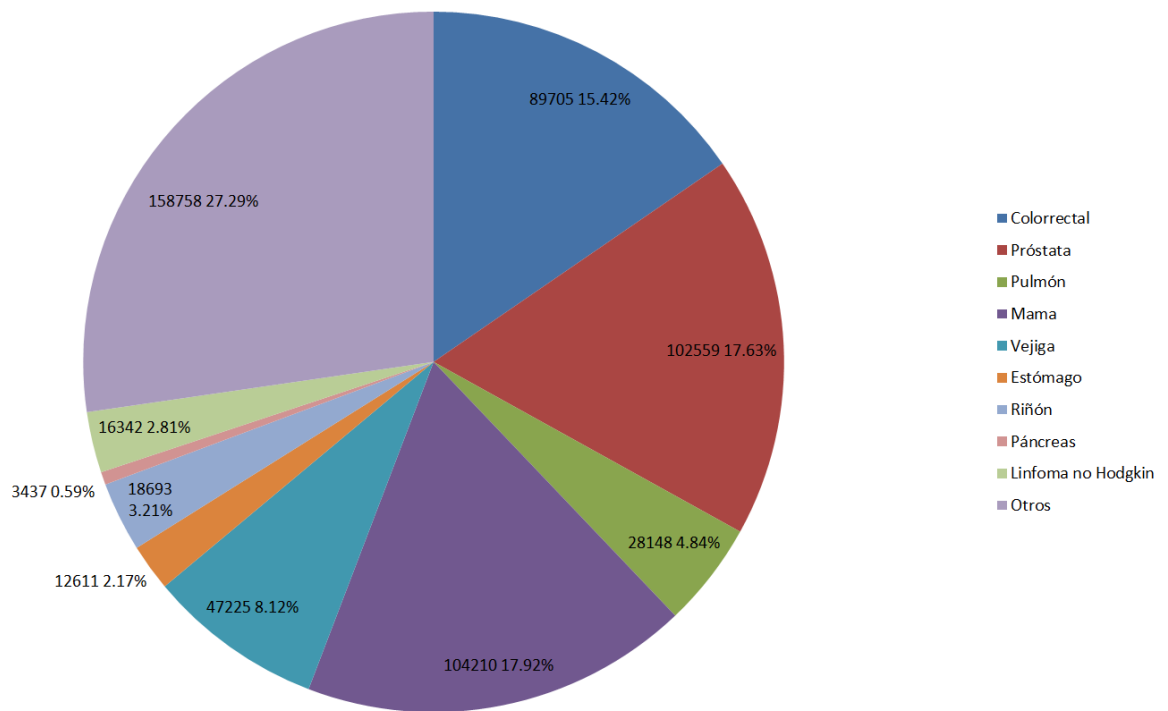


Figura 5. Prevalencia a 5 años cáncer ambos sexos 2012.

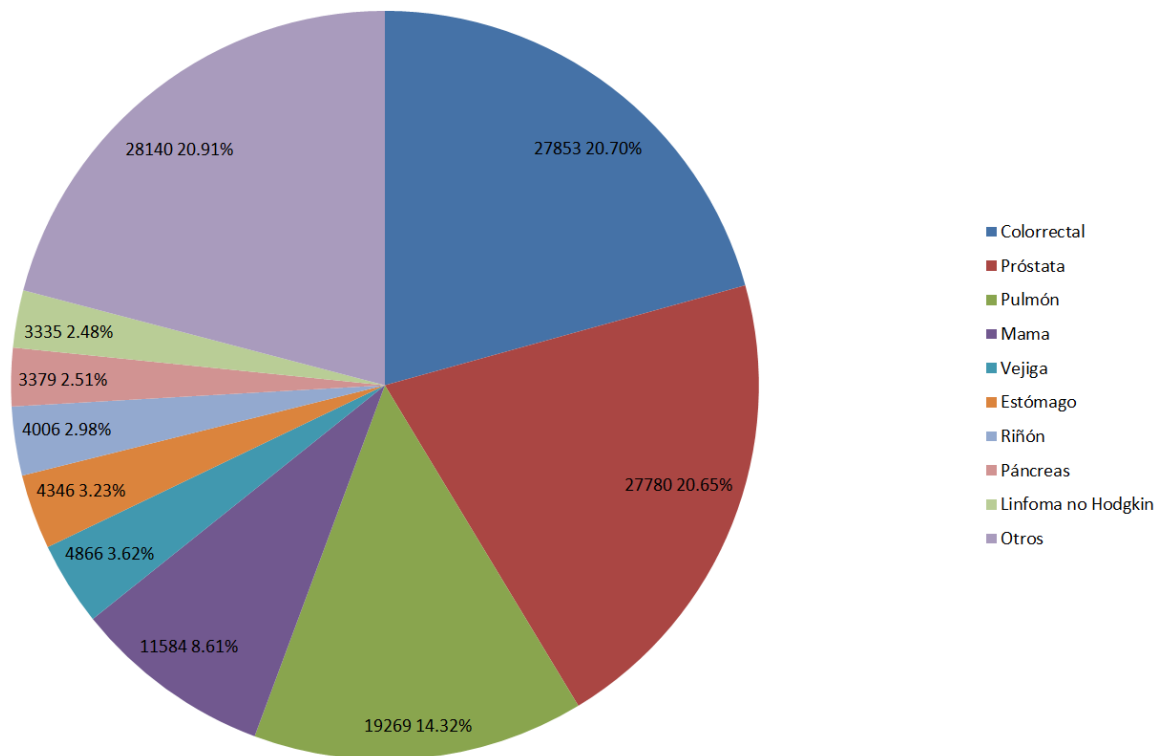


Figura 6. Incidencia cáncer hombres 2012.

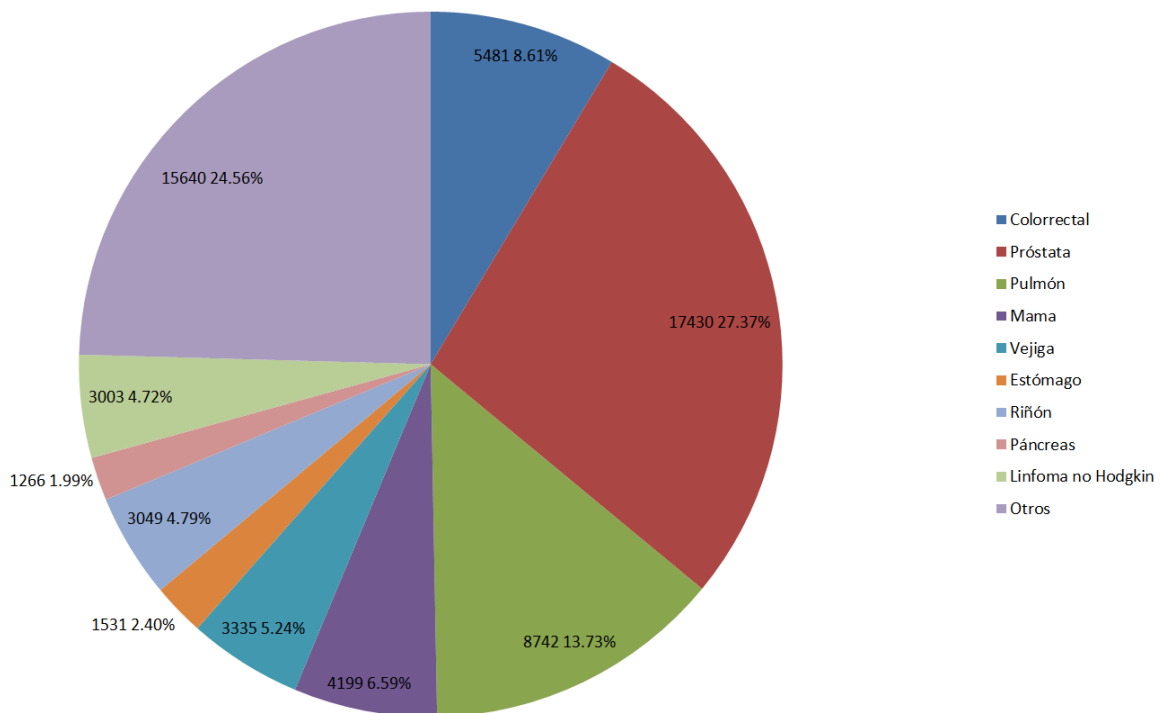


Figura 7. Mortalidad cáncer hombres 2012.

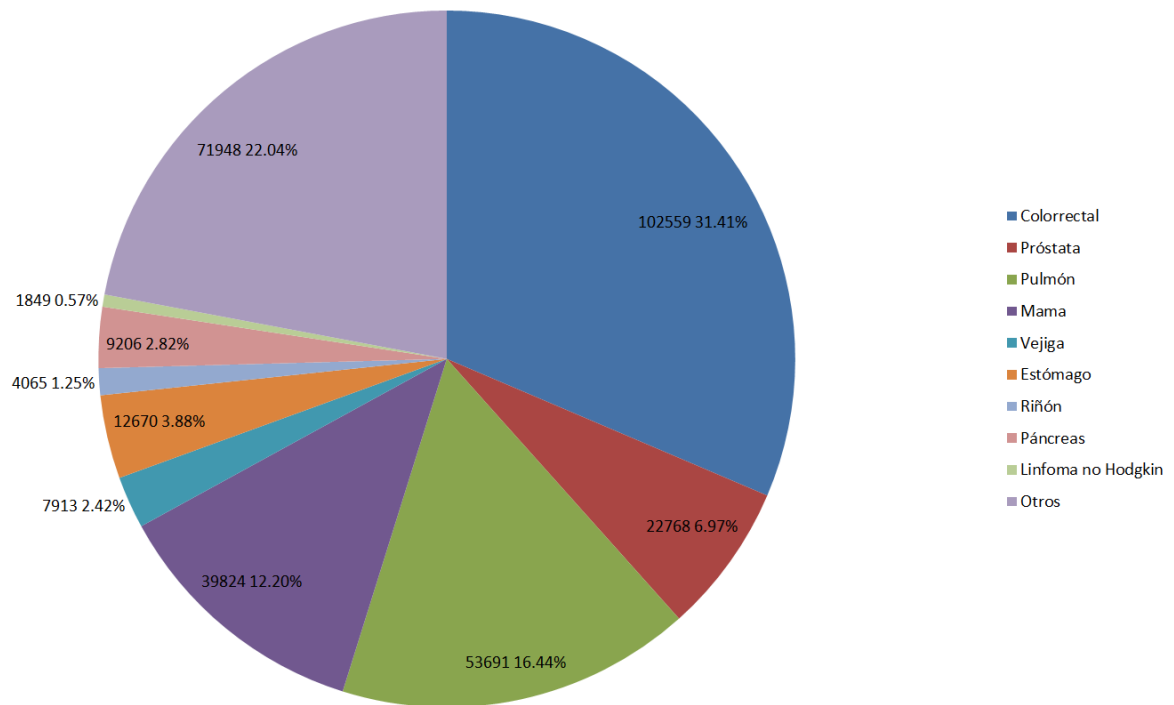


Figura 8. Prevalencia a 5 años cáncer hombres 2012.

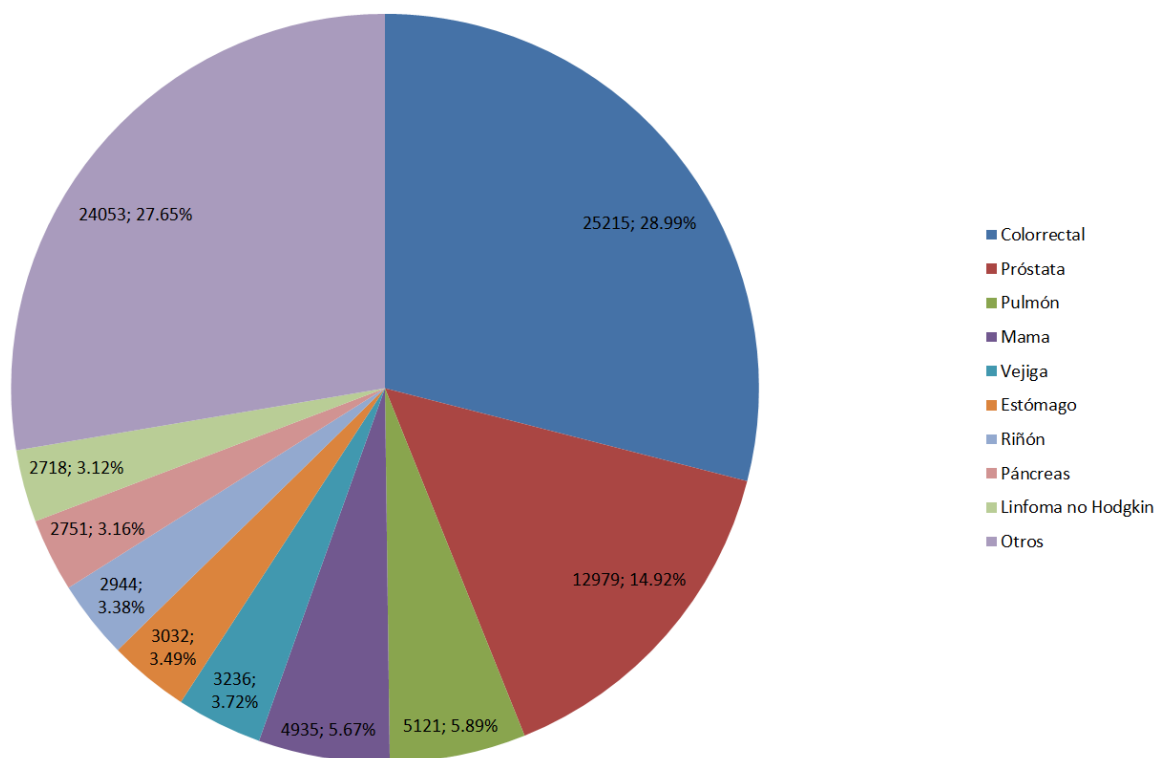


Figura 9. Incidencia cáncer mujeres 2012.

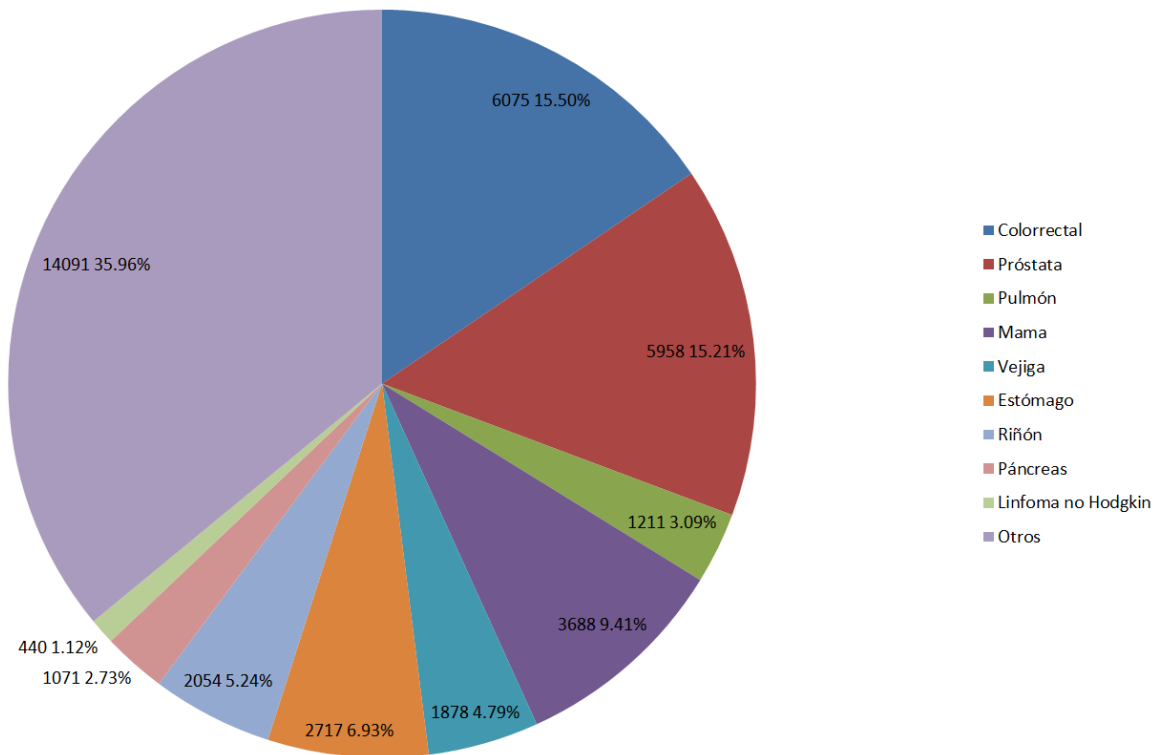


Figura 10. Mortalidad cáncer mujeres 2012.

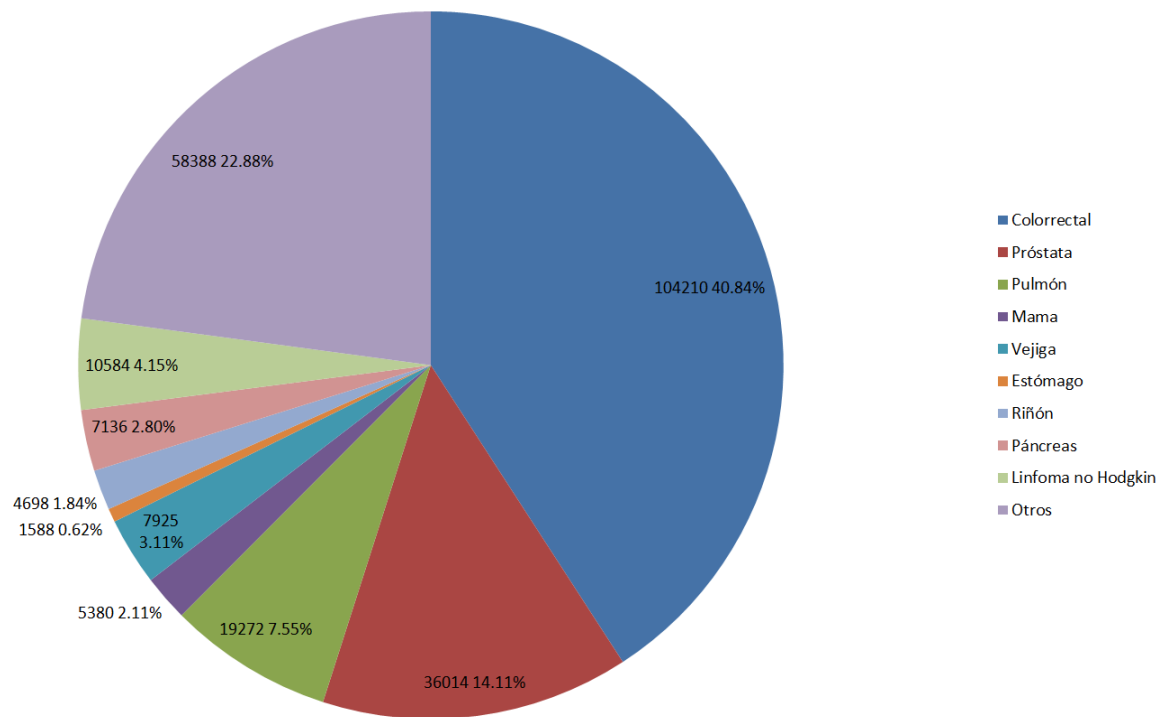


Figura 11. Prevalencia a 5 años cáncer mujeres 2012.

El número estimado de casos de cáncer de pulmón en todo el mundo se ha incrementado hasta en un 51% entre 1985 y 2005, con un aumento del 44% en hombres y del 76% en mujeres. También es la principal causa de muerte por cáncer en hombres en los países desarrollados, aunque en el caso de las mujeres, el cáncer de mama sigue siendo la primera causa, seguido del cáncer de pulmón y muy de cerca en tercer lugar, del cáncer de colorrectal. Se estima que para el año 2030 será la sexta causa de muerte a nivel mundial, y la tercera causa de muerte en los países desarrollados.

Sólo un 15% de todos los pacientes diagnosticados de esta enfermedad llegan a vivir 5 ó más años, por ello, son superponibles el número de casos de cáncer de pulmón y de casos fallecidos por ese tumor. La tasa más alta en el mundo ocurre en algunas zonas de EE.UU, Nueva Zelanda, Reino Unido y Holanda. En relación a las mujeres, la tasa más alta está en EE.UU, Dinamarca, Canadá y Reino Unido, y las más bajas en Francia, Japón y España.⁴

Las variaciones en incidencia y en tendencia del cáncer de pulmón en el mundo, se puede explicar por las diferencias en la exposición al tabaco y en las medidas preventivas establecidas por los gobiernos. Así en España, Bélgica, Francia y Holanda se estima que la incidencia de cáncer de pulmón entre mujeres aumentará por la incorporación de la mujer al hábito tabáquico.

Sin embargo en Estados Unidos se ha observado una disminución de la mortalidad asociada al cáncer de pulmón entre los años 1970-2006, como consecuencia de la reducción del consumo de cigarrillos desde 1950. En los varones la disminución de la mortalidad empezó en 1990 y entre las mujeres en 2002, ya que éstas se incorporaron más tarde al hábito de fumar.

Aunque las muertes por cáncer de pulmón han comenzado a disminuir en hombres, la tasa de mortalidad en mujeres asciende y casi el 50% de las muertes por cáncer de pulmón ocurre en mujeres. La relación entre sexos es de 2,5 hombres por cada mujer en el mundo, 3,6 en Europa, y 9 en España (aproximadamente por cada 9 pacientes con cáncer de pulmón varones, hay una mujer).

En España se diagnostican unos 20.000 casos anuales, lo que representa casi el 19% de los cánceres entre los hombres (18.000 casos) y el 3,2% entre las mujeres (2.000 casos).

En España la mortalidad por cáncer de pulmón tiende a disminuir entre los varones desde 1993, con un descenso anual del 1,3% y sin embargo entre las mujeres existe un

incremento de la mortalidad del 3,5% en todos los grupos de edad y especialmente entre los 35 y 64 años.

En Europa, la supervivencia por cáncer de pulmón a los 5 años es menor al 10%. Aproximadamente un 90% de la mortalidad por cáncer de pulmón en varones y un 80% en mujeres, se puede atribuir directamente al tabaquismo. La supervivencia global a los cinco años desde el diagnóstico es del 15% en Estados Unidos.

Se puede calificar al cáncer de pulmón como el tumor por excelencia de los siglos XX y XXI. Al inicio del siglo XX se consideraba una entidad relativamente rara, pero fue desde entonces cuando se empezó a observar un incremento progresivo del número de casos tanto en Europa como en EEUU. Y aunque en los estudios que iban apareciendo ya se hacía referencia al consumo de tabaco, fue en 1950 cuando Doll y Hill publicaron los primeros trabajos de tipo caso-control en los que se sugería que el tabaco era la principal causa del cáncer de pulmón. Desafortunadamente el conocimiento de esta relación no impidió que se consolidase el incremento progresivo de la población fumadora, y con ello el aumento de los casos de cáncer de pulmón.⁶

Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en España el cáncer de pulmón es una enfermedad que se encuentra en clara progresión; cuenta con la mortalidad más elevada de todos los tumores, en un 20% del total, superior a la suma de muertes por cáncer de mama, próstata y colon.⁴

Se calcula que en el año 2015 la población española será de 48.021.707. La incidencia estimada global de cáncer en la población española en año 2015 será de 227.076, con un crecimiento de nuevos casos que se produce en mayor medida a costa de la población \geq 65 años, siendo el tipo más frecuente el cáncer de colorrectal.⁵

Se calcula que el cáncer de pulmón será el segundo tumor en frecuencia, si se consideran juntos hombres y mujeres. En los hombres el cáncer de pulmón será el más diagnosticado en el 2015 por delante de otros tumores frecuentes como el cáncer de próstata, el colorrectal y el de vejiga urinaria. En las mujeres, el cáncer con mayor incidencia será el de mama, seguido del colorrectal y los de origen ginecológico: útero, ovario, trompa y cérvix uterino; se calcula que el cáncer de pulmón no llegará a los 3.000 casos en la población femenina. La tasa de mortalidad por cáncer de pulmón se situará en 2015 en este año en 14,24 mujeres por cada 100.000. Supone una caída del 9% desde 2009. La tasa de mortalidad por cáncer de mama será de 14,22.

La edad en el momento del diagnóstico, también es un hecho significativo; siendo más del 50% de los casos de cáncer de pulmón, los que se diagnostican en individuos por encima de 70 años.

En cuanto a las formas anatomopatológicas, hay una tendencia clara al aumento de adenocarcinomas y a la disminución de epidermoides, lo cual ya se había observado en la década de los setenta en EEUU donde desde entonces son más frecuentes los adenocarcinomas.⁷ Esta estirpe es la que tiene menos relación con el tabaco, mientras que un aumento acumulado del hábito tabáquico constituye un factor fundamental para el desarrollo del cáncer microcítico. En EEUU los cánceres microcíticos han disminuido desde el 17.3% en 1986 hasta el 12.9% en 2002. Este cambio se ha atribuido principalmente al menor consumo de tabaco y al mayor uso de filtros, aunque no se puede descartar algún componente de sesgo, debido a cambios en la clasificación del cáncer de pulmón; ya que, algunos tumores de tipo neuroendocrino, antes clasificados como subtipos de cáncer microcítico, hoy se consideran de estirpe no microcítica. En algunos países europeos todavía la estirpe epidermoide es la más frecuente. En España también se sigue observando una mayoría de epidermoides, entre el 25-50.5% en registros locales o autonómicos. En cuanto al microcítico, representa aproximadamente alrededor del 20% en los registros de tumores españoles.

1.2.2. FACTORES DE RIESGO PARA CÁNCER DE PULMÓN

1.2.2.1. TABACO

El cáncer de pulmón es un tumor maligno que se origina a partir de un crecimiento desordenado y agresivo de estructuras broncopulmonares, y suele ser secundario, en la mayoría de los casos, a la inhalación del humo de combustión del tabaco. El tabaco es responsable de aproximadamente un 80-90% de los cánceres de pulmón, incluyendo alrededor de un 25% de los que tienen lugar en personas no fumadoras.⁸ Cuando se consume un cigarrillo se origina una corriente principal de humo, que es inhalada por el fumador y que contiene un 25% del total, y una corriente lateral, con el 75% restante. Los compuestos nocivos que se encuentran en la corriente lateral son los responsables de la aparición de cáncer de pulmón en los “fumadores pasivos”. Con respecto al “tabaquismo pasivo” o “*second hand*”, se puede confirmar la existencia de estudios epidemiológicos

indicativos de que la exposición involuntaria al humo del tabaco incrementa el riesgo de cáncer de pulmón; ya que el aire contaminado con el humo del tabaco contiene las mismas sustancias cancerígenas, aunque en distintas proporciones. Varios investigadores han concluido que el fumador pasivo debería considerarse como una causa establecida de cáncer de pulmón en humanos, con un riesgo relativo de alrededor de 1.3.⁹

La inhalación reiterada del humo del tabaco produce ciertos cambios histológicos en la mucosa bronquial:

- Pérdida de cilios en las células bronquiales
- Hiperplasia epitelial
- Anomalías nucleares

Estas alteraciones, que suelen ser menos acusadas en las personas que fuman cigarrillos con bajas cantidades de alquitrán y nicotina, revierten paulatinamente una vez que se ha abandonado el consumo de tabaco. Después de dejar de fumar, el riesgo relativo desciende alrededor del 50% después de 5 años y el 80% después de 10 años.

Todos los tipos histológicos tienen asociación significativa con el consumo de tabaco, aunque es muy marcada en el carcinoma escamoso y de células pequeñas y menos importante en el adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. Según diversos trabajos entre un 90 y un 95% de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón son fumadores en el momento del diagnóstico o lo han sido con anterioridad.¹⁰

Es interesante ver como la epidemiología del cáncer de pulmón está cambiando a nivel mundial en función de los cambios en la prevalencia del hábito tabáquico en cada país. El riesgo relativo del hábito tabáquico para el desarrollo de diferentes histologías del cáncer de pulmón ha sido previamente confirmado. Sin embargo, ha habido una variación considerable entre los subtipos histológicos a lo largo del tiempo entre sexos y entre países. Este fenómeno ha sido atribuido a una serie de factores incluyendo la susceptibilidad genética, pero es más probable que sea el resultado de diferencias en la composición química de los cigarrillos, que ha cambiado sustancialmente con el tiempo. Mientras que los patrones del hábito tabáquico varían en gran medida a nivel mundial, los hombres comenzaron a fumar antes que las mujeres y éstas consumieron fundamentalmente cigarrillos más bajos en nicotina, con presencia de filtros, menos hidrocarburos policíclicos y más nitrosaminas específicas del tabaco. Por lo tanto, no es de extrañar que las mujeres desarrollen con mayor frecuencia adenocarcinomas, en comparación con los carcinomas escamosos de los varones. El cambio histológico hacia

adenocarcinoma en los hombres en las últimas décadas es consistente con el concepto de que consumen más cigarrillos bajos en nicotina y con filtros.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 25% del cáncer de pulmón a nivel mundial se desarrolla en no fumadores. Este porcentaje es probablemente próximo al 10-15% en los países occidentales. Varios estudios sugieren que aproximadamente que un 15-35% de los casos son debidos a la exposición pasiva al humo del tabaco y un 5-7% adicional se piensa que está relacionado con la contaminación ambiental. Múltiples estudios apoyan una asociación entre el cáncer de pulmón en no fumadores y una historia familiar de cáncer de pulmón, sugiriendo el papel de factores genéticos en su desarrollo, aunque los factores genéticos específicamente no han sido esclarecidos.¹⁰

1.2.2.2. FACTORES OCUPACIONALES

Por término medio, se asocia a los tóxicos del medio laboral con la aparición de un 10-15% de los cánceres de pulmón. Los tóxicos del medio laboral capaces de provocar cáncer de pulmón son: **asbesto, compuestos inorgánicos del arsénico, berilio, éter bisclorometílico y clorometílico, cadmio, cromo, gas mostaza, níquel, radón y cloruro de vinilo**. La asociación con la exposición ocupacional a estos agentes parece ser independiente al consumo de tabaco. Existen otras ocupaciones asociadas con un riesgo mayor de cáncer de pulmón, que parece depender en parte de los altos índices de fumar, que pueden interactuar con carcinógenos conocidos y sospechosos en el lugar de trabajo. Además ciertas ocupaciones con una prevalencia alta en el hábito de fumar tienen un riesgo mayor de cáncer.

Las fibras que componen el **asbesto**, como la crocidolita, son carcinógenos conocidos con una capacidad probada para provocar cáncer de pulmón, como se ha observado en trabajadores de astilleros, de aislamiento, de cemento, en calderas y probablemente en personas con exposiciones no relacionadas con su ocupación. La exposición al asbesto tiene un efecto dosis-respuesta y la sinergia entre el asbesto y el tabaco es evidente. Entre 4000 a 6000 casos de cáncer de pulmón (4%), son causados por el asbesto.¹¹

El **radón**, gas natural químicamente inerte, ha sido considerado como un importante carcinógeno potencial debido a su presencia en el suelo y en las rocas, así como en las filtraciones de las casas y edificios de oficinas. El radón puede ser responsable de más de un 2% de las muertes por cáncer de pulmón en Europa.¹²

Los mineros expuestos al radón tienen mayor riesgo de cáncer de pulmón. Aunque es conocido que los fumadores son particularmente proclives a los efectos carcinógenos del radón, la suposición de una interacción multiplicativa entre los dos factores, puede sobrestimar el riesgo entre fumadores y subestimar el riesgo entre los no fumadores.

La radioterapia puede aumentar el riesgo de aparición de segundos tumores, entre ellos el cáncer de pulmón. En mujeres fumadoras tratadas con radioterapia tras mastectomía parece existir mayor un mayor riesgo de cáncer de pulmón; así como en pacientes con linfoma Hodgkin tratados con radioterapia torácica.

1.2.2.3. DIETA Y NUTRIENTES

Las dietas ricas en verduras y frutas pueden proteger contra el cáncer de pulmón, al igual que sucede con los carotenos. Estos últimos además de su actividad antioxidante, estimulan al sistema inmune y tienen una capacidad clara para proteger contra la tumorogénesis en modelos animales. Los niveles séricos bajos de β -carotenos parece que están asociados con un riesgo significativamente más alto de cáncer de células escamosas de pulmón pero no de otros tipos histológicos.¹³ En definitiva, es posible que una dieta rica en frutas y, sobre todo, verduras reduzca discretamente el riesgo de sufrir cáncer de pulmón aunque, en realidad, actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) no considera que se disponga de evidencias suficientes a favor del papel protector que pudiera jugar la dieta en la génesis del cáncer de pulmón.

1.2.2.4. ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Diversas enfermedades respiratorias han sido asociadas con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón, la EPOC y otros procesos que desembocan en fibrosis, como la fibrosis pulmonar idiopática, la asbestosis o la silicosis. Algunos estudios estiman la prevalencia de la EPOC en pacientes con cáncer de pulmón entre 50-65%, superior a la población general, y un estudio de cohortes publicado en el año 2000 concluye que los individuos con fibrosis pulmonar difusa tienen entre 8 y 14 veces incrementado el riesgo de cáncer de pulmón.¹⁴

Estudios más recientes han observado que un mayor grado de obstrucción bronquial, medida por el FEV1, se relaciona con un aumento de cáncer de pulmón.¹⁵

1.2.2.5. FACTORES ATMOSFÉRICOS

La polución atmosférica está relacionada con la génesis del cáncer de pulmón. En el medio urbano podemos encontrar carcinógenos procedentes del humo de motores o industrias con mayor frecuencia que en zonas rurales. Teniendo en cuenta esto, se ha estimado que el riesgo relativo de padecer cáncer de pulmón en los habitantes de una gran ciudad frente a las que viven en el medio rural oscila entre el 1 y 1.3 en los de cohortes y entre 1.1 y 2.3 en los de casos y controles.

1.2.2.6. FACTORES GENÉTICOS

1.2.2.6.1. FACTORES DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (EGFR)

Existe evidencia creciente de que los factores genéticos pueden contribuir al riesgo de cáncer de pulmón, debido a que los metabolitos de los carcinógenos producen la malignidad, y las vías para crear estos metabolitos están determinadas genéticamente. Numerosos estudios sugieren que los familiares de primer grado tienen un incremento del riesgo de padecer cáncer de pulmón. Un metaanálisis de 28 estudios de casos-control y 17 estudios de cohortes observacionales mostró un incremento del riesgo de cáncer de pulmón asociado con tener un familiar afecto (riesgo relativo 1,8).¹⁶ El riesgo era mayor en familiares con parientes diagnosticados de cáncer de pulmón a edades tempranas y con múltiples miembros de la familia afectados. Otros estudios han encontrado un riesgo de cáncer de pulmón menor pero todavía significativo en familiares de segundo y tercer grado.¹⁷

Existen anormalidades cromosómicas (reordenamientos o deleciones) que están presentes en el cáncer de pulmón, particularmente en el de célula pequeña. Aunque los sucesos moleculares y genéticos subyacentes en la patogénesis del cáncer de pulmón se están investigando, no se ha definido de forma concluyente ninguna anormalidad genética en el riesgo del cáncer de pulmón. En el CPCNP (Cáncer de Pulmón No de Célula Pequeña) las anormalidades que se identifican con más frecuencia son la desregulación del gen supresor del tumor p53, la expresión aberrante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y uno de sus ligandos, TGF- α , y la presencia de anormalidades K-Ras en el adenocarcinoma.

EGFR es uno de los cuatro miembros de la familia de receptores de membrana con acti-

vidad tirosina kinasa (TK) conocidos de forma global como ErbB. La activación de este receptor supone tanto un beneficio de proliferación como un importante freno a la apoptosis, al estimular rutas oncogénicas como MAPK y PI3K/Akt/PTEN/mTOR.

En 2004, se describe la existencia de mutaciones activadoras de EGFR en CPCNP, situadas en los exones 18-21, en la región codificante para el dominio intracitoplasmático TK del receptor, que producían una activación permanente de la vía de señalización mediada por EGFR.¹⁸

Aquellos tumores portadores de esta mutación parecían depender en su origen y evolución de esta vía oncogénica, por lo que fueron unos de los primeros tumores que se denominaron “adictos al oncogén”. Por ello, la inhibición del crecimiento de estos tumores mediante agentes inhibidores tirosín kinasa ITK de EGFR fue demostrada tanto a nivel experimental como en la práctica clínica.

La correlación entre la presencia de mutaciones de EGFR y la respuesta a gefitinib y erlotinib ha quedado patente en estudios retrospectivos, con respuestas superiores al 65% y medianas de supervivencia de 20 a 30 meses. En 2008 había en marcha varios estudios fase III que comparaban la quimioterapia de primera línea frente a estos ITK en pacientes con estadio avanzado que presentan mutación EGFR.

Las mutaciones activadoras de EGFR se localizan entre los exones 18 al 21 en la región codificante para el dominio TK del receptor. El 90% de estas mutaciones son pequeñas deleciones en el exón 19 (donde se localizan los codones 747-750), o mutaciones puntuales en el exón 21 (L858R). El resto son inserciones “in-frame” en el exón 20 (del 5 al 8%) o mutaciones puntuales en los exones 18 y 20 (2 al 5%).

Por tanto, las mutaciones de EGFR que se describen con más frecuencia son:

- en el exón 18 del EGFR: mutaciones E709 y G719
- en el exón 19: deleciones de 9- 12- 15- y 24-bp (codones 746-753) o inserciones poco comunes de 15-bp y 18-bp (codones 746-753)
- en el exón 20: inserciones (codones 763-764, codones 767-774), S768I, T790M.
- en el exón 21: L858R, T854 y las mutaciones L861Q y L861R.

Las mutaciones del exón 19 (pequeñas deleciones) son las que presentan mayor sensibilidad a los ITK y hay mutaciones que ofrecen una resistencia de novo o adquirida a los mismos como las T790M, G719A y L861Q.

Es posible, que en un futuro próximo se recomiende identificar todas aquellas mutaciones individuales de EGFR que tienen una frecuencia de un 1% o superior. Este estudio de mutaciones de EGFR deberá ser realizado en laboratorios que tengan una técnica homologada y reproducible para este procedimiento. Para todo tipo de estudios de tipo molecular (EGFR, ALK, y otros) es necesario tener material tumoral suficiente. La mejor muestra tumoral sería la procedente la pieza quirúrgica, seguida por la biopsia (bronquial, transbronquial, pleural o con aguja gruesa) y finalmente la obtenida por citología.

Dado que el material disponible suele ser escaso y que cada vez se precisa realizar más estudios moleculares, se recomienda emplear una técnica de alta sensibilidad. En este sentido, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, siglas en inglés) en tiempo real (RT-PCR) (Taq-Man PCR, Scorpions ARMS, Cobas) sería el procedimiento más adecuado y la secuenciación directa (Sanger Pirosecuenciación) sólo debería realizarse si tenemos al menos un 50% de células tumorales.

Hay varias fases del proceso de determinación de mutaciones de EGFR y de otras alteraciones genéticas que son críticas. El material sobre el que se purificará el ADN tumoral debe ser evaluado por un experto que delimite la zona sobre la que se realizará la microdissección por láser, si está disponible, o la macrodissección sobre el portaobjetos donde está depositado el corte de la pieza original. Si existe material suficiente, se realizará una tinción con hematoxilina-eosina en los cortes situados en los extremos del material para extracción, asegurando así que existe una concentración similar en los cortes delimitados por ellos. En una segunda fase se garantizará que la purificación del ADN sea de suficiente calidad a través de los métodos estándares, evitando la secuenciación de *smears* o de ADN muy fragmentados, lo cual podría reducir la sensibilidad.

Además, es necesaria la presencia de controles internos de calidad, así como grupos controles que garanticen la existencia de la reacción.

Finalmente, en los informes de la determinación de la mutación de EGFR, y, en general, en todos los estudios moleculares, el informe debe recoger todos los aspectos previamente descritos: calidad de la muestra tumoral, método de detección realizado y sensibilidad del mismo, tipo de mutación encontrada y posible sensibilidad de la misma al tratamiento con ITK.

Se han desarrollado diversos anticuerpos monoclonales para la identificación de la mutación de EGFR por técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados iniciales

confirman un buen rendimiento de este procedimiento que sería sencillo y accesible a un mayor número de centros para su detección.

Actualmente no se puede considerar un procedimiento estándar pero podría ser un buen método de cribado inicial en aquellos centros donde no se realiza la determinación de mutaciones de EGFR.

HER-2 es un receptor de la familia ERBB que puede estar sobreexpresado hasta en un 20% de CPCNP, pero la amplificación del gen o las mutaciones sólo se presentan en un 2% de los casos. Estas mutaciones suelen consistir en inserciones en el exón 20, especialmente afectando a la secuencia Tir-Val-Met-Ala en el codón 776. Esta mutación aparece sobre todo en mujeres, nunca fumadoras, adenocarcinomas y población asiática. Además, no están presentes en tumores que contengan mutaciones de EGFR o de K-RAS. Estas inserciones provocan una activación constitutiva del receptor y las células tumorales que la contienen son sensibles a ITK duales contra EGFR y HER-2 como lapatinib o BIBW 2292, pero no a inhibidores exclusivos de EGFR. También, se está evaluando la adición de inhibidores de mTOR debido a la dependencia de la mutación HER2 por la vía AKT/mTOR.¹⁹

La alteración del gen de la kinasa del linfoma anaplásico (*"Anaplastic Lymphoma Kinase"*, **ALK**) fue descrita por primera vez en 1989 al identificarse una translocación recíproca entre los cromosomas 2 y 5 (t[2;5] [p23;q35]) en un grupo de enfermos con este tipo de linfoma, de ahí su denominación.²⁰ Posteriormente se describió cómo esta translocación creaba un gen de fusión al combinar el extremo 5' del gen de la nucleofosmina (NPM) con la región 3' de la Kinasa. El gen ALK se localiza en el cromosoma 2 y codifica para un receptor transmembrana de la familia de los receptores de insulina y con homología con los receptores TK leucocitaríos.

El receptor de ALK está formado por un dominio extracelular con un péptido señal amino-terminal, un dominio intracelular con un segmento yuxtamembranoso que acoge el lugar de unión para el substrato-1 del receptor de insulina, y un dominio carboxi-terminal. Su activación producirá dimerización del receptor y transmisión de la señal a través de las vías intracitoplasmáticas.

Las alteraciones de ALK pueden estar implicadas en diferentes tipos de tumores como linfomas no-Hodgkin, tumores miofibroblásticos inflamatorios, rabdomiosarcomas,

neuroblastomas, carcinomas tiroideos anaplásicos, renales y pulmonares. En tejidos donde ALK está presente o se reexpresa, la activación oncogénica de ALK se produce por mutaciones puntuales en el dominio TK del receptor, como ocurre en neuroblastomas o en carcinomas tiroideos anaplásicos.

En CPCNP, la principal activación de ALK se produce por la formación de genes de fusión aunque también se han descrito mutaciones. Para que la proteína de fusión resulte estable y activa debe haber unas condiciones estructurales adecuadas del gen de fusión y de la región específica de rotura. Así, la fusión de ALK con otros genes permite que una región promotora con capacidad funcional en el tejido donde se ubica active la región codificante de ALK de la misma manera que la forma nativa de ALK lo hace cuando se une a su ligando.

En el caso del CPCNP, el gen que con más frecuencia realiza la fusión con ALK es EML4 (*“Echinoderm Microtubule-Associated protein-like 4”*), que codifica una proteína citoplasmática involucrada en la formación de microtúbulos. Se genera una inversión del brazo corto del cromosoma 2 [Inv (2)(p21p23)] que une los exones 1–13 de EML4 a los exones 20–29 de ALK. La inversión cromosómica no siempre ocurre en la misma localización, por lo que se pueden formar diversas variantes aunque todas las fusiones incluyen siempre el dominio intracelular con actividad TK de ALK codificada en el exón 20. Sin embargo, los truncamientos de EML4 pueden localizarse en sitios diferentes aunque el dominio aminoterminal de EML4 es necesario y suficiente para generar la actividad transformante oncogénica de EML4-ALK.

En CPCNP se han identificado más de trece variantes de EML4-ALK las más comunes las E13;A20, y E6a/b;A20, (33 y el 29% de los casos, respectivamente). Además existen otros tipos menos frecuentes de fusiones génicas de ALK con otros genes como TFG-11 Y KIF5B²¹. Todos estos reordenamientos generan una activación constitutiva del receptor ALK. Aunque las vías de señalización intracelular mediadas por ALK no han sido todavía bien definidas parece que activan ERK y STAT3 mientras que no muestran influencia sobre PI3K. La naturaleza oncogénica de la proteína de fusión como vía de desarrollo del cáncer de pulmón fue confirmada en ratones transgénicos portadores de EML4-ALK cuando en el epitelio pulmonar se evidenció la formación de adenocarcinomas de pulmón.²²

En España, la incidencia de tumores de pulmón con presencia de la fusión de ALK se sitúa sobre el 3-4%.

El perfil clínico donde se dan tumores de pulmón con presencia de la fusión de ALK suele darse en pacientes jóvenes, con edad de presentación sobre los 50 años, con predominio del género femenino, no fumadores, del tipo histológico adenocarcinoma y ausencia de mutaciones de EGFR y K-Ras. Dentro de los adenocarcinomas con reordenamiento de ALK son más comunes los patrones de tipo sólido-cribiforme, papilar o micropapilar y es muy característica la presencia de células en anillo de sello. El patrón citológico también es peculiar, ya que las células muestran abundante mucina intracelular y los núcleos son pequeños y están desplazados.²³

No obstante, se han descrito casos de alteración de ALK en todos los tipos de CPCNP y también en presencia de mutaciones de EGFR, por lo que los rasgos clínicos o patológicos no deben ser los únicos indicadores para realizar el estudio que detecte la translocación de ALK.

Al igual que ocurre en pacientes con mutación de EGFR, la importancia de la determinación de ALK radica en que supone un subgrupo de enfermos con cáncer de pulmón con un comportamiento biológico diferente y está por confirmar si también con distinta respuesta a fármacos antineoplásicos. En el año 2006 se pusieron en marcha los primeros estudios con crizotinib, inhibidor dual de ALK y MET. Posteriormente, al identificar la posible eficacia en pacientes con CPCNP y presencia de ALK, los estudios se diseñaron específicamente para este tipo de pacientes.

Las alteraciones moleculares de ALK se pueden identificar por hibridación in situ (ISH) por inmunohistoquímica (IHQ) y por RT-PCR. Actualmente, la hibridación in situ fluorescente (FISH) es el procedimiento diagnóstico de referencia a nivel clínico y el único aprobado por la FDA mediante la utilización de la sonda de FISH Vysis ALK Break Apart Probe Kit (Vysis LSI ALK Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe.)

Para definir una muestra como positiva, tiene que existir más de un 15% de células tumorales con señales divididas, en una muestra de al menos 60 células.

La posterior recomendación de la Agencia Europea permite cualquier técnica, sobre todo el FISH con diferentes sondas comerciales, pero también permite la IHQ e, incluso, la RT-PCR. De hecho, la IHQ que puede ser un importante método de cribado inicial. La IHQ emplea anticuerpos dirigidos contra la porción más distal del dominio TK de ALK, que se encuentra conservada en todos los reordenamientos y que constituye la parte activa de la molécula. El anticuerpo más estandarizado es el clon D5F3.

Actualmente se propone la aplicación de la IHQ como método de cribado, aunque siempre hay que recordar el riesgo de resultados falsos negativos inherente a esta metodología y el perfecto valor predictivo positivo de las nuevas IHQ ultrasensibles, que harían innecesaria la confirmación posterior con FISH.

1.2.2.6.2. OTROS BIOMARCADORES

A) Translocación de ROS1

ROS1, receptor TK que puede sufrir translocación en el 1-2% de los pacientes con CPCNP. Los pacientes que presentan esta alteración suelen ser jóvenes y no fumadores, tener adenocarcinomas y no tienen mutaciones de EGFR, Kas, BRAF, HER2 o reordenamientos de ALK43. Su detección debe hacerse por FISH.

B) Mutaciones de K-Ras

La activación de la vía mediada por Ras, especialmente a través de K-Ras, ocurre en un 30% de adenocarcinomas y en un 5% de carcinomas epidermoides. Además, la mutación que provoca la inactivación de NF1 RasGAP se describe en un 7% de CPCNP.

Esta inactivación de NF1 RasGAP es mutuamente excluyente con la de EGFR y provoca una estimulación de todas las isoformas de Ras, aunque no se sabe si produce un efecto similar a los K-Ras mutados o actúa más como mecanismo de resistencia a los anti-EGFR.

Las mutaciones de K-ras en CPNCP ocurren en los codones 12 y 13, y están asociadas al hábito tabáquico y se han relacionado con un comportamiento tumoral más agresivo.

A pesar de que hay datos que apuntan a que la presencia de **mutaciones de K-Ras** puede tener un valor como factor pronóstico y factor predictivo negativo de respuesta a la quimioterapia y de evolución del tumor este hecho no ha podido ser completamente confirmado.²⁴

Por el contrario, la presencia de mutaciones de K-Ras sí se relaciona significativamente con la ausencia de mutaciones de EGFR y con la resistencia a los ITK de EGFR.

Actualmente se están probando agentes que pueden bloquear niveles inferiores de la vía de señalización de Ras como los inhibidores de MEK 1 / 2 y ERK, tanto en mutados como en no mutados en K-Ras, e inhibidores de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR45. Algunos centros realizan determinación de las mutaciones de K-Ras como estrategia para considerar tumores con mayor agresividad o para descartar la

determinación de otras determinaciones que son excluyentes. Sin embargo, dada la escasez de muestra tumoral y la falta de tratamientos activos la mayoría de centros prefieren hacer la detección de mutaciones tratables como EGFR o ALK.

C) Mutaciones de BRAF

BRAF, proteína kinasa serina-treonina localizada en la vía de señalización de RAS. En CPNCP, la incidencia de mutaciones de BRAF se sitúa entre el 1 y 3% pero solo en un 50% se corresponde con la mutación V600E y suelen ser mutuamente excluyentes con las de K-Ras y EGFR. Son también más frecuentes en adenocarcinomas con historia previa de tabaquismo. Las mutaciones de BRAF producirán un aumento de la actividad Kinasa que conducirá a una activación constitutiva de MAPK2 y MAPK3 implicada en el desarrollo del CPCNP. Se están desarrollando inhibidores específicos de BRAF solos o asociados a inhibidores de MEK.²⁵

D) Translocaciones de RET

RET, receptor TK que puede presentar translocación en un 1-2% de los CPCNP. Habitualmente el perfil clínico de los portadores de esta translocación suele ser jóvenes y no fumadores, histología de adenocarcinoma y no presentar ninguna de las otras alteraciones genéticas frecuentes. Actualmente hay varios ensayos que están evaluando la actividad de diferentes inhibidores de RET.²⁶

E) Amplificación de MET

MET es el gen que codifica el receptor del factor de crecimiento hepatocitario (HGFR) situado en el cromosoma 7q21-q31. En CPCNP, se han encontrado tres tipos de alteraciones oncogénicas de MET: sobreexpresión, en un rango del 25 al 75% de casos, amplificación, en un 3 al 10%, y mutaciones solo en un 1%. Estas alteraciones se han descrito tanto en adenocarcinomas como en carcinomas epidermoides y son independientes de la presencia de mutaciones de K-Ras o de EGFR. También, la amplificación de MET se ha descrito en un 10 a un 20% de los pacientes cuyos tumores con mutación EGFR tienen resistencia adquirida a los ITK de EGFR.²⁷

1.2.2.6.3. BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO

En los últimos años se ha estudiado el papel de diferentes marcadores farmacogenómicos como herramienta de predicción de respuesta a los quimioterápicos empleados en CPCNP.

De este modo, se han analizado factores relacionados con la resistencia a:

- platinos (ERCC1, XRCC1, BRCA 1)
- taxanos (BRCA1)
- alcaloides de la vinca (beta-tubulina)
- pemetrexed (TS) o a gemcitabina (RRM1).

Hasta el momento, ninguno de ellos ha demostrado tener un valor predictivo por lo que no pueden ser recomendados en la práctica asistencial.²⁸

En la actualidad, tampoco hay ningún factor molecular capaz de determinar la respuesta a los antiangiogénicos como bevacizumab (fármaco con estudios en marcha) o el desarrollo de toxicidad asociada a estos. Los únicos factores que se sugieren son de tipo clínico y patológico (carcinomas no escamosos).

Durante los últimos diez años, los datos obtenidos a partir de estudios de genómica, expresión, mutacionales y proteómica han conducido a la identificación de mutaciones “driver” adicionales en el cáncer de pulmón, definiéndose nuevos subgrupos moleculares del cáncer de pulmón no microcítico.

1.2.2.6.4. BIOMARCADORES PRONÓSTICO

Otros estudios han analizado y publicado el valor pronóstico de distintos genes en cáncer de pulmón no metastásico:

- El estudio de Toronto identificó 5 genes con valor pronóstico: CCR7, PAFAH1B3, CCT3, HIF1A, STX1A entre los que Lau y col. confirmaron el valor pronóstico independiente de recurrencia en cáncer no metastásico de **STX1A**, **HIF1A** y **CCR7**.²⁹
- Chen y col. identificaron 16 genes y seleccionaron cinco, **DUSP6**, **MMD**, **STAT1**, **ERBB3** y **LCK**, como factores pronóstico y predictor de recurrencia.³⁰

- Endoh y col. Evaluaron el valor pronóstico de 48 genes elaborando un modelo pronóstico con 8 de ellos: **PTK7, CIT, SCNN1A, PGES, ERO1L, ZWINT y ESTs.**³¹
- **FGFR2, KRT13, NTRK2 y VEGF** fueron analizados mostrando el estudio que la expresión de FGFR2 y NTRK2 se asociaban con una reducción del riesgo de metástasis.³²
- Lu y col. publicaron un metaanálisis en el que se analizaron una batería de genes relacionados con la adhesión celular (APC, CDH8, DSP, LY6D, PCDHGA12 y NID), con la motilidad celular (IL8RB, ENPP2 y CCR2), con la respuesta inmune e inflamatoria (CASP8 y CASP10) con la apoptosis celular (INHA, PSEN1, CASP8, CASP10, PIK3R1, BCL2 y BIK) y otros cinco relacionados con mecanismos de transporte celular (ABCC1, ITSN1, CRABP1, SLC2A1 y ZWINTAS). Nueve de estos genes han sido previamente identificados como factores pronóstico: **APC, BCL2, FBN2, TMSB4X, FUCA1, STC1, SLC2A1, INHA y ABCC1.** Finalmente estos nueve y otros 55 fueron seleccionados por los investigadores como los más asociados con riesgo de recurrencia tumoral en estadios localizados y por tanto con necesidad de tratamientos más agresivos.³³

Varios de estos estudios han incluido otros factores bien conocidos como p53 y el gen del retinoblastoma.

El **gen p53** es conocido con gen “gatekeeper” (encargado de proteger a la célula de cualquier alteración dado que inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis ante un daño irreparable en el ADN). Este gen está mutado en más del 50% de los cánceres y en el de pulmón existe una relación lineal entre el riesgo de mutaciones en p53 y el consumo de tabaco siendo menos frecuentes en no fumadores (10-48%) que en fumadores (26-70%). La pérdida de la función de p53 parece imprescindible en la tumorigénesis pulmonar.³⁴

También la hipermetilación de citocina en la región promotora de ciertos genes es el mecanismo implicado con mayor frecuencia en la alteración de la expresión de los genes en el cáncer de pulmón, lo que parece ser dependiente del hábito tabáquico.

1.2.3. HISTOGÉNESIS Y DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PULMÓN

Existe evidencia importante de que el cáncer de pulmón deriva de una célula madre pluripotencial que es capaz de expresar una importante variedad de fenotipos. Esta célula madre epitelial, en la histogénesis normal, se diferencia de las otras células que se encuentran en el árbol traqueobronquial, incluyendo a las células de reserva pseudoestratificadas, de células columnares ciliadas crateriformes, las células neuroendocrinas, y los neumocitos tipo I y tipo II de los alveolos. Las células son capaces de dividirse y pueden mostrar cambios hiperplásicos, metaplásicos o neoplásicos.

La **realización de una historia clínica** detallada y un examen físico detallado es fundamental para el diagnóstico. Además de una analítica rutinaria, la radiografía de tórax debe ser la primera prueba complementaria a realizar. Generalmente, permitirá objetivar masas o nódulos pulmonares, además de aportar datos sobre el mediastino o signos radiológicos de un mayor compromiso como la presencia de derrame pleural, atelectasia, afectación de estructuras óseas o neumopatía crónica asociada. Aportará características del tumor como su localización, límites, cavitación, que pueden servir de orientación para identificar el subtipo histológico.

La **tomografía computerizada** (TC), prueba muy útil en el diagnóstico de la lesión primaria y su extensión puede detectar lesiones menores a un centímetro que no son visibles en la radiografía simple. Habitualmente se utiliza una TC multicorte con un grosor de 3-5 mm para cada uno de los cortes. Debe incluir un área que se extiende desde la base del cuello hasta por debajo de las suprarrenales. La utilización de contraste i.v. es útil para diferenciar las estructuras del mediastino y evaluar una posible invasión de las estructuras vasculares. Permite identificar el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos mediastínicos. Existe un acuerdo general de considerar patológicos aquellos ganglios con un diámetro mayor de 1 cm; atribuyendo, en principio a las adenopatías subcentimétricas un origen benigno (inflamación, infección, etc..).

Permite caracterizar el tumor primario y su relación con la pared torácica, la columna vertebral y las estructuras del mediastino (grandes vasos, corazón, tráquea). La información obtenida es importante para la planificación del tratamiento, siendo muy importante para decidir la resecabilidad del tumor. La extensión del tumor dentro de la vía aérea puede ser estimada mediante la TC, pero requiere de la broncoscopia para

confirmar. Además esta técnica permite evaluar la presencia o ausencia de nódulos satélites del pulmón, y lesiones metastásicas en el pulmón contralateral, la pared torácica o el abdomen superior (hígado y glándulas suprarrenales). A pesar de todo, esta técnica tiene limitaciones, si se baraja la posibilidad de reseca el tumor primario, es necesario recurrir a la mediastinoscopia para completar una correcta estadificación.³⁵

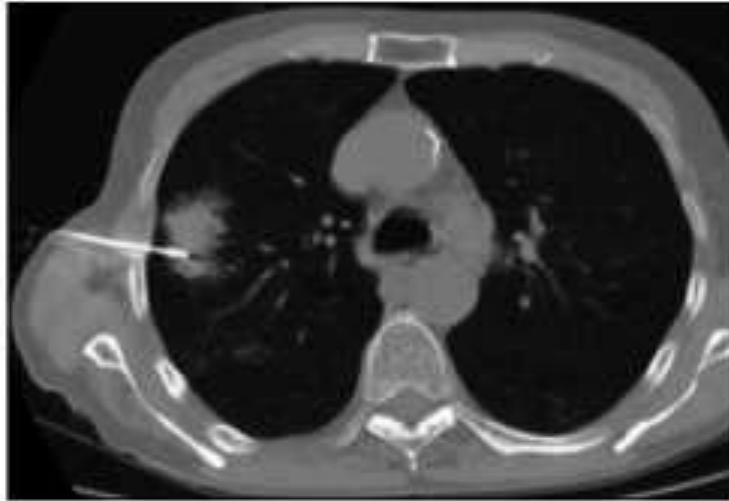


Figura 12. TC proyección axial con adenocarcinoma en pulmón derecho.

Una variante es la **Tomografía de emisión de positrones** (PET y PET/TC, siglas en inglés). La PET con 2-fluoro-2-dexosi-D-glucosa (FDG-PET) detecta áreas con un aumento de la captación de glucosa (secundario a un aumento de la actividad metabólica), permitiendo la detección de la enfermedad en órganos o tejidos con apariencia normal (como los ganglios linfáticos). Las imágenes obtenidas se basan en las diferencias metabólicas que hay entre células normales y las células malignas (éstas tienen un incremento de las demandas metabólicas, y por lo tanto, una mayor captación de glucosa). Una vez inyectada, la FDG se transporta a través de la sangre hacia los tejidos, donde transportadores específicos de la glucosa la llevarán al interior de las células. Una vez allí, la FDG es fosforilada dando lugar a un metabolito que se acumula en el interior de la célula. Parece una técnica muy fiable para confirmar la presencia de malignidad, de ahí su supuesto valor para realizar el estudio de extensión. Parece ser superior a la TAC y a la gammagrafía para detectar metástasis ocultas. Se acepta su utilidad en la evaluación del nódulo pulmonar solitario, de la afectación de los ganglios linfáticos del mediastino y de las metástasis extratorácicas, con excepción del cerebro, ya que el tejido cerebral normal presenta una mayor cantidad de glucosa. Es importante, destacar de esta técnica su alto valor predictivo negativo en la evaluación del mediastino, que es superior al 90%; así, una

PET negativa a nivel del mediastino puede considerarse suficientemente fiable para determinar la ausencia de adenopatías mediastínicas y evitar la realización de una mediastinoscopia. En el caso de que la PET sea positiva, se deberá realizar confirmación diagnóstica debido a la posibilidad de falsos positivos, que pueden ser debidos a adenopatías reactivas de origen infeccioso, enfermedades sistémicas, etc. Las imágenes obtenidas a través de la PET proporcionan información sobre la bioquímica y la fisiología celular pero no da información anatómica. Por este motivo, se han desarrollado técnicas que unen la resolución anatómica de la TAC y la imagen funcional de la PET. Se ha demostrado que la PET-TAC es de gran utilidad en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

La **gammagrafía ósea** tiene escasa especificidad (40% de falsos positivos), por lo que tiene un valor limitado en el diagnóstico y la estadificación del cáncer de pulmón. Su aplicación rutinaria para descartar metástasis óseas en pacientes asintomáticos, en estadios iniciales de la enfermedad, no ha demostrado tener una relación coste- beneficio importante. Sin embargo, su valor aumenta cuando se realiza en pacientes con clínica de dolor óseo, hallazgos de laboratorio compatibles con la presencia de metástasis óseas como elevación de la fosfatasa alcalina, o enfermedad en estadios avanzados.

La **Resonancia Magnética (RM)**, método adicional a la TC en la estadificación del cáncer de pulmón. En algunas circunstancias, la RM puede ser de especial utilidad:

- Evaluación de tumores del sulcus superior o adyacentes al diafragma.
- Evaluación de la invasión torácica o de estructuras vasculares del mediastino.
- Evaluación de la columna vertebral y posible afectación de la médula espinal en el caso de tumores de localización paravertebral o de la existencia de metástasis óseas vertebrales.
- Enfermedad extratorácica: la RM es el método de imagen más preciso para evaluar la presencia de metástasis cerebrales. También es útil en la evaluación de las glándulas suprarrenales

La **citología de esputo** tiene una rentabilidad diagnóstica del 40-80%. Es un método diagnóstico sencillo, no invasivo, especialmente útil en los pacientes incapaces de tolerar otras pruebas más cruentas. En general, ofrece una sensibilidad global aproximada de 0,66% y una especificidad global del 0,99%. Se recomienda recoger tres muestras de expectoración matutina en tres días consecutivos. Este procedimiento puede ser diagnóstico hasta en el 80% de las lesiones de localización central.

La **punción aspiración con aguja fina (PAAF)** guiada por imagen (TC o ecografía) si el tumor es de localización periférica, la rentabilidad puede ser superior a la de la fibrobroncoscopia.

La biopsia por broncoscopia especialmente mediante navegación electromagnética consigue biopsiar el 75% de los nódulos pulmonares de más de dos centímetros de tamaño. Facilita además el muestreo de los ganglios linfáticos mediastínicos que se desea analizar.

Además se pueden utilizar **procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos para obtener muestras de tejido de pacientes con sospecha de metástasis ganglionares**. Los procedimientos no quirúrgicos incluyen PAAF o biopsia de ganglios linfáticos periféricos en pacientes con adenopatías palpables cervicales, supraclaviculares, que puede ser guiada por **ecografía endobronquial (EBUS)** o **endoesofágica (EUS)** o a ciegas.

Los procedimientos quirúrgicos incluyen: mediastinoscopia cervical para acceder a ganglios paratraqueales, traqueobronquiales y subcarinales y mediastinotomía anterior (paraesternal izquierda) o procedimiento de Chamberlain que permite alcanzar ganglios que son inaccesibles mediante la mediastinoscopia simple. Con la mediastinotomía anterior izquierda se accede a los ganglios de la ventana aorto-pulmonar y del mediastino anterior.

La toracoscopia podría utilizarse para evaluar el grado de invasión del tumor primario, especialmente cuando es posible que exista invasión del mediastino, de la pared torácica o de la pleura.

1.2.3.1. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CÁNCER DE PULMÓN

La última clasificación histológica de los tumores epiteliales malignos de pulmón es la de la OMS del año 2004.³⁶:

<p>1. Adenocarcinoma Adenocarcinoma con subtipos mixtos</p> <ul style="list-style-type: none">• Adenocarcinoma fetal bien diferenciado• Adenocarcinoma mucinoso• Cistoadenocarcinoma mucinoso• Adenocarcinoma de células claras• Adenocarcinoma de células en anillo de sello <p>Acinar Papilar Carcinoma bronquioloalveolar</p> <ul style="list-style-type: none">• No mucinoso• Mucinoso• Mixto mucinoso y no mucinoso <p>Adenocarcinoma sólido con mucina</p>
<p>2. Carcinoma de células escamosas</p> <ul style="list-style-type: none">• Papilar• Células claras• Células pequeñas• Basaliode
<p>3. Carcinoma de célula grande</p> <ul style="list-style-type: none">• Carcinoma neuroendocrino de células grandes• Carcinoma basaliode• Carcinoma linfoepitelial• Carcinoma neuroendocrino combinado de células grandes• Carcinoma de célula grande con fenotipo rabdoideo
<p>4. Carcinoma Adenoescamoso</p>
<p>5. Carcinoma pleomórfico con características sarcomatoides</p> <ul style="list-style-type: none">• Carcinosarcoma• Blastoma pulmonar

Desde el punto de vista histórico, la estadificación del cáncer de pulmón ha ido pareja al resto de los tumores. En 1943-1952 Pierre Denoix desarrolla la clasificación TNM para el estudio de los tumores malignos. En 1996, la UICC (Unión Internacional contra el Cáncer) recomienda la clasificación TNM para el cáncer de pulmón.

1.2.3.2. TNM-Estadios 2009 IASLC – UICC – AJCC.

Séptima edición.

La última clasificación tumor, ganglio, metástasis (TNM), elaborada por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) es la validada y más aceptada en CPCNP y la usada por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). En cuanto a los procedimientos recomendados para la estadificación, además del uso generalizado de la tomografía computarizada (TC), se señala el papel de la tomografía de emisión de positrones (PET) o los métodos de fusión de imágenes (PET/TC), para mejor evaluación del mediastino y de las metástasis extratorácicas. Se recomienda la incorporación de la **ecobroncoscopia (EBUS)** y de la **ultrasonografía esofágica (EUS)**, para la obtención de muestra citohistológica, en el algoritmo de estadificación y se destaca la importancia de una reestadificación precisa después del tratamiento de inducción para tomar nuevas decisiones terapéuticas.

El análisis del componente N no originó ningún cambio, pero validó la clasificación actual porque confirmó la degradación pronóstica al incrementarse la N. Se objetivó tendencia a peor pronóstico si la estación afectada era subcarinal. El CIE (Clasificación Internacional de Enfermedades) propuso la agrupación de estaciones ganglionares en zonas para facilitar la descripción de la afectación ganglionar. Según las zonas afectadas se establecen 3 grupos pronósticos: afectación de una sola zona N1; afectación N1 múltiple o N2 de una sola zona, y afectación de N2 múltiple. Estos hallazgos no pudieron validarse por regiones geográficas ni por tipo de bases de datos, y tampoco por las distintas categorías del componente T, por lo que no pudieron recomendarse como cambios para la nueva clasificación. Esto no implica que carezcan de importancia clínica, pues ayudan a perfilar mejor el pronóstico de un tumor y pueden ser relevantes en el planteamiento terapéutico.

El componente M se analizó comparando las supervivencias de los pacientes con nódulo/s adicional/es en un lóbulo homolateral diferente de aquél del tumor primario, aquellos con diseminación pleural, los que tenían nódulos contralaterales y, finalmente, aquellos con metástasis extratorácicas. La interpretación de T establece que el primer grupo de tumores tenía un pronóstico similar al de los tumores T4, y por lo tanto, así se reclasificaron. Los pacientes con diseminación pleural y nódulos pulmonares contralaterales tenían un pronóstico significativamente mejor que aquellos con metástasis a distancia, lo que motivó la subclasificación de M1.

Los cambios recomendados para esta nueva edición se basaron en diferencias de supervivencia. Los tumores T2bN0M0 pasan del estadio IB al IIA; los T2aN1M0, del estadio IIB al IIA, y los T4N0-N1M0, del estadio IIIB al IIIA. En comparación con la sexta edición, los cambios en los componentes T y M y en los estadios de la séptima edición ofrecen una mejor discriminación pronóstica. Los cambios recomendados son aplicables tanto al carcinoma no microcítico como al microcítico.

La séptima edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón da más importancia al tamaño tumoral; estrecha la clasificación de los tumores con nódulos adicionales con su pronóstico; y adapta la clasificación de la diseminación pleural a su pronóstico y a la práctica clínica habitual, que ya contemplaba estos casos como diseminados. La reubicación de algunos TNM en estadios diferentes de los que hasta ahora ocupaban hará plantear nuevos ensayos clínicos sobre tratamiento adyuvante y, hasta que haya nuevas evidencias, obligará a ejercitar el juicio clínico a la hora de indicar este tratamiento en pacientes con tumores para los que, hasta el momento, no había indicación, pero que ahora sabemos presentan peor pronóstico del adjudicado por la sexta edición de la clasificación. La nueva clasificación es la que manejaremos hasta que la siguiente edición aparezca en 2016.

Estadios TNM	
Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio IA	T1a,1b N0 M0
Estadio IB	T2a N0 M0
Estadio IIA	T1a, 2a N1 M0 T2b N0 M0
Estadio IIB	T2b N1 M0 T3 N0 M0
Estadio IIIA	T3, N1, M0 T1a-3 N2 M0 T4 N0-1 M0
Estadio IIIB	T4 N2 M0 Cualquier T N3 M0
Estadio IV	Cualquier T Cualquier N M1a, b

Tabla 1. Clasificación TNM para cáncer de pulmón.

Según base de datos de 100.869 pacientes (IASCL)

- El tamaño del tumor primario es un factor pronóstico importante, por lo que la categoría T se subdivide en 5 criterios diferentes de tamaño
- Los tumores primarios con nódulos satélites en el mismo lóbulo tienen una mejor supervivencia que aquellos con nódulos satélites en distinto lóbulo del pulmón ipsilateral
- El derrame pleural maligno se recomienda reclasificarlo de T4 a M1a, ya que la supervivencia de estos pacientes se aproxima más a la de los pacientes con enfermedad estadio IV
- Se recomienda que el estadio M se subdivide en M1a (enfermedad metastásica limitada al torax) y M1b (enfermedad metastásica extratorácica), dado que los datos existentes indican que la primera tiene mayor supervivencia.

TUMOR PRIMARIO (T)	
TX	La presencia de células malignas en las secreciones broncopulmonares demuestra la existencia de tumor, aunque éste no puede visualizarse mediante métodos de imagen ni broncoscopia. También hace referencia a cualquier tumor que no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
T1s	Carcinoma in situ (el cáncer se localiza a nivel de la mucosa de las vías respiratorias sin invasión en profundidad hacia otros tejidos del árbol respiratorio)
T1	Tumor ≤ 3 cm de diámetro, no invade la pleura visceral, no hay evidencia mediante broncoscopia de que invada más del bronquio principal
T1a	≤ 2 cm
T1b	>2 cm pero ≤ 3 cm de diámetro
T2	Tumor > 3 cm pero ≤ 7 cm de diámetro Afectación de un bronquio principal, pero se localiza a ≥ 2 cm de la carina traqueal Invasión de la pleura visceral Asociación a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hilar pero no afecta a todo el pulmón
T2a	Tumor ≤ 5 cm de diámetro
T2b	> 5 cm pero ≤ 7 cm de diámetro
T3	>7 cm; Invasión de la pared torácica, diafragma, nervio frénico, pericardio parietal, pleura mediastínica, Afectación de un bronquio principal a < 2 cm de carina traqueal pero sin invadirla Afectación a atelectasia o neumonitis obstructiva de todo el pulmón. Nódulos tumorales satélites en el mismo lóbulo pulmonar que el tumor primario
T4	Mediastino, corazón, grandes vasos, carina, traquea, esófago, vértebra; u otros nódulos tumorales en un diferente lóbulo ipsilateral.

Tabla 2. Modificado de STAGING HANDBOOK IN THORACIC ONCOLOGY. International Association for the Study of Lung Cancer. Editorial Rx-Press. Florida. EEUU. 2009.

	GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
N0	Ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales
N1	Metástasis en los ganglios linfáticos intrapulmonares, peribronquiales o hiliares (en la zona de entrada del bronquio en el pulmón) ipsilaterales (en el mismo lado que el tumor primario)
N2	Metástasis en los ganglios linfáticos subcarinales ipsilaterales o mediastínicos.
N3	Mediastínico o hiliar contralateral Metástasis en los ganglios linfáticos supraclaviculares o escalenos ipsilaterales o contralaterales

Tabla 3. Modificado de STAGING HANDBOOK IN THORACIC ONCOLOGY. International Association for the Study of Lung Cancer. Editorial Rx-Press. Florida. EEUU. 2009.

	METÁSTASIS A DISTANCIA (M)
M0	Ausencia de metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
M1a	Nódulo/s tumoral/es en lóbulos contralateral/es; nódulos pleurales o derrame pleural o pericárdico maligno.
M1b	Metástasis a distancia

Tabla 4. Modificado de STAGING HANDBOOK IN THORACIC ONCOLOGY. International Association for the Study of Lung Cancer. Editorial Rx-Press. Florida. EEUU. 2009.

El **estado funcional** (PS, performance status), nos informa de la probabilidad de que el paciente pueda tolerar el tratamiento adecuado por su estadio tumoral que puede estar influido por la edad y la comorbilidad del paciente, o sólo por la propia enfermedad neoplásica. Las escalas de clasificación del estado funcional más utilizadas son:

- **Escala de Karnofsky**; escala de 100 puntos y 11 medidas para describir las habilidades del paciente para llevar a cabo sus actividades de la vida diaria.
- **Escala de ECOG** (Eastern Cooperative Oncology Group), o escala de la OMS (Organización Mundial de la Salud) o de Zubrod. Su ventaja es la simplicidad. Utiliza una escala de 5 puntos y se ha demostrado en un estudio comparativo que es un mejor predictor del pronóstico.

ECOG/OMS	KARNOFSKY	DESCRIPCIÓN
0	90-100	Asintomático y actividad normal
1	70-80	Sintomático pero ambulatorio
2	50-60	Sintomático levantado durante más del 50% de las horas de la vigilia
3	30-40	Sintomático sentado o en cama más del 50% de las horas de la vigilia
4	10-20	Encamado o confinado a una silla
5	0	Fallecimiento

Tabla 5. Escala de clasificación funcional.

1.2.4. TRATAMIENTO

La cirugía, la radioterapia y la quimioterapia son las modalidades terapéuticas utilizadas habitualmente en el tratamiento. Pueden ser utilizadas solas o en combinación dependiendo de la estadificación de la enfermedad neoplásica. El tratamiento debe ser multidisciplinar que agrupe a neumólogos, cirujanos torácicos, oncólogos médicos y radioterápicos, anatomopatólogos y médicos nucleares.

Para la estrategia terapéutica se tendrá en cuenta la histología, edad, estado funcional, comorbilidades, preferencias del paciente y actualmente se estudia la utilidad de los factores moleculares.

1.2.4.1. MODALIDADES TERAPÉUTICAS

A. Cirugía

Sobre la base de diferentes estudios observacionales, la lobectomía sigue siendo el tratamiento de elección en pacientes con CPCNP en los estadios iniciales (I y II).

La neumonectomía tiene mayor morbilidad y mortalidad que las resecciones menores (5-7 % frente a 2-3 %).

Se puede considerar la segmentectomía (preferentemente típica) en casos con función respiratoria límite u otras comorbilidades que contraindiquen o desaconsejen la lobectomía, siempre que se mantengan márgenes de resección mayores de 2 cm o un margen mayor que el propio nódulo. Siempre se debe realizar limpieza o muestreo ganglionar de las estaciones N1 y N2 dependientes.

Nuevas técnicas de **videotoracoscopia (VATS)** se asocian a menor dolor postoperatorio, menor daño tisular y mayor colaboración postoperatoria del paciente, lo que se traduce en una disminución de estancias hospitalarias y costes.

Aunque no existen ensayos aleatorizados, diversos estudios observacionales sugieren que la VATS es una técnica válida para los estadios iniciales, permitiendo beneficiarse de la cirugía a pacientes de mayor edad o con ciertas comorbilidades.

Aunque existen discrepancias respecto al tratamiento quirúrgico en pacientes con estadios IIIA y IIIB prequirúrgicos, se puede considerar en casos seleccionados siempre que se pueda llevar a cabo una teórica extirpación total de la enfermedad tumoral y en el contexto de un tratamiento multidisciplinar.

B. Radioterapia (RT)

1. Radioterapia radical

El papel de la radioterapia en los estadios “precoces” (estadio I y II) debe limitarse a los pacientes inoperables por causa médica, pacientes ancianos y aquellos que rechacen la cirugía.

La radioterapia estereotáxica corporal (SBRT), también conocida como radioterapia estereotáxica ablativa (SABR), es una técnica de alta precisión basada en la administración de altas dosis de radiación de una manera monofraccionada o hipofraccionada. Representa un tratamiento claramente establecido en pacientes con carcinoma no microcítico inoperables o que rechazan la cirugía, con unas tasas de control local y supervivencia superiores a las obtenidas con técnicas conformacionales tridimensionales.

2. Técnicas especiales de radioterapia

- **Radioterapia guiada por la imagen (IGRT).** Basada en la generación de imágenes anatómicas del paciente inmediatamente antes o durante el propio tratamiento radioterápico. Su objetivo es detectar y corregir errores en el posicionamiento del paciente y evaluar el movimiento del tumor y de los órganos de riesgo.
- **Radioterapia adaptada a la respiración (DART).** Controla el movimiento de los tumores pulmonares. Este tipo de intervenciones pueden integrarse durante la planificación del tratamiento, con la inclusión del movimiento respiratorio en la TC de simulación (TC 4D), o bien realizarse durante el propio proceso de tratamiento. Dentro de estas últimas destacan el dampening (el campo de irradiación permanece estático y se abre cuando el paciente detiene la respiración en una fase del ciclo respiratorio), el gating (el campo de irradiación permanece estático y se abre en una fase del ciclo respiratorio en la que el tumor está en la

dirección del campo) y el tracking (el campo de irradiación se mueve siguiendo el desplazamiento del tumor).

C. Quimioterapia (QT)

La mayoría de los pacientes recibirán tratamiento con fármacos antineoplásicos (adyuvante o neoadyuvante a cirugía, secuencial o concomitante a radioterapia, paliativa). Además de los agentes quimioterápicos clásicos, durante los últimos años se han desarrollado fármacos dirigidos frente a dianas específicas, inhibidores de la tirosin-kinasa y los anticuerpos monoclonales, lo que está permitido el avance hacia una terapia más individualizada.

Los fármacos que se emplean con más frecuencia son el cisplatino o carboplatino asociado con taxano, doce o paclitaxel, con gemcitabina (carcinoma epidermoide), con pemetrexed (adenocarcinoma) o con vinorelbina (adyuvancia o metastásico). En carcinoma microcítico el esquema estándar es carboplatino y etopósido (VP16).

Los antiEGFR, erlotinib y gefitinib son una buena alternativa en 2ª línea con estudios fase III en marcha en primera línea y según el estado mutacional de EGFR.

Los inhibidores de ALK podrían suponer una alternativa en pacientes que presentan dicho gen mutado (<10%).

1.2.4.2. TRATAMIENTO POR ESTADIOS

A. Estadios I y II (Fig.13)

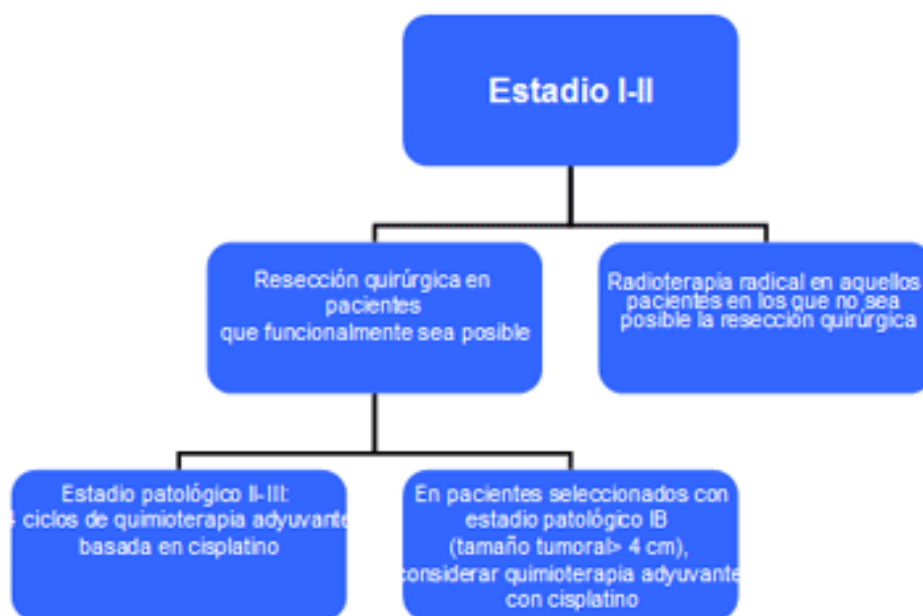


Figura 13. Abordaje terapéutico estadios I-II CPCNP.

B. Estadio III (Fig. 14)

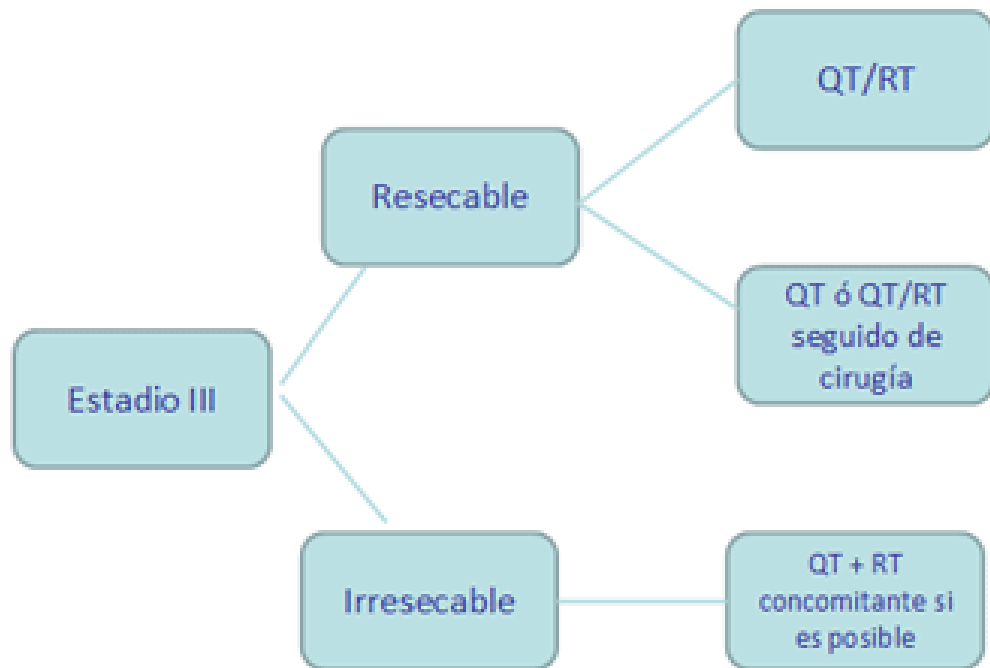


Figura 14. Abordaje terapéutico estadio III.

C. Estadio IV

El tratamiento con quimioterapia frente al mejor tratamiento de soporte incrementa la mediana de supervivencia en 1,5-2 meses, y mejora los síntomas y la calidad de vida en la mitad de los pacientes.

Los esquemas más usados son cisplatino asociado con gemcitabina, vinorelbina (esquema usado como tratamiento adyuvante), taxano (doce o paclitaxel) y el novedoso pemetrexed. En pacientes frágiles se prefiere carboplatino asociado con paclitaxel o sin platinos como gemcitabina y docetaxel. En pacientes ancianos vinorelbina en monoterapia ha mostrado eficacia y buena tolerancia.

2. HIPÓTESIS

En los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón con mutación de EGFR+ la expresión de MUC1 tiene valor pronóstico.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

1. Determinar la expresión de expresión de MUC1 en pacientes con adenocarcinoma pulmonar y mutación de EGFR+ y conocer su valor como factor pronóstico de supervivencia.

3.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Determinar si el sexo, edad, hábito de fumar, hábitat del paciente y haber tenido un cáncer previo de cualquier localización favorece la expresión de MUC1 en los pacientes que desarrollan adenocarcinoma pulmonar.
2. Determinar si el sexo, edad, hábito de fumar, hábitat del paciente y haber tenido un cáncer previo de cualquier localización influyen en el tiempo de supervivencia de los pacientes que desarrollan adenocarcinoma pulmonar.
3. Determinar la supervivencia a 18 meses en pacientes con adenocarcinoma de pulmón con expresión de MUC1.

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1. MATERIAL

4.1.1. FUENTE DE INFORMACIÓN

La información la obtuvo la doctoranda de los registros en la historia clínica y las exploraciones y pruebas complementarias fueron realizadas bajo la tutela de la doctoranda en cada centro.

4.1.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

4.1.2.1. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio longitudinal de casos clínicos sin intervención.

4.1.2.2. DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN (PACIENTES)

La base de datos utilizada para el estudio está formada por un total de 76 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón y que presentaron mutación activadora de EGFR.

La doctoranda recogió los casos diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón entre el 1 de Noviembre de 2008 y el 1 de Noviembre de 2009, en el Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo) y el Hospital de Cabueñes (Gijón) a través del Registro de Tumores de los centros.

4.1.2.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Paciente adulto (≥ 18 años) diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón incluyendo todos los subtipos histológicos.
- La confirmación diagnóstica de adenocarcinoma de pulmón se hizo con biopsia por parte del Servicio de Anatomía Patológica de cada uno de los dos hospitales no siendo válido el diagnóstico definitivo a través únicamente de pruebas de imagen realizadas.

- Se extrajo tejido suficiente mediante pruebas específicas por el servicio de Neumología y Cirugía Torácica para la determinación de EGFR, en aquellos pacientes diagnosticados de adenocarcinoma para confirmar la presencia de dicha mutación.
- El cáncer podía estar en cualquier estadio tumoral.
- El seguimiento en el centro de referencia se hizo al menos durante 18 meses con información clínica, estado tumoral y datos sobre la supervivencia quedando excluidos los pacientes con muerte precoz por cualquier causa que sí son incluibles.

Aquellos pacientes de los que faltaron datos de seguimiento se incluyeron en el estudio y se describieron sus características basales y datos de MUC1 pero no se tuvieron en cuenta para el análisis estadístico.

4.1.2.2. PERÍODO DE OBSERVACIÓN

El periodo de observación fue de 18 meses para determinar la supervivencia en dicho intervalo o hasta el fallecimiento en caso de haberse producido antes.

4.1.3. DEFINICIÓN Y ENUMERACIÓN DE VARIABLES DEL ESTUDIO

A continuación se exponen las variables que la doctoranda recogió de los pacientes:

- **Sexo:** los pacientes considerados para el estudio fueron hombres y mujeres.
- **MUC1:** valor de la glucoproteína mucina 1 que actúa como marcador de supervivencia en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Este marcador se determinó mediante la técnica RT-PCR. Se hizo un punto de corte en $MUC1 < 10$ U/ml y $MUC1 > 10$ U/ml ya que la mayoría de las determinaciones de dicha glicoproteína en nuestros pacientes se aproximaban a estas cifras; 1/3 de nuestros pacientes tenían determinación de $MUC1 > 10$ U/ml. Hubo un valor máximo para MUC1 de 25,30 U/ml y uno mínimo de 1,7 U/ml. A todos los pacientes se les informó que iban a entrar en un estudio clínico, lo cual aceptaron ; y la obtención de las muestras en todos los casos se hizo a la vez que se extraía sangre periférica

para analítica convencional solicitada por sus médicos correspondientes; en ningún caso como analítica extraída sólo para nuestro estudio.

- **Edad:** edad de los pacientes del estudio en el momento de su inclusión en el mismo.
- **Hábitat:** los pacientes se dividieron entre hábitat urbano y rural. El hábitat urbano se definió como el territorio comprendido por la capital del Principado de Asturias (Oviedo) y la Villa de Gijón. El resto del territorio se entendió como hábitat rural.
- **Consumo de tabaco:** considerado como variable dicotómica, en el que se indica si un paciente fuma o no en el momento en que se hace la entrevista.
- **Número de paquetes tabaco año** en el caso de aquellos pacientes que declararon que eran fumadores.
- **Cáncer previo:** variable dicotómica que indica si los pacientes tuvieron o no un cáncer previo con independencia de su localización.
- **Tratamiento:** variable dicotómica que indica si los pacientes fueron sometidos o no a tratamiento.
- **Tiempo de supervivencia:** tiempo de supervivencia de los pacientes del estudio. El tiempo máximo de seguimiento fue de 18 meses. Esta variable se definió como el tiempo en meses desde la confirmación histológica del adenocarcinoma de pulmón hasta la fecha de fallecimiento por cualquier causa o pérdida de seguimiento. Los pacientes vivos en el momento del análisis fueron censurados con los estadísticos utilizados para el cálculo.
- **EGFR:** todos los pacientes considerados para el estudio presentaban positividad en el marcador EGFR (*epidermal growth factor receptor*).

4.2. MÉTODO

4.2.1. MUC1

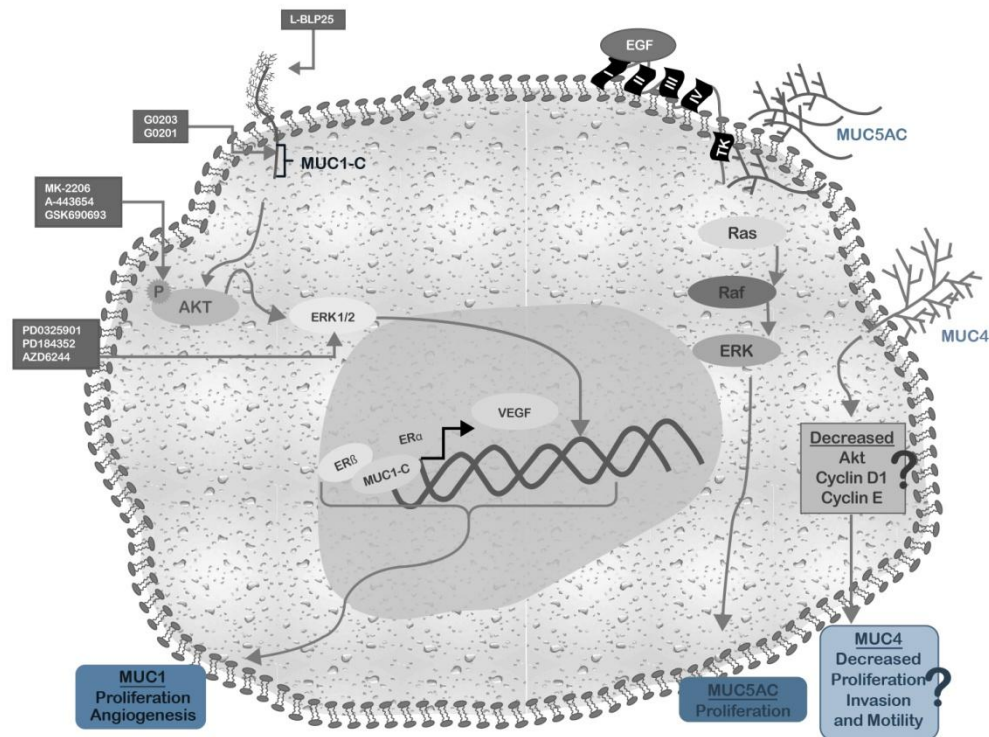


Figura 15 – MUC1

MUC1 es una O-glicoproteína expresada en la parte apical de epitelios normales pero frecuentemente cambia su distribución, estructura e inmunogenicidad en células tumorales de adenocarcinomas y estos cambios se asocian al comportamiento tumoral. La O-glicosilación de MUC1 en las células neoplásicas es truncada dando lugar al antígeno Tn (MUC1-Tn) o al antígeno T (MUC1-T). Tanto uno como otro pueden ser inmunogénicos y posiblemente rompan la tolerancia hacia células neoplásicas para favorecer el infiltrado inflamatorio en la zona del tumor.³⁷

Las mucinas protegen al organismo contra las infecciones por el patógeno de unión a oligosacáridos en el dominio extracelular, evitando que el agente patógeno llegue a la superficie de la célula. La sobreexpresión de MUC1, la localización intracelular aberrante y los cambios en la glicosilación se asocian con adenocarcinomas de diferentes localizaciones (colon, mama, ovario, pulmón y páncreas).

La biosíntesis de los O-glicanos es difícil y la actividad selectiva de las enzimas que participan en la glicosilación depende de los estímulos del que recibe las células, por lo que en la carcinogénesis la biosíntesis de los O-glicanos es interrumpida como sucede en MUC1. MUC1 está hipoglicosilada en el adenocarcinoma porque sólo activa la enzima que une el primer monosacárido (GalNAc) a una serina o a una treonina de la parte proteica de la molécula, originando una estructura (GalNAc1-O-S/T) llamada antígeno Tn. Si en la biosíntesis se activa la enzima que une el siguiente monosacárido (Gal), la estructura resultante es el antígeno T (Gal β 1-3GalNAc1-O-S/T)

La modificación estructural de MUC1 cambia las funciones y sus propiedades antigénicas. El antígeno TN y el antígeno T son precursores para (TASS sacarídicos), como el antígeno sialil-Tn o el sialil Lewis X. El ácido siálico terminal le confiere carga negativa a las moléculas modificando la capacidad de unión de las células neoplásicas a las células endoteliales, ya que estas tienen receptores de la familia de las selectinas que son ligandos específicos de sialil-Lewis X. Esto aumenta la capacidad de metástasis vía hematogena o linfática en el adenocarcinoma pulmonar.

MUC1 pertenece a la categoría “sobreexpresado TAA”, incluso si esta sobreexpresión no es el único sello de MUC1 en células tumorales, ya que a menudo es acompañada por la modificación de estado de glicosilación de MUC1. Tanto la sobreexpresión y la modificación de su estado de glicosilación hacen de esta proteína altamente inmunogénica un objetivo interesante en **la inmunoterapia del cáncer**.

El gen MUC1 fue clonado a principios de 1990. Pertenece a la familia de mucina, que comprende 21 miembros. MUC1 codifica una glicoproteína transmembrana de tipo I, con un número variable de secuencias de repetición 20-amino-ácido que se hace referencia como “variable de repetición en tándem de número” (VNTR). El número de VNTR es variable de un alelo a otro, variando desde 25 hasta 120 VNTR por molécula de MUC1.

MUC1 tiene una masa del núcleo de proteína de 10-225 kDa que aumenta de 250 a 500 kDa con glicosilación. Se extiende más allá de de 200-500 nm de la superficie de la célula MUC1 se escinde en el retículo endoplásmico en dos piezas, la cola citoplásmica, incluyendo el dominio transmembrana y el dominio extracelular. La cola citoplásmica consta de 72 aa (CD) que se escinde y es regulada por la fosforilación de tirosina.

La expresión de MUC1 en la superficie apical de las células epiteliales de las vías respiratorias es un hecho normal. Un polimorfismo del gen MUC1 para el alelo MUC1 se asocia al adenocarcinoma de pulmón, pero no con carcinoma de células escamosas.

MUC1 es un marcador clínico para el adenocarcinoma de pulmón. Durante la desdiferenciación en la progresión del adenocarcinoma de pulmón, MUC1 se expande por el plasma donde bloquea célula- célula y célula-matriz de adhesión, lo que permite la invasión de células tumorales.

Dentro de las células, MUC1-CD interactúa con proteínas como P13K, Shc, PLC1, c-Src, Grb-2, p53, IKK β , IKK γ , β -catenina, hsp90, hsp70, y ER α . MUC1-CD interactúa con ER α en el núcleo de las células cancerosas donde aumenta la actividad ER α -transcripcional. MUC1 cola citoplásmica se une a p53. La interacción se incrementa por el estrés genotóxico. Esto activa a p21 que se asocia a la detención del ciclo celular. MUC1 cola citoplásmica interactúa con beta-catenina . En las células cancerígenas, el aumento de expresión de MUC1 promueve la invasión de células a través de la beta-catenina, lo que resulta clave en la iniciación de la transición epitelial-mesenquimal que promueve la formación de metástasis.

Los linfocitos T citotóxicos CD8 tienen función antitumoral cuando son activados por el complejo molecular péptido-MHC clase I (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I) presentes en la superficie de las células neoplásicas, siempre y cuando el péptido sea antigénico. Debido a que los péptidos glicosilados de MUC1 (MUC1-Tn ó MUC1T) tienen más epítopes antigénicos activan más eficientemente a los linfocitos T CD8, por lo que es importante MUC1 hipoglicosilada en la inmunoterapia contra el cáncer. El primer antígeno asociado a tumor humano (TAA) reconocido por los linfocitos T citotóxicos, era MAGE-A1 que fue identificado a partir de linfocitos infiltrantes de tumores obtenidos después del cultivo de una biopsia de melanoma. Desde entonces muchos otros TAA han sido identificados, unos se limitan a un tipo de cáncer y otros aparecen en distintos tipos de cáncer tales como la TAA sobreexpresado (HER-2/neu, p53, telomerasa, MUC1).

Desde el descubrimiento de que el sistema inmune puede controlar la progresión del cáncer, que ha sido conceptualizado en la teoría “tres E” (eliminación, equilibrio y escapar), los principales objetivos en el campo de la inmunoterapia son entender cómo el sistema inmune se activa específicamente contra las células cancerosas e identificar objetivos cancerígenos antigénicos importantes.

El humo del cigarrillo aumenta el riesgo de cáncer de pulmón y representa el 87% de las muertes por cáncer de pulmón. En la vía respiratoria normal, O-glicosilada-mucina-1 (MUC1) y uniones adherentes (AJ) establecen una barrera estructural que protege las vías

respiratorias de los estímulos infecciosos, inflamatorios y nocivos. El humo altera la adhesión célula-célula a través de sus efectos perjudiciales sobre la proteína AJ, cadherina epitelial (E-cad). La pérdida de E-cad es un importante sello de transición epitelio-mesenquimal (EMT) y se asocia a cáncer de pulmón de peor pronóstico. El humo del tabaco aumenta la expresión de MUC1 en los macrófagos pulmonares.

Vacunas contra el cáncer basadas en antígenos asociados a tumores humanos (TAA) han sido probados en pacientes con cáncer avanzado o recurrente, en combinación con o después de la terapia estándar. Pero suscitan preocupación por su potencial toxicidad. Debido a que los TAA se consideran antígenos propios, la predicción es que tales vacunas induzcan autoinmunidad. Estudios sobre TAA epitelial MUC1 han revelado que, en comparación con MUC1 en células normales, tumores, lesiones premalignas y patologías no cancerosas que afectan a las células epiteliales, expresan MUC1 anormal, que no es un auto-antígeno, sino más bien un antígeno asociado a enfermedad anormal (DAA).

La vacuna de liposoma BLP25 es una vacuna liposomal que contiene un péptido MUC1 25-amino-ácido correspondiente al péptido del núcleo de MUC1 (STAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP) y acoplado con un residuo de lisina palmitoil en el extremo C que aumenta la incorporación de este lipopéptido en la partícula de liposoma. Esta estrategia se utiliza principalmente en el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) y es bien tolerado. Esta vacuna parece haber mejorado la supervivencia del paciente para la etapa IIIB/IV CPCNP.

Otra estrategia importante es TG4010, que es un virus recombinante, que codifica MUC1 e IL-2. A diferencia de la anterior, ésta se está utilizando para más tumores (renales, próstata...). Se han observado buenas respuestas clínicas utilizando TG4010 para el cáncer de pulmón. De hecho, TG4010 aumentó el efecto de la quimioterapia, con un aumento de seis meses, la supervivencia libre de progresión para los pacientes que recibieron quimioterapia en combinación con la vacuna en comparación con los pacientes que recibieron quimioterapia sólo. Un ensayo fase IIb/III está evaluando la ventaja clínica de la combinación de quimioterapia y TG4010 en el CPCNP.

En la actualidad existen 11 mucinas unidas a la membrana: MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 Y MUC21; y 7 mucinas secretoras: MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC8 Y MUC19. De ellas, MUC1 Y MUC5AC predominan en el CPCNP y están relacionadas con la evolución de la enfermedad.³⁷

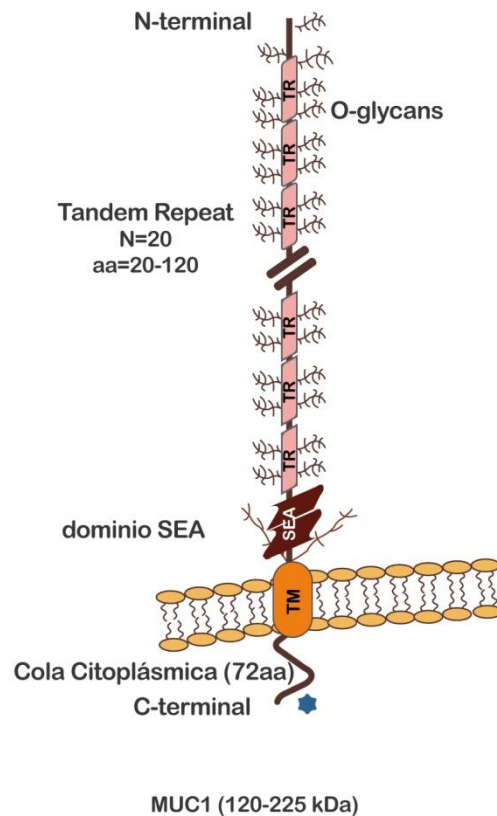


Figura 16 - MUC1 (120-225 kDa)

4.2.2. TÉCNICA DE ESTUDIO DE MUC1

4.2.2.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR es una técnica usada para amplificar el ADN millones de veces, por la repetida réplica de una plantilla, en un corto período de tiempo. El proceso utiliza sistemas de oligonucleótidos sintetizados *in vitro* específicos para la preparar síntesis del ADN. El diseño de las sondas *primers* es dependiente de las secuencias de ADN que se desea estudiar. La técnica se realiza durante muchos ciclos (generalmente 20 - 50) para derretir la plantilla de ADN a alta temperatura, permitiendo que los *primers* se alineen a las

secuencias complementarias dentro de la plantilla de ADN y después permitiendo la replicación de la plantilla con la polimerasa de ADN. El proceso se ha sido automatizado con el uso de polimerasas de ADN termoestables aisladas de bacterias que crecen en respiraderos termales en el océano o en fuentes de agua caliente. Durante la primera ronda de replicación, una sola copia de ADN se convierte a dos copias y así sucesivamente dando por resultado un aumento exponencial en el número de copias de las secuencias blanco de los *primers*. Después de apenas 20 ciclos una sola copia de ADN se amplifica más de 2.000.000 de veces.

4.2.2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) A TIEMPO REAL (RT-PCR)

En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación.

Los **sistemas de detección por fluorescencia** empleados en la PCR a tiempo real suelen ser de dos tipos: agentes **intercalantes** y **sondas específicas marcadas con fluorocromos**.

A. Agentes intercalantes

Aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la

PCR. Para mejorar la especificidad se emplean condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad. Además, la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia diana.

B. Sondas de hibridación específicas

Marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor, se basan en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET) entre las dos moléculas. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis o sondas TaqMan, las sondas moleculares beacons y las sondas FRET.

1. Sondas de hidrólisis.

Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN diana, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor

están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector.

2. Molecular beacons.

Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' y presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN diana. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. La fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN diana la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (Fig. 17).

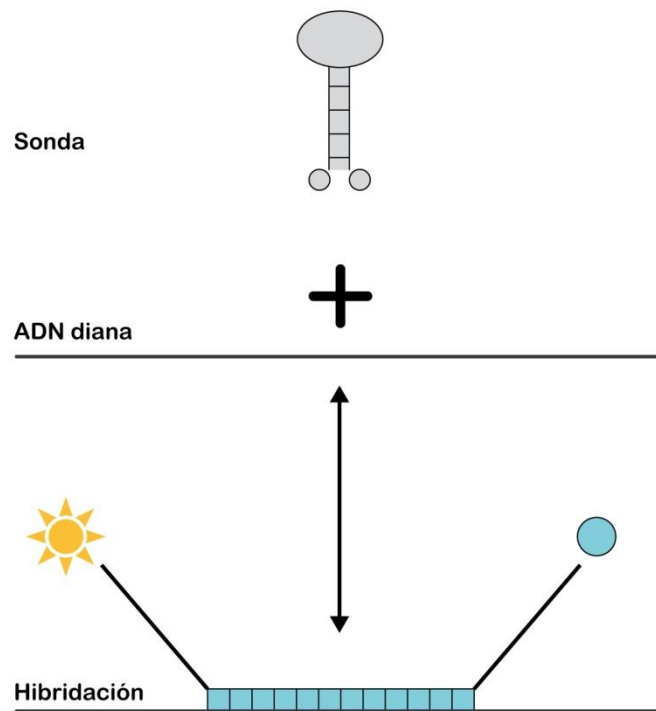


Figura 17 - Molecular beacons

3. Sondas FRET.

Se compone de dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una sonda lleva un donador en el extremo 3' y la otra un aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas, los dos fluorocromos están próximos. Al ser excitado, el donador transfiere su energía al aceptor que, a su vez, emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo (Fig. 18).

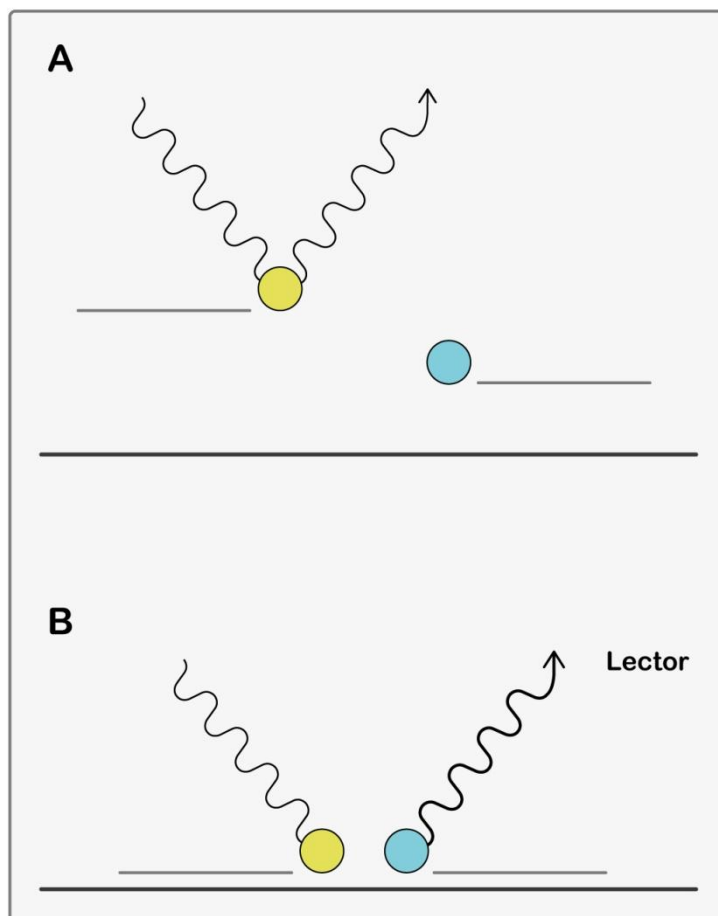


Figura 18 - Sondas Fret

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida.

El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y las condiciones de la reacción resultan más complicadas.

4.2.2.3. EQUIPOS PARA RT-PCR

Formados por un termociclador y un lector de fluorescencia efectúan la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales usados y en cualquier momento de la reacción. Los más utilizados son los fabricados por Applied Biosystems y Roche Diagnostics, este último utilizado en este estudio. Las diferencias más importantes entre estos equipos hacen referencia a la rapidez y al número de muestras que se pueden procesar al mismo tiempo. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción (PCR múltiple) o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores.

Los programas de los equipos de PCR a tiempo real tienen varias formas:

1. Amplificación y detección de ADN o ARN diana en la muestra.

2. PCR múltiple.

3. Cuantificación del ADN o ARN diana en la muestra. Se puede cuantificar la concentración inicial de ADN (o ARN) diana en la muestra, añadiendo simplemente unos controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana (curva patrón) en la tanda de amplificación. En la RT-PCR el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo, y se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (Fig.19). Así se puede controlar la amplificación en las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante. Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (*C_p*, *de crossing point*) o ciclo umbral (*C_t*, *de threshold cycle*) y es inversamente proporcional a

la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus C_p correspondientes se dibuja una curva patrón. Interpolando en ella los valores de los C_p de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial.

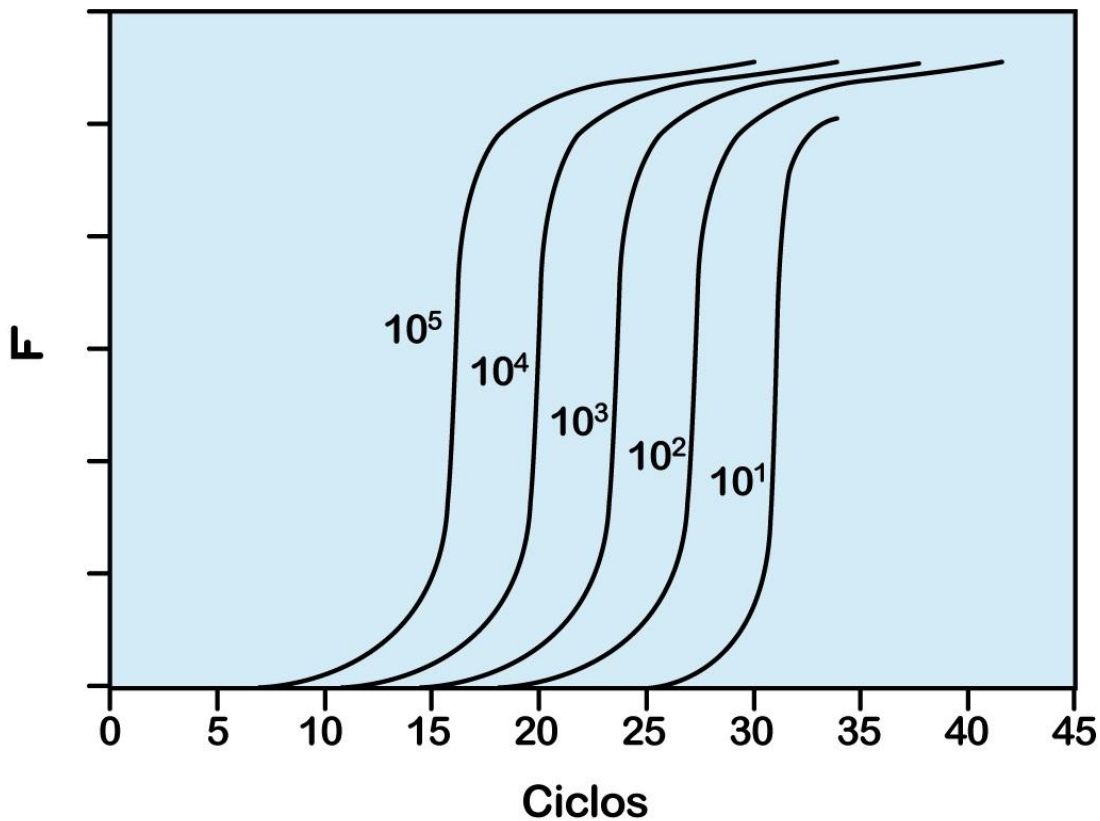


Figura 19. Curva patrón para identificación.

4. Análisis de curvas de disociación. Mediante esta aplicación se puede determinar la T_m de los amplicones para comprobar su especificidad. También permite el análisis de mutaciones puntuales, que se puede abordar de diferentes maneras. Uno consiste en usar una sonda complementaria con el ADN diana de tipo salvaje, que abarque la posición del polimorfismo. El híbrido formado entre sonda y ADN de tipo salvaje tendrá una estabilidad mayor que el formado entre la sonda y el ADN mutado, puesto que en este caso la complementariedad no es absoluta. La mayor estabilidad de la unión entre la sonda y el ADN salvaje se reflejará en una T_m superior. Las diferencias en la temperatura de disociación de los híbridos nos permitirá discriminar perfectamente entre el ADN de tipo salvaje y el de tipo mutado, pudiéndose establecer además, de forma relativa, la

cantidad de ADN de tipo salvaje y la de tipo mutado cuando ambos están presentes en la misma muestra (Fig. 20).

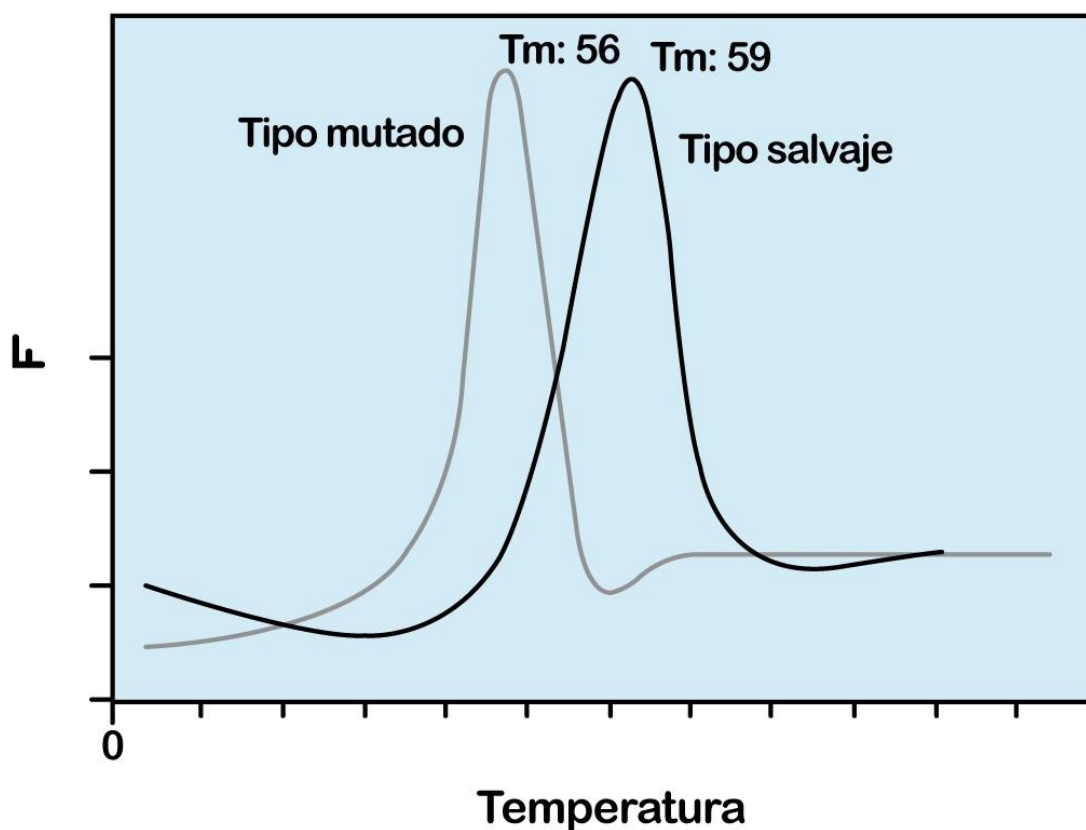


Figura 20. Determinación de mutaciones puntuales mediante análisis de curvas de disociación.

4.2.2.4. VENTAJAS DE LA PCR A TIEMPO REAL

La gran ventaja de la PCR a tiempo real es su rapidez, ya que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Si el equipo empleado es el Light Cycler o equivalente, esta ventaja todavía es mayor, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30-40 minutos. Además, gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas a tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor (5-6 log) que en los procedimientos convencionales (2-4 log). Asimismo, la determinación de mutaciones

puntuales que pueden estar relacionadas con resistencias a medicamentos antimicrobianos o con factores de virulencia, es mucho más fácil. Los equipos para PCR a tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

4.2.2.5. NUESTRO MÉTODO DE DETERMINACIÓN

Se extrajo una muestra de sangre periférica con gelosa para la obtención de suero en cantidad de 10 ml; la misma cantidad que se extrajo de sangre periférica con EDTA para la obtención de DNA genómico y RNA total, por parte del personal de enfermería, bajo tutela de la doctoranda, de 76 pacientes mediante venopunción estándar. El suero obtenido se trató mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y fue separado del sedimento celular de la sangre; posteriormente se conservó a -20°C hasta que fue procesado.

El ARN total se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica utilizando el kit NucleoSpin RNA II de Macherey-Nagel (Düren, Alemania) y transcribió inversamente a ADNc (ADN complementario) utilizando el kit “First Strand cDNA Synthesis para RT-PCR (AMV) de Roche Diagnostics, GmbH (Mannheim, Alemania). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante. El ADNc resultante fue amplificado con las correspondientes parejas de cebadores específicas, utilizando los kits comerciales “RT² qPCR Primer Assay for Human MUC1: PPH01085A” y “RT² qPCR Primer Assay for Human GAPDH: PPH00150F” (SABiosciences Corporation-QIAGEN, Frederick, MD, USA), realizando las amplificaciones por duplicado y utilizando el siguiente programa de PCR: 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 minuto repetido 40 ciclos. Para la detección de la amplificación se utilizó SYBRGreen, un fluoróforo que se une a ácidos nucleicos de doble cadena, (SYBR®Green qPCR Mastermix, SABiosciences Corporation-QIAGEN, Frederick, MD, USA) con el equipo ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (de Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania).

La medida de la expresión génica por medio de **RT-PCR** es una cuantificación relativa en la que se compara, entre las diferentes muestras, la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo cuya expresión no varía en las condiciones del experimento (control endógeno).

En este caso como gen de referencia para el control endógeno y para la normalización de la expresión se utilizó la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Todos los amplicones fueron examinados en geles de agarosa con una concentración del 3% y utilizando un marcador de tamaños de ADN (DNA Ladder) de 1 Kb, con el fin de asegurar que tenían el tamaño correcto.

Los datos fueron analizados utilizando el método de la $\Delta\Delta\text{CT}$ para la cuantificación relativa. Este método consiste en comparar directamente los Cts del gen testado y gen de referencia (ΔCt) en cada muestra, y posteriormente comparar los ΔCt de las muestras experimentales con respecto a la muestra control.

Para aplicar dicho método es necesario que la eficiencia en la amplificación de los genes analizados sea similar. Esto se determinó mediante el análisis de diluciones seriadas de ADNc con los valores de la pendiente del logaritmo de la cantidad de cDNA en comparación con una CT de $<0,1$. El cálculo final de la expresión relativa de cada gen se realizó de acuerdo a la fórmula:

$$\text{RI} = 2^{-[(\text{CT muestra} - \text{CT referencia}) - (\text{CT Standard de la muestra} - \text{CT Standard Referencia})]}$$

4.2.3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

4.2.3.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Las variables objeto de estudio se describen en la sección de resultados por medio de métricas tales como la **media, desviación estándar y proporciones**. Dicha información se representa de manera gráfica con histogramas y diagramas de sectores. Finalmente, se analiza la **normalidad** a través del test de Anderson y Darling³⁸. **El nivel de significación estadística alfa considerado para todo el trabajo ha sido de $p < 0.05$.**

4.2.3.2. ESTADÍSTICA INFERENCIAL UNIVARIANTE Y MULTIVARIANTE

Las técnicas de estadística inferencial utilizadas en el presente proyecto de investigación incluyen los modelos de regresión lineal³⁹ y el coeficiente de correlación de Pearson. Se

utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney^{40, 41} para comprobar las diferencias entre medianas de distintos grupos.

Con el fin de estimar la fracción de pacientes vivos en cada instante temporal, se aplicó el estimador no paramétrico de la **función de supervivencia de Kaplan y Meier**⁴². La determinación de la existencia o no de diferencias estadísticamente significativas entre grupos en el tiempo de supervivencia se determinó a través del **test log-rank**^{43,44}.

Existen diversos **modelos de supervivencia** que involucran covariables al incorporar la manera en que éstas afectan al tiempo hasta el fallecimiento del sujeto en estudio. De entre estos modelos, el utilizado en el presente estudio ha sido el denominado **de riesgos proporcionales o de Cox**⁴⁵. En un modelo de función de riesgo como el de Cox, es posible utilizar dos tipos de covariables: variables y factores. Una variable es aquella que toma valores numéricos que normalmente están en una escala continua, como la edad. Un factor es una variable que toma un conjunto de valores limitado, como por ejemplo en el caso del presente trabajo puede ser el sexo de los pacientes (hombre o mujer), su hábitat (urbano o rural) y un valor de glicoproteína MUC1 (igual o inferior a 10 o superior a 10). Finalmente, con el fin de abordar el estudio de las diferencias existentes entre aquellos pacientes que sobreviven más de 18 meses y los que no, se utilizó el análisis discriminante^{46,47} con validación cruzada. Los resultados obtenidos con el modelo discriminante se evaluaron a través del **coeficiente Kappa**⁴⁸ y el cálculo de los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos^{49, 50}.

4.2.4. ASPECTOS ÉTICOS

4.2.4.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La inclusión de los pacientes en el estudio se llevó a cabo según los requerimientos expresados en las normas internacionales relativas a la realización de estudios epidemiológicos, recogidas en las International Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies⁵¹, así como la Declaración de Helsinki.⁵² Ésta define los principios que deben ser respetados por todas las personas implicadas en esta investigación. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter

personal de todos los participantes se ajustó a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal.

4.2.4.2. EVALUACIÓN BENEFICIO-RIESGO

Puesto que se trata de un estudio epidemiológico longitudinal de casos clínicos, el presente estudio no tenía posibilidad de generar ningún riesgo sobre los pacientes estudiados al no suponer ningún cambio en el enfoque y manejo al que se sometían siguiendo la práctica clínica habitual.

4.2.4.3. PROCESO, ALMACENAMIENTO Y CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS

Los datos se registraron en una base de datos que no tenía ningún tipo de dato personal que pudiera identificar al enfermo, como el nombre, las iniciales, documento de identidad o número de historia clínica sino que se identificaron por un número correlativo. La investigadora principal de este estudio fue la única persona que custodió la relación entre número asignado y datos identificativos de los pacientes.

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del estudio en la base Excel donde se recogieron, sólo tuvieron acceso a los mismos, la doctoranda, y su equipo de colaboradores. Estos datos se trataron conforme a lo que dispone la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, exclusivamente para el desarrollo y buen fin del estudio.

4.2.4.4. INTERFERENCIA CON LOS HÁBITOS DE PRESCRIPCIÓN DEL MÉDICO

El proyecto aquí planteado no interfirió en ningún caso con el manejo clínico habitual, los hábitos de tratamiento ni el seguimiento de los pacientes.

4.2.4.5. PROCEDIMIENTOS DE COMUNICACIÓN DE REACCIONES ADVERSAS (RA)

La doctoranda conocía la obligación de notificar las RA de las que tuviera conocimiento al recoger los datos en la historia clínica. Dicha notificación se haría al Centro de farmacovigilancia de la Comunidad Autónoma, a través del sistema de tarjeta amarilla.

5. RESULTADOS

5.1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

En el presente apartado se recoge la información descriptiva más relevante correspondiente a todas las variables utilizadas en este estudio. Existe un paciente del que sólo se dispone de información relativa a su sexo y valor de MUC1. Dicho paciente, aunque incluido en el estudio a efectos de reflejar todos los que fueron estudiados, no fue utilizado en todos aquellos cálculos estadísticos que requirieron del uso de aquellas variables de las que no se tenía registro.

La Tabla 4 muestra un resumen de todas las características basales de los pacientes de la muestra.

Igualmente, la Tabla 5 presenta el resumen de dichas características para los pacientes hombre y la Tabla 6 para las pacientes mujer.

Sexo	62 hombres 14 mujeres 1 no disponible
Edad (años)	64,95 (9,98)
MUC1	7,865 (4,656)
Hábitat	25 rural, 50 urbano, 1 no disponible
Consumo de tabaco	64 no, 11 sí, 1 no disponible
Número paquetes tabaco año	19.182 (9.379)
Cáncer previo	67 no, 8 sí ,1 no disponible
Tratamiento	9 no, 66 sí, 1 no disponible
Tiempo de supervivencia	7,47 (4,83)

Tabla 6. Resumen de las características de los pacientes de la muestra. Valores medios y desviaciones estándar (entre paréntesis).

Edad (años)	66,72 (9,84)
MUC1	7,899 (5,017)
Hábitat	20 rural, 41 urbano, 1 no disponible
Consumo de tabaco	50 no, 11 sí, 1 no disponible
Número paquetes tabaco año	19.182 (9.379)
Cáncer previo	54 no, 7 sí, 1 no disponible
Tratamiento	7 no, 54 sí, 1 no disponible
Tiempo de supervivencia	6,71 (5,01)

Tabla 7. Resumen de las características de los pacientes hombre de la muestra. Valores medios y desviaciones estándar (entre paréntesis).

Edad (años)	57,21 (6,41)
MUC1	7,714 (2,631)
Hábitat	5 rural, 9 urbano
Consumo de tabaco	14 no, 0 sí
Cáncer previo	13 no, 1 sí
Tratamiento	2 no, 12 sí
Tiempo de supervivencia	10,36 (2,54)

Tabla 8. Resumen de las características de las pacientes mujer de la muestra. Valores medios y desviación estándar (entre paréntesis).

5.1.1. EDAD

La Figura 21 muestra el histograma correspondiente a la distribución por edades de los pacientes del estudio. A continuación, las dos figuras siguientes muestran la distribución de dichas edades en los pacientes divididos en hombres (Fig. 22) y mujeres (Fig. 23). El histograma permite apreciar cómo existen pacientes de sexo masculino de mayor edad que las mujeres de la muestra. La mayor dispersión del histograma de los hombres se complementa con la existencia de varones con edades inferiores a las más bajas recogidas en las mujeres del estudio.

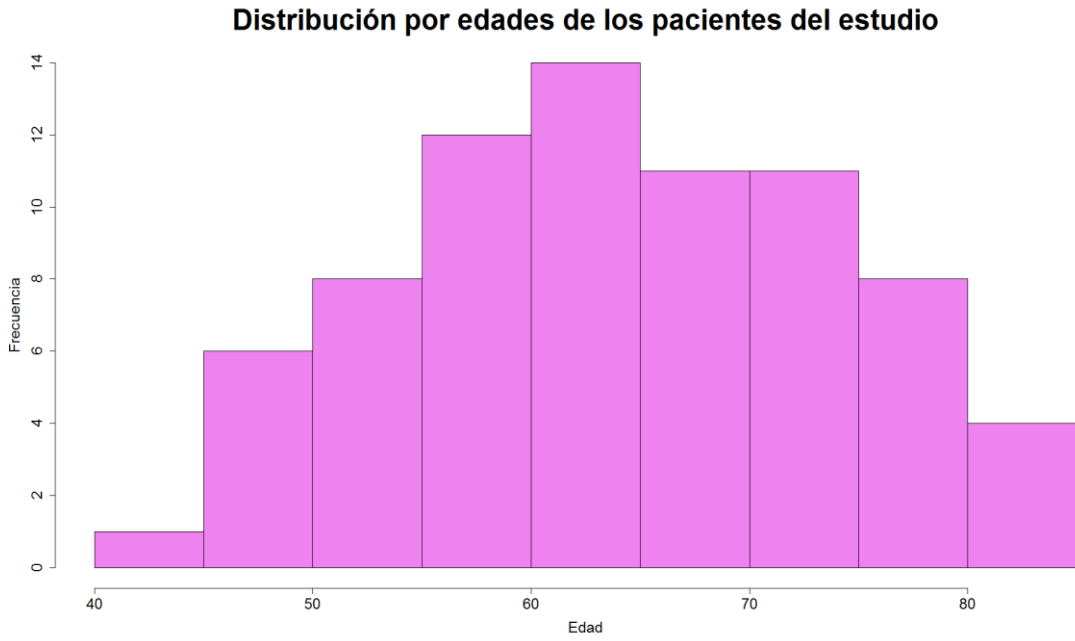


Figura 21. Distribución por edades de los pacientes del estudio.

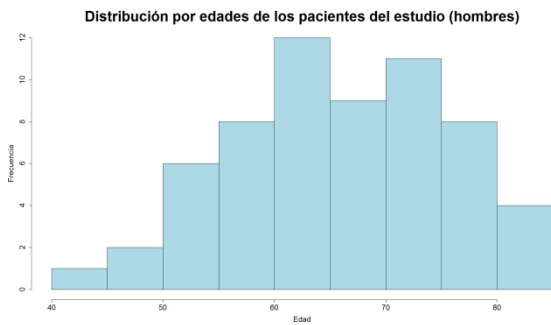


Figura 22. Distribución por edades de los pacientes del estudio (hombres).

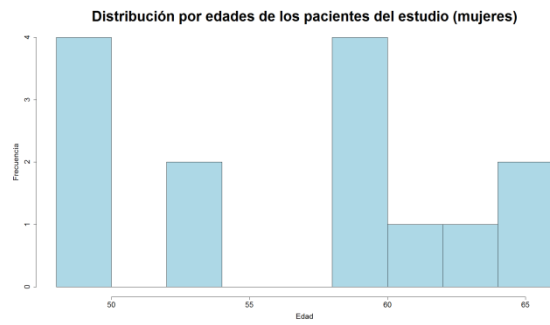


Figura 23. Distribución por edades de los pacientes del estudio (mujeres).

5.1.2. SEXO

Los 76 pacientes que componen la muestra objeto de estudio se dividen en 62 hombres (81,57%) y 14 mujeres (18,43%). La mencionada distribución se presenta de forma gráfica en la figura 24.

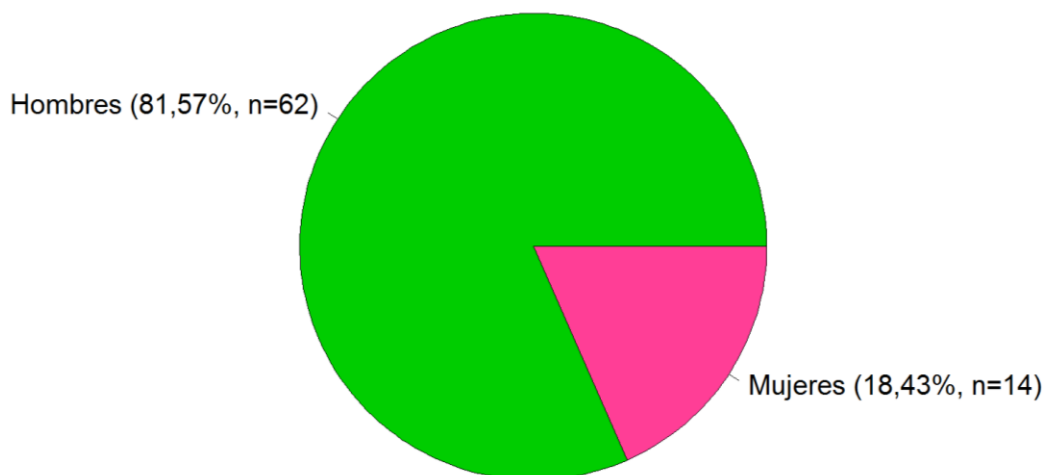


Figura 24. Distribución por sexo de los pacientes de la muestra.

5.1.3. MUC1

La figura 25 presenta un resumen de los valores de la MUC1 en los pacientes del estudio. La división de estos valores en función del sexo del paciente se recoge en la figura 26 para los hombres y la figura 27 para las mujeres.

Los valores medios y desviaciones estándar de esta variable para el total de la muestra así como pacientes divididos en hombres y mujeres se presentaron en las tablas contenidas al comienzo de esta sección. Los valores más altos de MUC1 se registran en los pacientes varones. Además, también se produce una mayor dispersión del valor de esta glicoproteína en los hombres que en las mujeres.

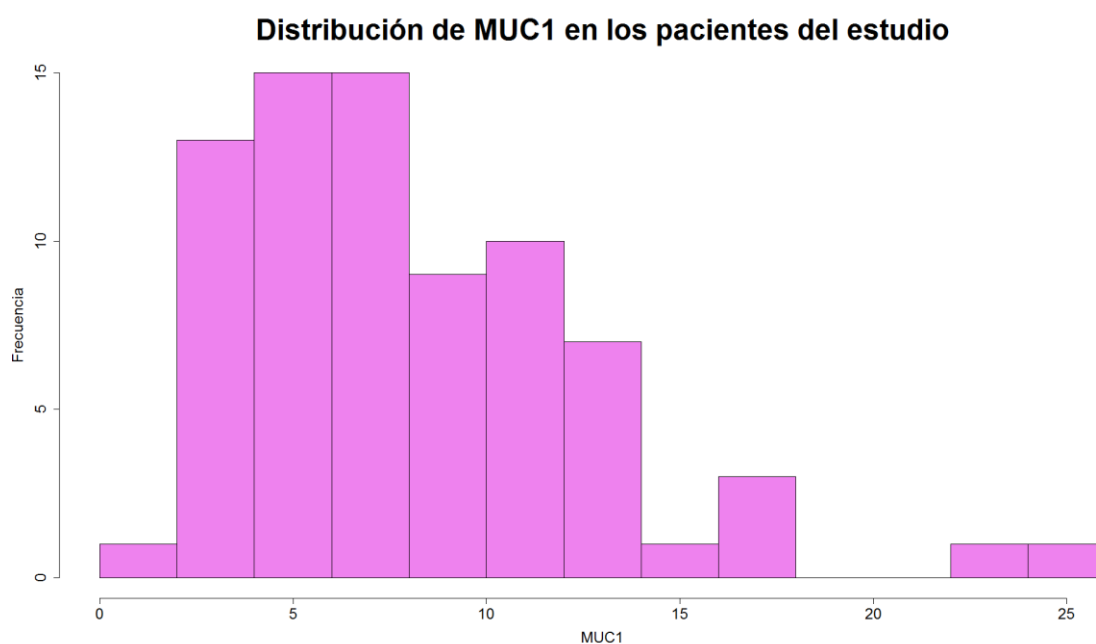


Figura 25. Distribución del valor de la MUC1 en los pacientes del estudio.

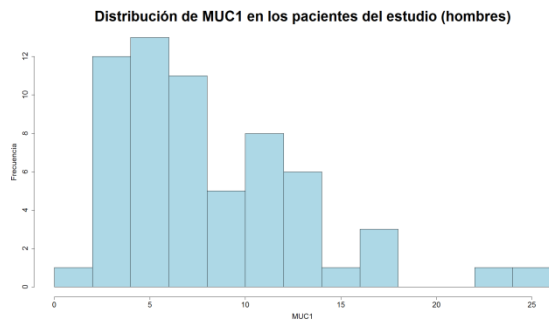


Figura 26. Distribución del valor de la MUC1 en los pacientes del estudio (hombres).

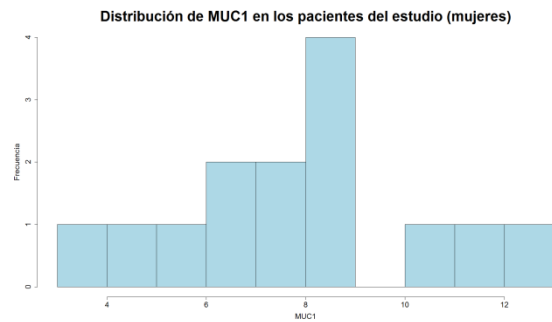


Figura 27. Distribución del valor de la MUC1 en los pacientes del estudio (mujeres).

5.1.4. HÁBITAT

Otra de las variables que se ha tenido en cuenta a la hora de realizar el estudio, es el hábitat de los pacientes, dividiéndose entre urbano y rural. Los resultados obtenidos se recogen en la figura 28 y ponen de manifiesto cómo el hábitat de estos pacientes es mayoritariamente urbano, pues 50 pacientes (65,69% del total de la muestra) provienen de dicho hábitat, frente a 25 (32,89% de la muestra) que viven en un hábitat rural, así como un único paciente del que no se dispone de información acerca de su hábitat.

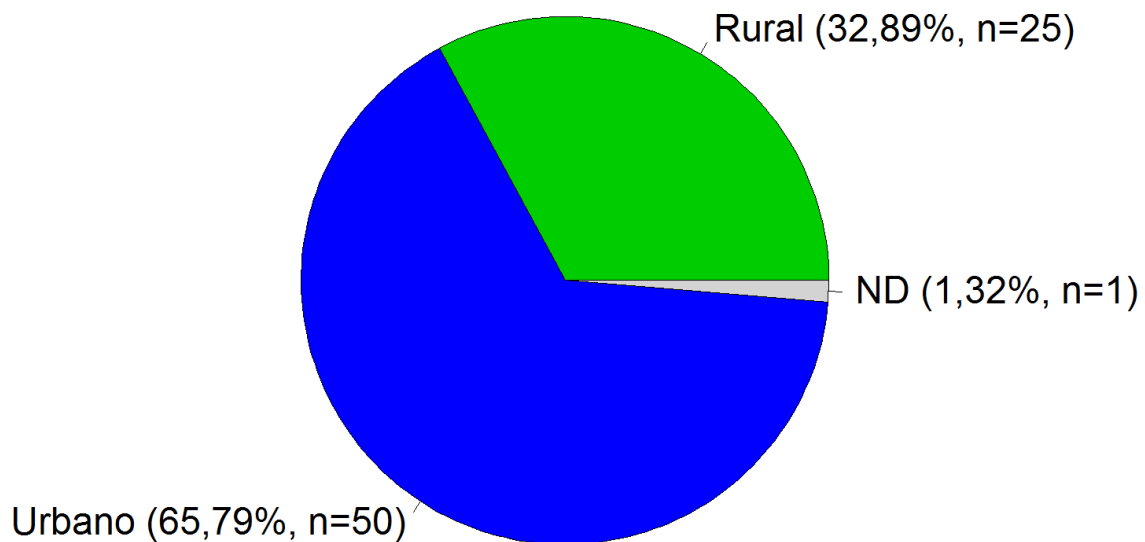


Figura 28. Hábitat de los pacientes.

5.1.5. HÁBITO TABÁQUICO

Del total de pacientes que componen la base de datos del estudio, 11 son fumadores (14,47%) mientras que 64 (84,21%) no lo son. Esta información se muestra de forma gráfica en la figura 29.

Existe un paciente sobre el que no se dispone de información relativa a su hábito tabáquico. La pregunta que les hizo la doctoranda fue si en el momento en que se hacía la entrevista eran fumadores o no.

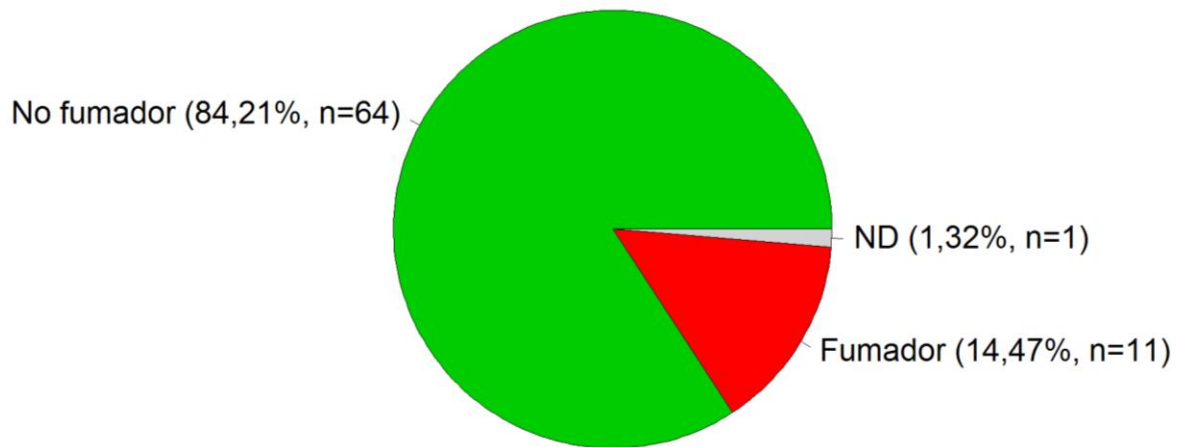


Figura 29. Hábito tabáquico.

Los once pacientes que se declararon fumadores eran varones. El número medio de paquetes año consumidos por dichos pacientes fue de 19,1982 con una desviación estándar de 9,379. El histograma que representa el consumo de paquetes de tabaco año se presenta en la figura 30.

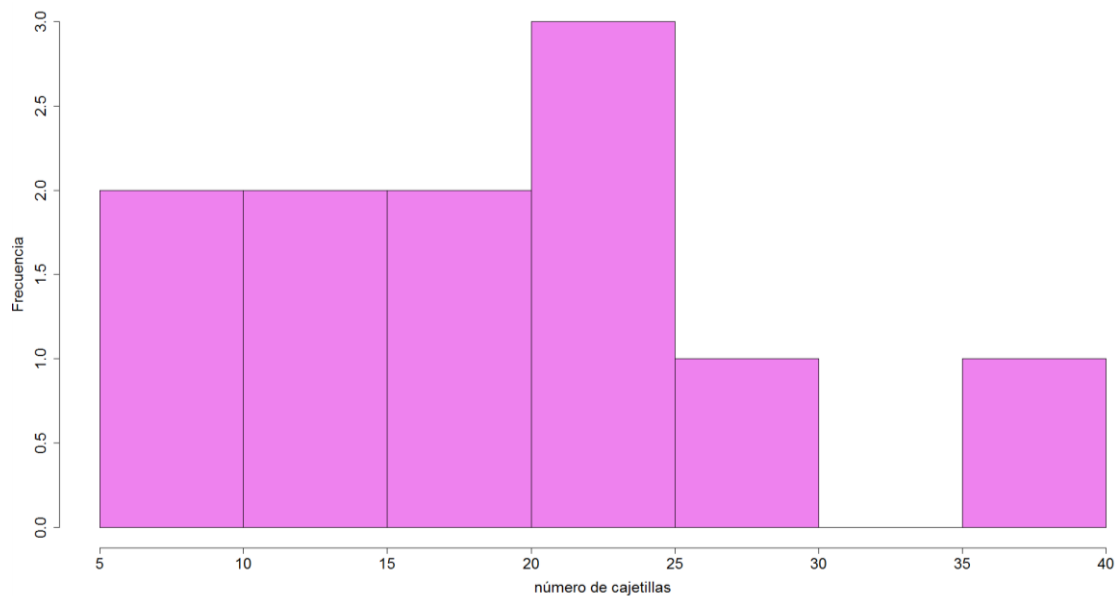


Figura 30. Número de paquetes de tabaco año consumidos por los pacientes fumadores (hombres)

5.1.6. CÁNCER PREVIO

Existen 8 pacientes en el conjunto objeto de estudio que habían sufrido un cáncer previo. La doctoranda en la entrevista preguntó por dicho antecedente y también se constató a través de la historia clínica. Dicho grupo de pacientes representa un 10,53% del total de la muestra. Sólo hay un paciente del que no se dispone de información relativa a si había padecido previamente un cáncer o no. La figura 31 resume de manera gráfica estos resultados.

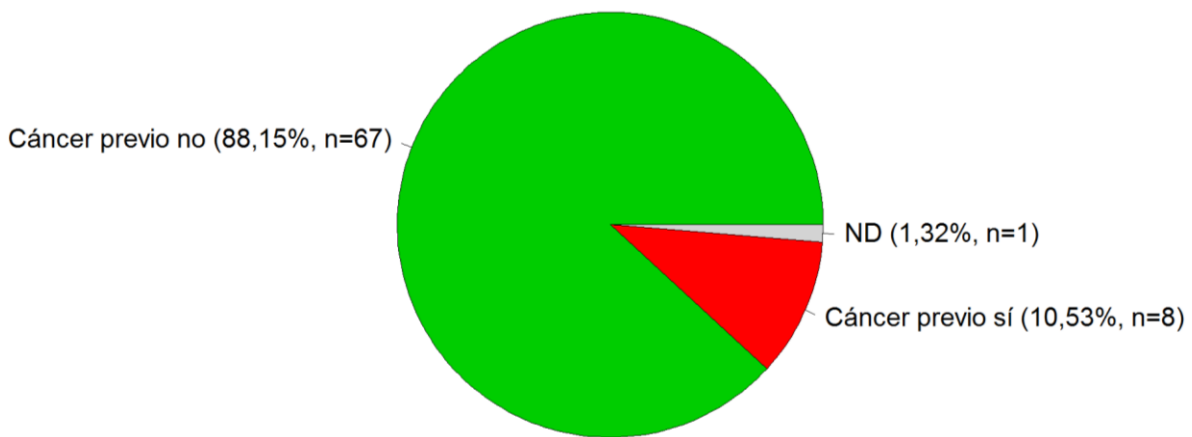


Figura 31. Cáncer previo.

5.1.7. APLICACIÓN DEL TRATAMIENTO

Finalmente, también se dispone de información relativa al número de pacientes a los que se les aplicó tratamiento médico con fármacos antidiagona molecular, erlotinib o gefitinib. Dichos pacientes fueron 66, lo que representa un 86,84% del total de la muestra. Existe un paciente del que no se tiene información acerca de si se le aplicó o no el tratamiento. El resumen gráfico de la información relativa a la aplicación de tratamiento se recoge en la figura 32.

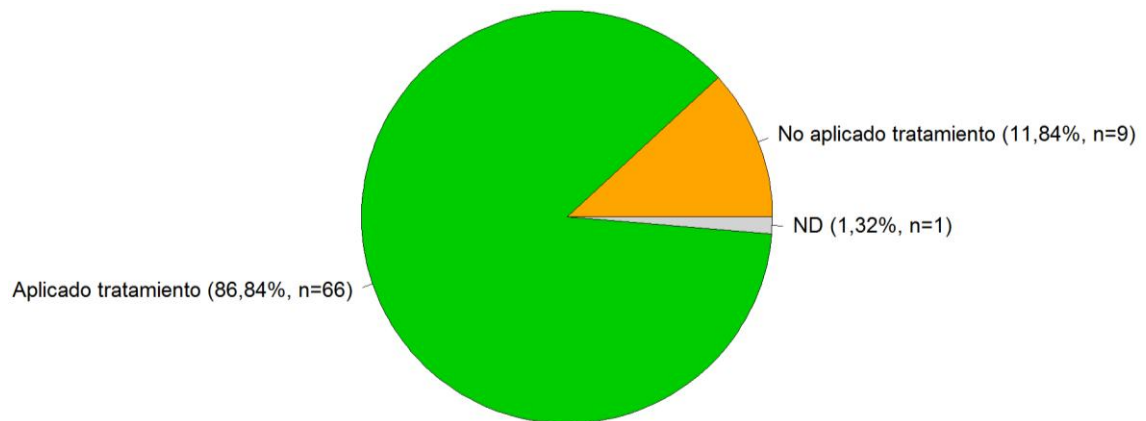


Figura 32. Aplicación de tratamiento.

5.1.8. TIEMPO DE SUPERVIVENCIA

Se dispone de información relativa al tiempo de supervivencia de un total de 75 pacientes. De éstos, 22 pacientes sobrevivieron más de 18 meses, mientras que los 53 restantes sobrevivieron una media de 7,47 meses con una distribución tal y como la que se representa en el histograma de la figura 33.

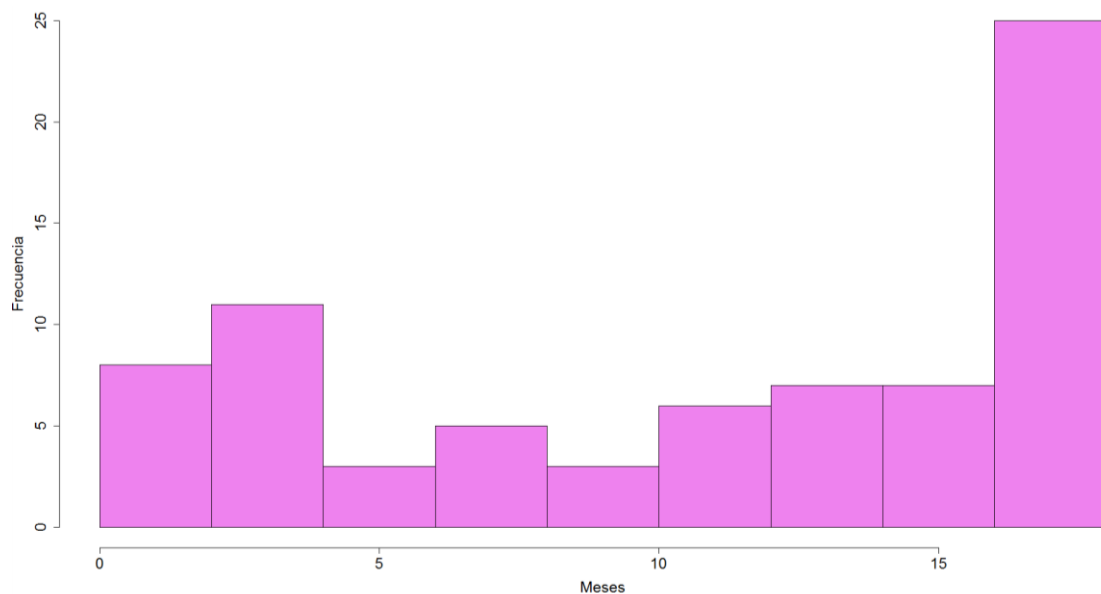


Figura 33. Distribución del tiempo de supervivencia en pacientes con supervivencia igual o inferior a 18 meses.

5.2. ANÁLISIS DE LA NORMALIDAD DE LAS VARIABLES

La figura 34 muestra los resultados de la aplicación del test de Anderson-Darling a la variable MUC1. El resultado obtenido muestra su falta de normalidad. En el caso de la variable edad, el resultado de la aplicación del test de Anderson-Darling (Fig.35) sí demuestra la normalidad de la misma. En el presente estudio se analiza la normalidad de estas dos variables junto con el tiempo de supervivencia (Fig. 36), dado que el resto son categóricas. En el caso de la variable tiempo de supervivencia, no se dispone de una medida exacta del tiempo de supervivencia de todos los pacientes, sino que de 22 de éstos sólo se sabe que sobrevivieron más de 18 meses. El test de Anderson-Darling, aplicado al resto de pacientes de la muestra, demostró la normalidad de la variable tiempo de supervivencia (), dado que la hipótesis nula de normalidad puede ser rechazada. La falta de normalidad de la variable MUC1 obligará al uso de test no paramétricos (U de Mann-Whitney) a la hora de buscar diferencias entre grupos, en lugar de su alternativa paramétrica (ANOVA).

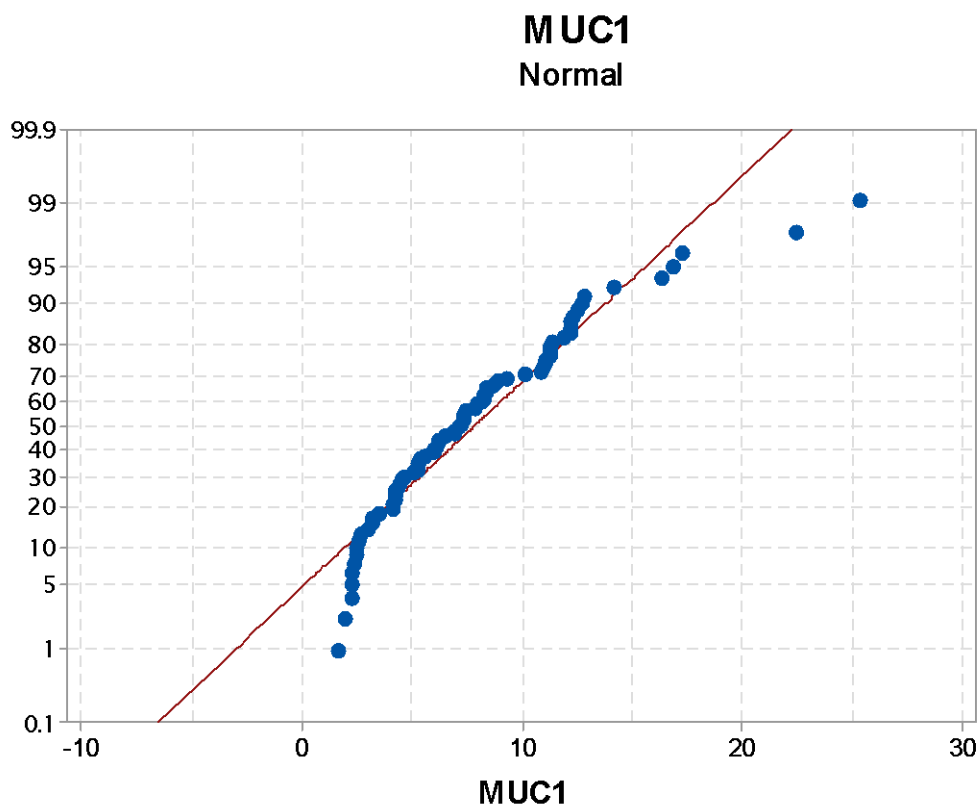


Figura 34. Estudio de la normalidad de la variable MUC1 a través del test de Anderson-Darling.

Edad Normal

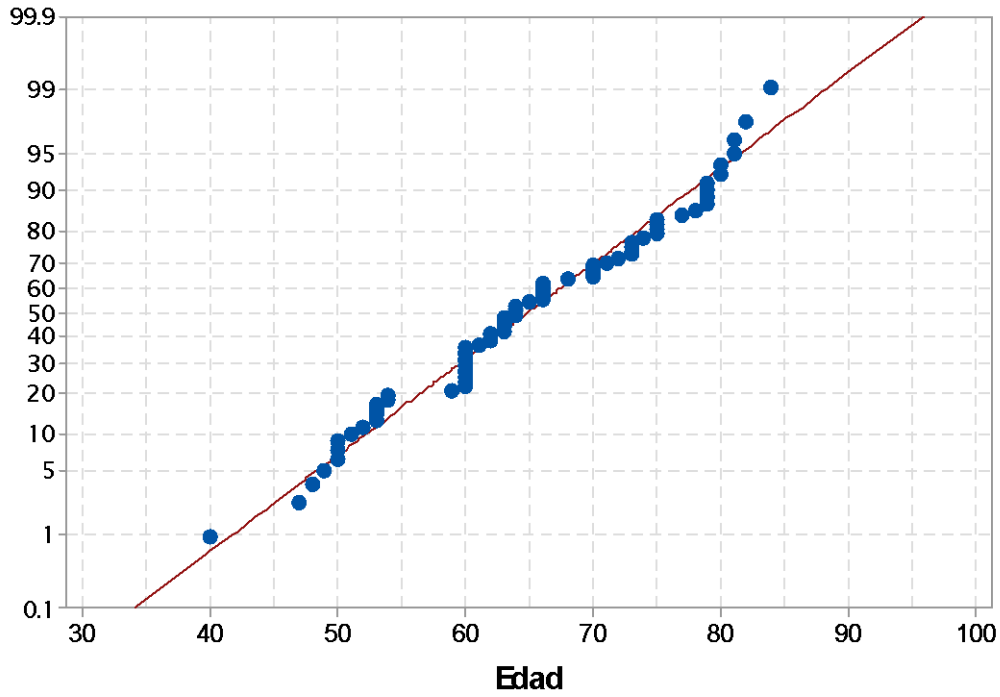


Figura 35. Estudio de la normalidad de la variable edad a través del test de Anderson-Darling.

Tiempo de supervivencia Normal

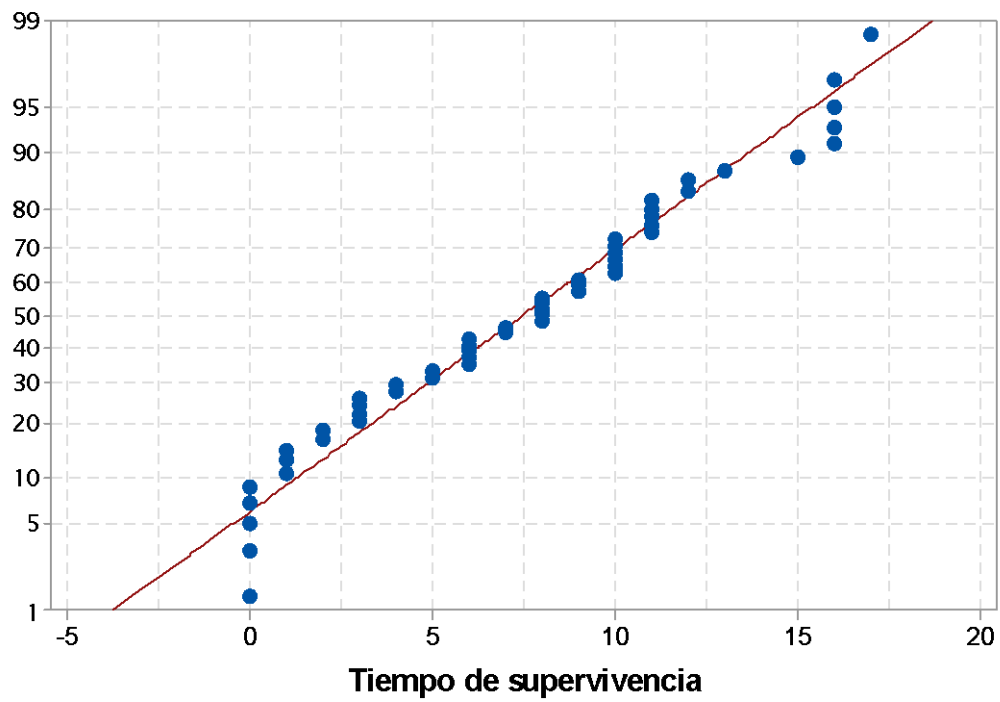


Figura 36. Estudio de la normalidad de la variable tiempo de supervivencia a través del test de Anderson-Darling.

5.3. ESTADÍSTICA INFERENCIAL

5.3.1. GLICOPROTEÍNA MUC1

En el presente apartado se analiza el valor de la glicoproteína MUC1 frente al resto de variables del estudio.

En primer lugar, se analizó la correlación existente entre el valor de la glicoproteína MUC1 y la **edad** de los pacientes. La aplicación del coeficiente de correlación de Pearson demostró la **no existencia de un valor de correlación significativo** entre ambas variables (). El resultado de dicho coeficiente de correlación se complementó con el cálculo de un modelo de regresión lineal (Fig. 37) el cual, a la vista del valor de R^2 (0.001) obtenido, no resulta significativo, es decir, el valor de MUC1 no se correlaciona con la edad.

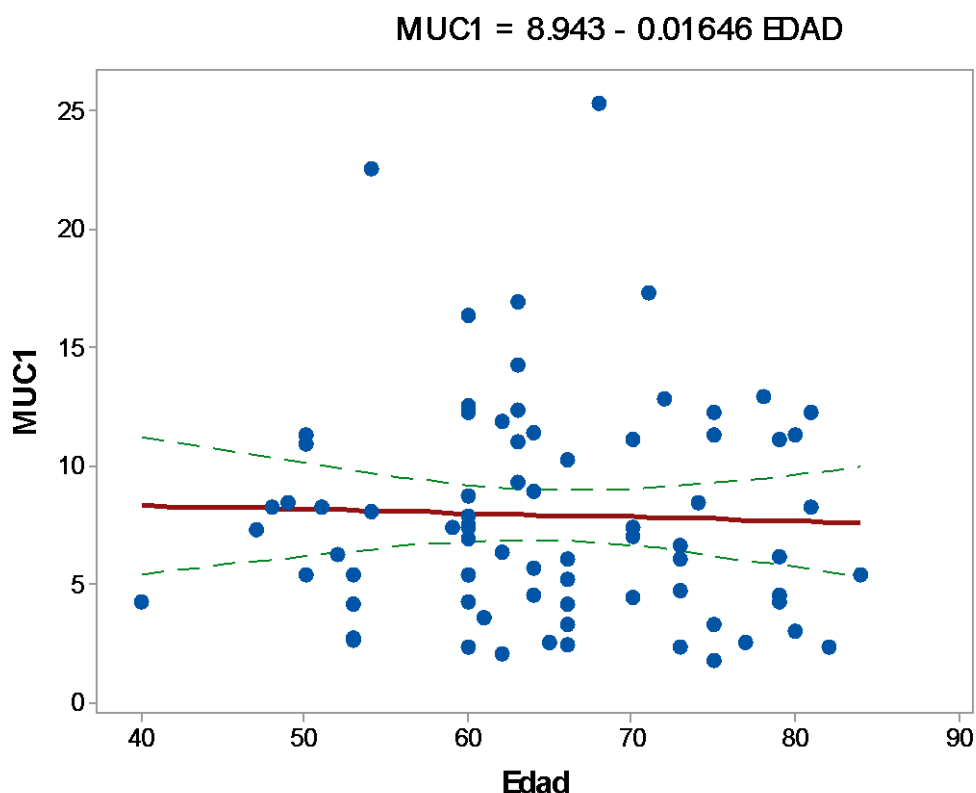


Figura 37. Modelo de regresión de MUC1 frente a la edad de los pacientes.

Con el fin de conocer la influencia sobre la variable MUC1 de las variables **sexo, hábitat, tabaco y cáncer previo**, buscando diferencias significativas en los valores de la mediana entre grupos, se utilizó el test U de Mann-Whitney. Los resultados obtenidos **tampoco** permiten afirmar que existan **diferencias estadísticamente significativas** en el valor de MUC1 en los grupos creados al considerar alguna de estas variables. Es decir, que no se aprecian diferencias en los valores de dichas variables en función de la pertenencia a un grupo u otro, considerando hombres frente a mujeres ($p=0.583$), hábitat rural frente a urbano ($p=0.114$), no fumadores frente a fumadores ($p=0.365$) y pacientes que tuvieron un cáncer previo frente a los que no lo tuvieron ($p=0.637$).

El test U de Mann-Whitney también se empleó con el fin de saber si existían diferencias en el valor de la glicoproteína MUC1 entre los **pacientes a los que se les aplicó tratamiento y los que no lo recibieron**. El resultado obtenido permite afirmar que **no existen diferencias estadísticamente significativas** en el valor de la mediana entre ambos grupos. Es decir, que no se aprecian diferencias en los valores de MUC1 en función de si los pacientes considerados fueron a los que se les aplicó el tratamiento o aquéllos a los que no se les aplicó ($p=0.832$).

Finalmente, se calculó el coeficiente de correlación entre el valor de la glicoproteína MUC1 y el tiempo de supervivencia de los pacientes. En el caso de los pacientes que sobrevivieron más de 18 meses y con el único objetivo de disponer de un dato numérico, se consideró que la supervivencia había sido exactamente de 18 meses.

El cálculo del coeficiente de correlación de Pearson arrojó un valor significativo (). El modelo de regresión lineal calculado (Fig. 38), presentó un R^2 del 27% y mostró que a **mayor valor de la glicoproteína MUC1, mayor tiempo de supervivencia**.

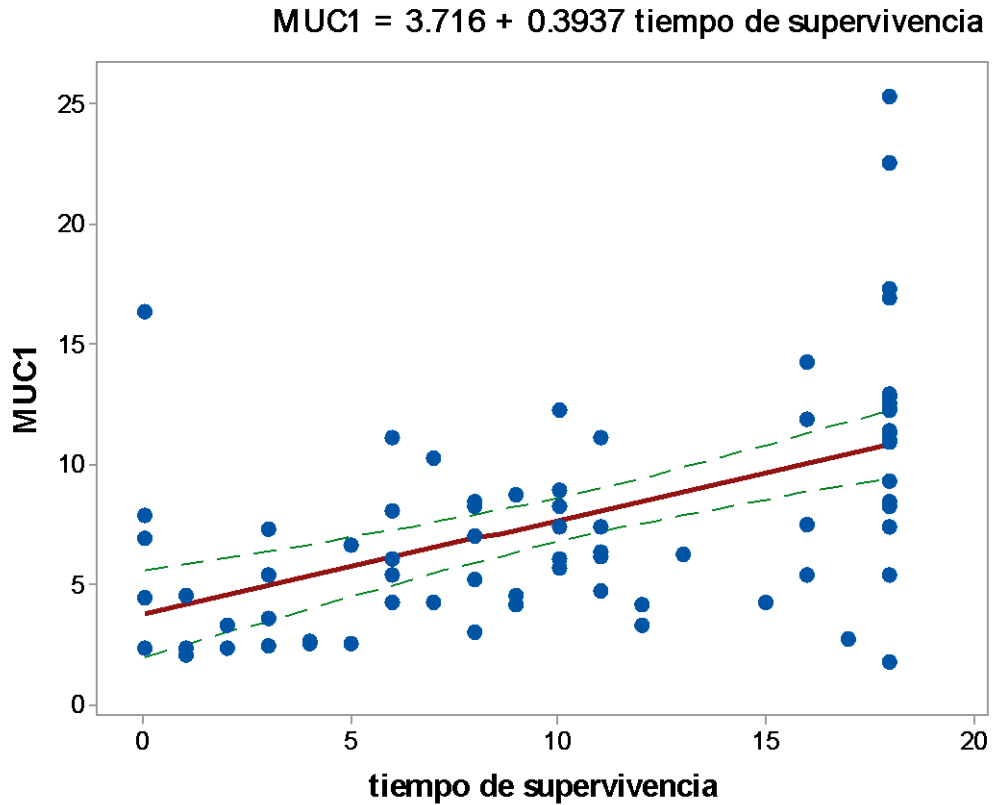


Figura 38. Modelo de regresión de MUC1 frente a la edad de los pacientes.

5.3.2. TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES

En este apartado se estudia el tiempo de supervivencia de los pacientes de la muestra en función de las distintas variables disponibles en el estudio. Para ello, se calculan las curvas de Kaplan-Meier de distintos grupos.

En primer lugar, la figura 39 muestra la función de supervivencia estimada de los pacientes divididos según su **sexo**. De la observación de dicha figura, se puede afirmar que **no existen diferencias en el tiempo de supervivencia entre hombres y mujeres**.

Esta apreciación se confirma a través del resultado del test log-rank que se muestra en la Tabla 9, el cual no aprecia diferencias estadísticamente significativas entre grupos

. Es decir, no se puede afirmar que el tiempo de supervivencia de un grupo sea superior al del otro.

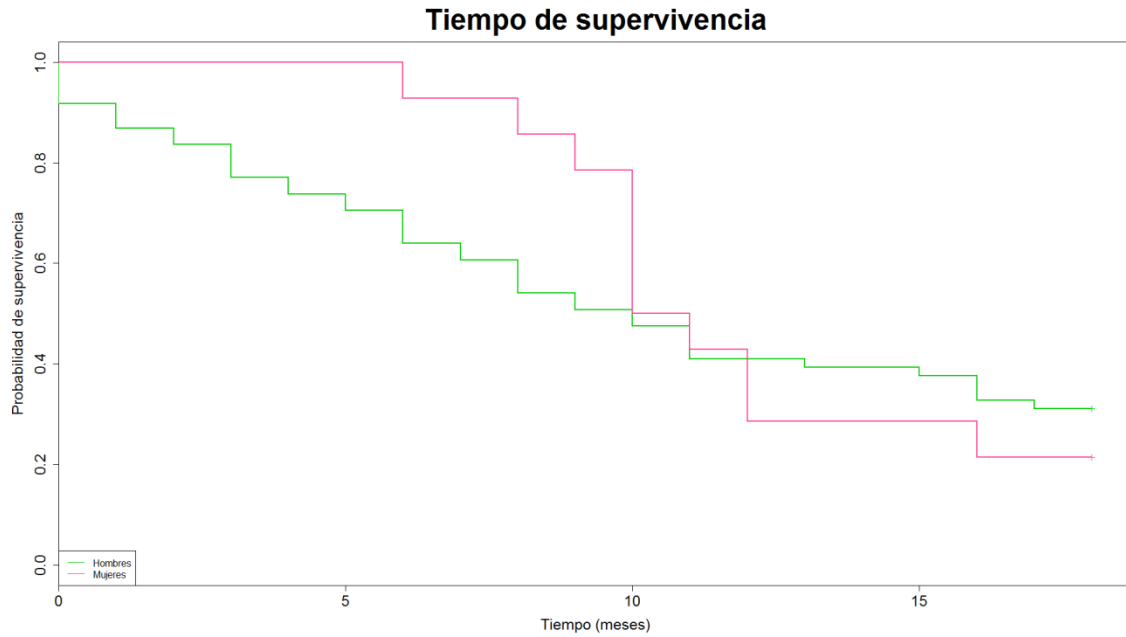


Figura 39. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos según su sexo.

La curva de supervivencia correspondiente a los pacientes que viven en **hábitat urbano** frente a los que viven en **hábitat rural** que se muestra en la figura 40. Se trata de dos curvas próximas y prácticamente paralelas en todo el intervalo temporal considerado. En este caso la aplicación del test de log-rank (Tabla 10) **tampoco encuentra diferencias estadísticamente significativas entre grupos** . Es decir, tampoco, se puede afirmar que el tiempo de supervivencia de un grupo sea superior al del otro.

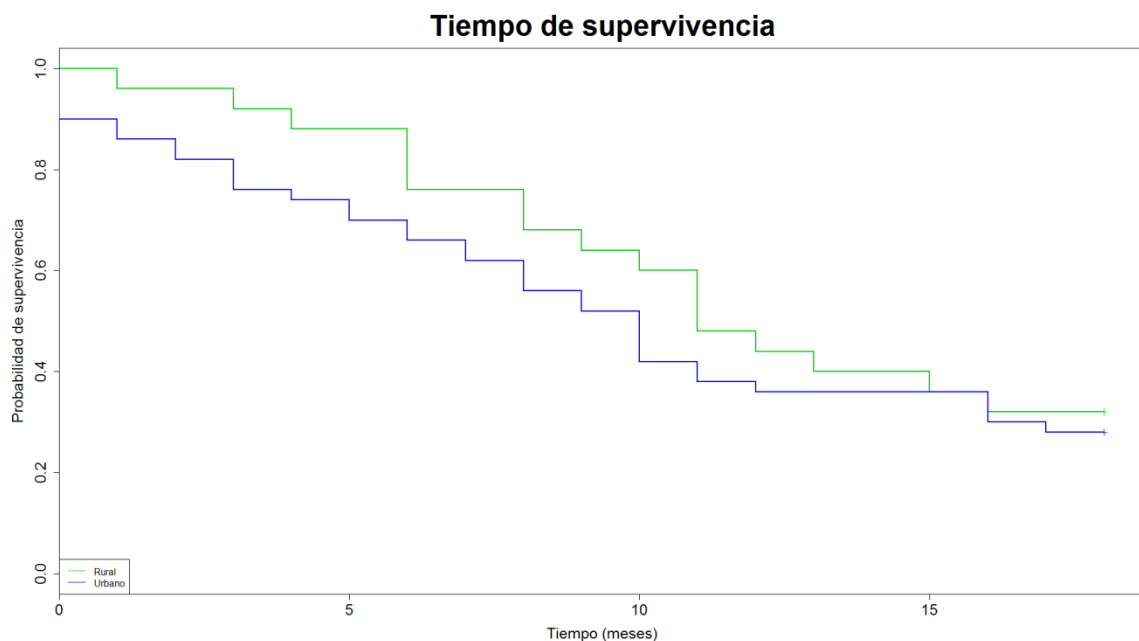


Figura 40. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos según su hábitat.

De forma análoga a las variables anteriores, la figura 41 muestra la curva de supervivencia de los **pacientes fumadores y no fumadores**.

Se observa cómo **el tiempo de supervivencia de ambas categorías de pacientes es muy similar**. El test de log-rank no encuentra diferencias estadísticamente significativas entre grupos

La representación del tiempo de supervivencia de los pacientes en función de si éstos **padecieron o no un cáncer previo** (Fig. 42), muestra dos curvas que no se intersectan y en la que el tiempo medio de supervivencia de **los pacientes que habían padecido con anterioridad un cáncer es inferior al de aquellos que no lo habían padecido**. A pesar de esto, el test de log-rank no aprecia diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en el tiempo de supervivencia. Por lo tanto, desde un punto de vista estadístico, no es posible afirmar que los pacientes de un grupo sobrevivan más o menos tiempo que los de otro.

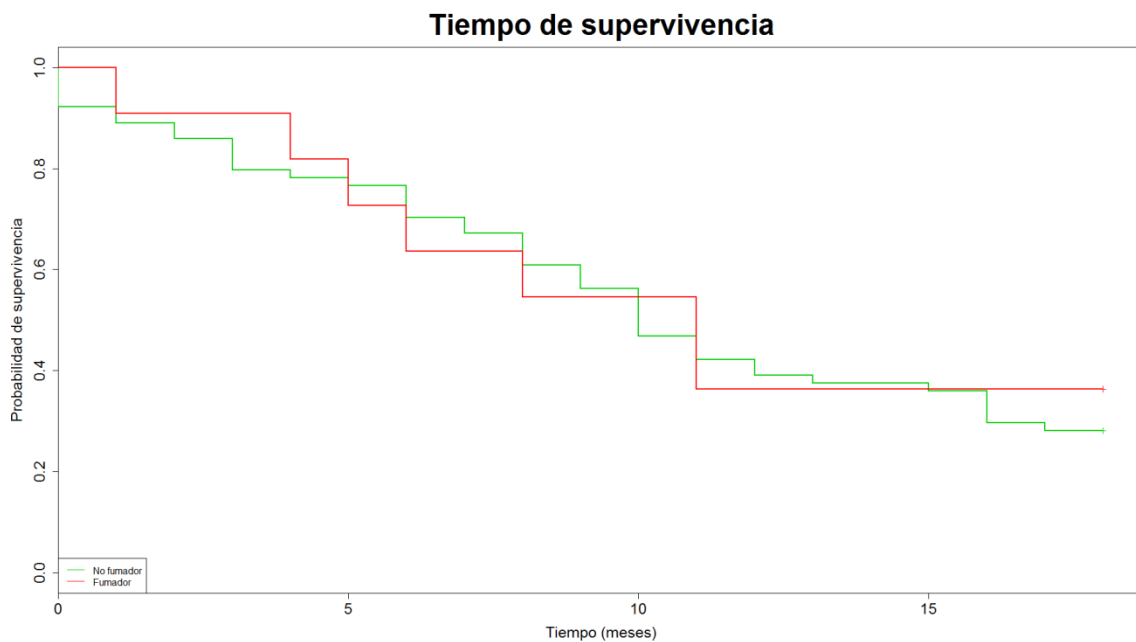


Figura 41. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos en fumadores y no fumadores.

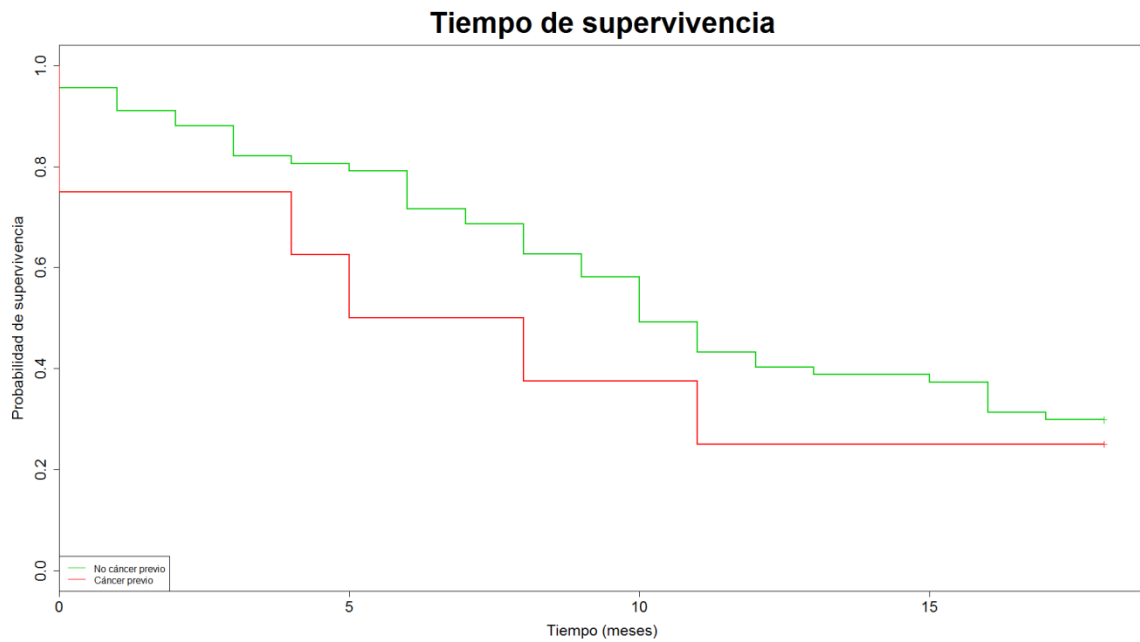


Figura 42. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos en función de si tuvieron un cáncer previo o no.

Finalmente, este apartado se completa con la figura 43 en la que se muestra las curvas correspondientes a la función de supervivencia estimada de los **pacientes tratados frente a los que no siguieron el tratamiento**. En el caso de estos dos grupos, el resultado del test de log-rank permite afirmar que existe una **diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de supervivencia de ambos grupos**, siendo éste **favorable a los pacientes que fueron sometidos a tratamiento**. Es decir, los pacientes tratados presentan un tiempo de supervivencia superior.

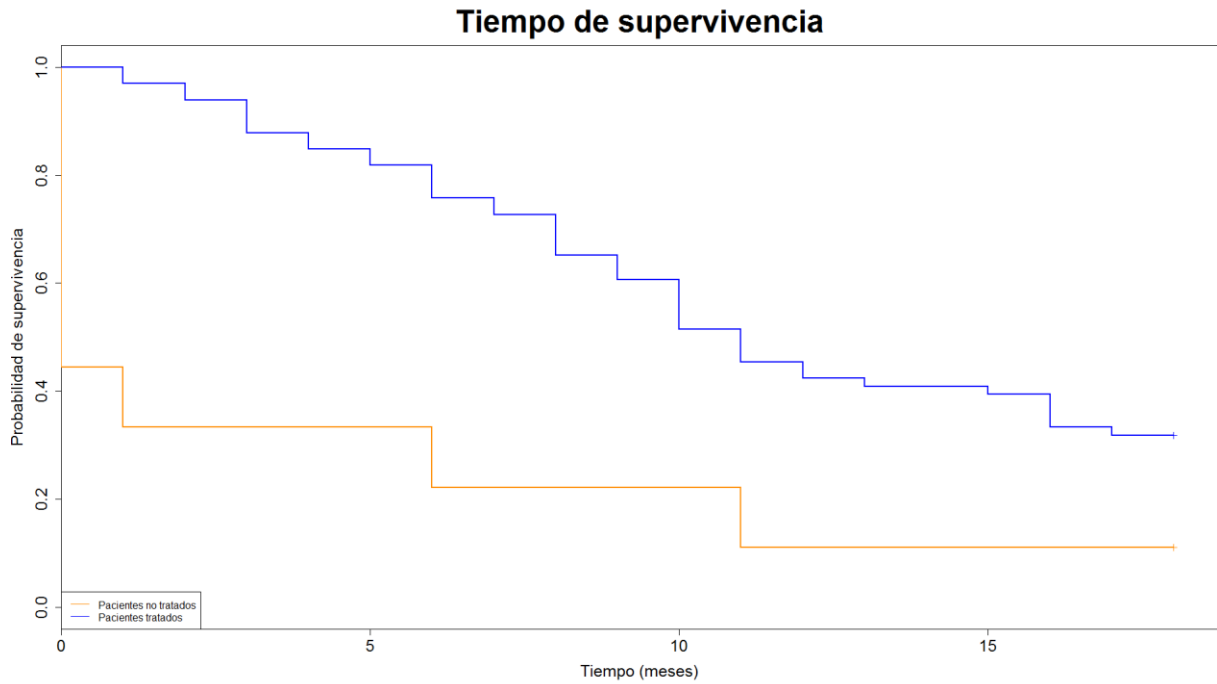


Figura 43. Función de supervivencia estimada de los pacientes tratados frente a los no que no fueron sometidos a tratamiento.

5.3.3. MODELO DE REGRESIÓN DE COX O MODELO DE RIESGOS PROPORCIONALES

En el presente apartado se ha utilizado un modelo de regresión de Cox, también llamado modelo de riesgos proporcionales, con el fin de valorar simultáneamente el efecto independiente de las variables del estudio sobre la supervivencia.

La representación gráfica del modelo obtenido se muestra en la figura 44. Dicho modelo se ha representado con su intervalo de confianza al 95%. El modelo de regresión de Cox permite también predecir el tiempo de supervivencia de un determinado individuo a partir del patrón de valores que presenta en sus variables pronósticas. Los resultados del modelo se muestran en la Tabla 9.

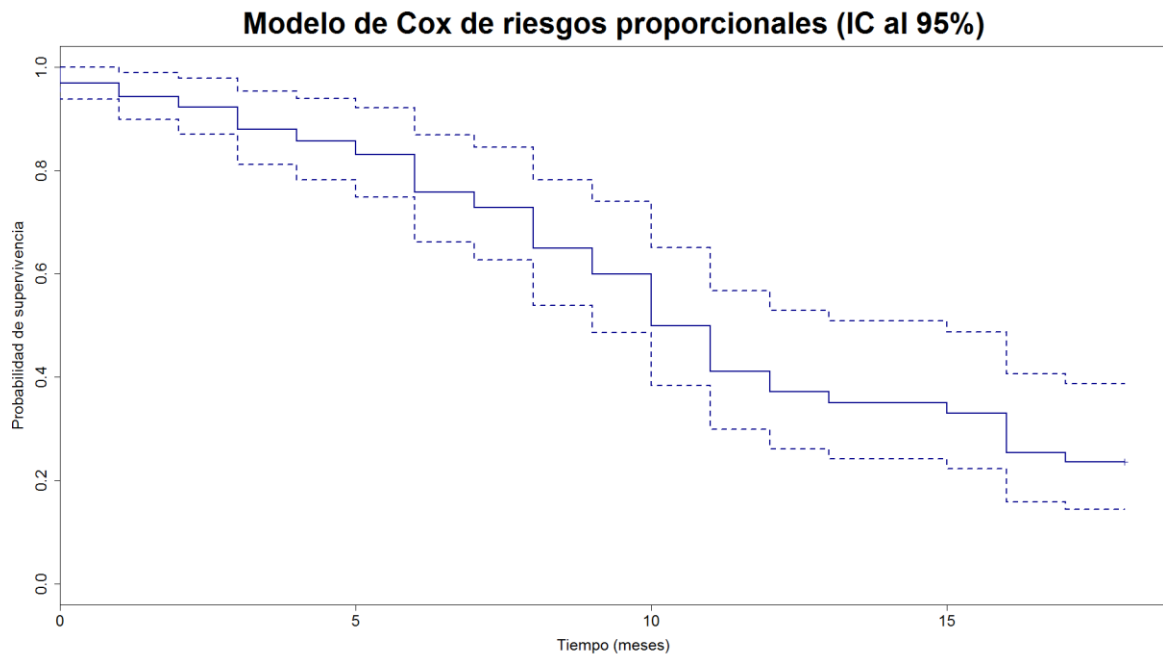


Figura 44. Modelo de Cox de riesgos proporcionales con intervalo de confianza al 95%.

La interpretación de los coeficientes de la regresión de Cox (Tabla 7) obtenidos para el tiempo de supervivencia de los pacientes del estudio, permite afirmar que **no existe diferencia en el riesgo en función del sexo del paciente**, dado que aunque la tasa de riesgo que se obtiene para los hombres es de 1,210965, esta variable no resulta significativa y además el IC al 95% de dicha tasa incluye el 1.

En relación a la glicoproteína MUC1, para el presente modelo se ha utilizado el valor 10 como punto de corte. Es decir, se han dividido los pacientes en dos grupos: aquellos que presentan un valor de MUC1 igual o inferior a 10 y aquellos que presentan un valor superior.

Esta variable MUC1 recodificada, **resulta significativa** y **presenta una tasa de riesgo de 0,097280, favorable a los pacientes con valores de MUC1 por encima de 10.**

El valor de la variable **edad no resulta significativo** para un nivel α del 5% y además su IC al 95% incluye el 1.

La variable **hábitat sí resulta significativa** y atribuye una tasa de riesgo de 2,135492 a los pacientes que viven en áreas urbanas frente a los que viven en áreas rurales.

Aquellos pacientes que padecieron un **cáncer previo muestran un riesgo relativo que es 2,918177 veces superior a la de los que no lo padecieron**, mientras

que la variable que mide el **número de paquetes al año por los pacientes fumadores no resulta significativa.**

Finalmente, la **variable tratamiento demuestra que la tasa de riesgo de fallecimiento de los pacientes tratados frente a los no tratados se reduce a 0,219383**

	Coficiente	Desv. estándar	Tasa de riesgo	IC 95%	p
Sexo (hombre)	0,191417	0,377922	1,210965	(0.5773555, 2.5399176)	0,612507
MUC1 (>10)	-2,330158	0,450829	0,097280	(0.0402049, 0.2353809)	2,36 10 ⁻⁷
Edad (años)	0,027861	0,0155532	1,028253	(0.9974226, 1.0600369)	0,072844
Hábitat (urbano)	0,758697	0,333030	2,135492	(1.111788, 4.101794)	0,022717
Cáncer previo (sí)	1,070959	0,494877	2,918177	(1.106296, 7.697538)	0,030457
Paquetes tabaco año	-0.007887	0.021023	0.992144	(0.9520951, 1.0338782)	0.707549
Tratado (sí)	-1.516934	0.433159	0.219383	(0.0938638, 0.5127541)	0.000462

Tabla 9. Resultados del modelo de regresión de Cox.

El valor de concordancia de este modelo es de 0,774 con una desviación estándar de 0.045. Nótese que en un modelo de Cox la concordancia se define como la probabilidad de coincidencia entre dos observaciones cualesquiera elegidas al azar, que en el caso de existir concordancia deben cumplir que la observación con el tiempo de vida más corto de las dos, sea definida por el modelo de Cox como la que presenta el riesgo más alto. El valor de R² obtenido por el modelo fue de 0,478. El nivel de significación del modelo fue confirmado por los valores p obtenidos en los test de razón de verosimilitud

, Wald y log-rank . El encontrar estos niveles de significación en el modelo permite afirmar que éste se ajusta a los datos que pretende modelizar.

5.3.4. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA A LOS 18 MESES A TRAVÉS DE UN MODELO DISCRIMINANTE

En este apartado se presenta un modelo discriminante desarrollado teniendo como variable de salida la supervivencia a los 18 meses (sí/no) de los pacientes objeto de estudio.

La Tabla 8 muestra el modelo de análisis discriminante, siendo los coeficientes de la función lineal discriminante la columna denominada **Diferencia**.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que las variables de mayor importancia desde el punto de vista de supervivencia a los 18 meses son el **haber recibido el tratamiento, no haber padecido cáncer previamente, valor más alto de MUC1 y el hábitat del paciente**. En este estudio vivir en un entorno urbano o el haber padecido un cáncer previamente resultó negativo para supervivencia mientras que el tratamiento para el cáncer de pulmón incrementa la supervivencia de los pacientes.

Este modelo fue calculado utilizando validación cruzada. Los resultados obtenidos muestran un coeficiente Kappa de 0,548. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 81,13% y 77,27%, mientras que el valor predictivo positivo fue del 89,59% y el valor predictivo negativo del 62,96%.

	Sobrevive	No sobrevive	Diferencia
Constante	-31.232	-26.815	4.417
Sexo (hombre)	-0.789	-1.470	-0.681
MUC1	0.864	0.409	-0.455
Edad	0.669	0.660	-0.009
Hábitat (urbano)	2.320	1.369	-0.951
Paquetes tabaco año	-0.001	0.025	0.026
Cáncer previo (sí)	2.413	1.530	-0.883
Tratado (sí)	8.222	9.265	1.043

Tabla 10. Modelo de análisis discriminante. Coeficientes de la función lineal discriminante.

6. DISCUSIÓN

De acuerdo con los datos obtenidos en este análisis y teniendo en cuenta las limitaciones propias de un estudio de esta naturaleza, se han obtenido los siguientes hallazgos en concordancia con la hipótesis inicial y los objetivos a conseguir:

- Los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón subseleccionados basalmente por el dato molecular de presencia de mutación de EGFR, si además expresaban MUC1, presentan una supervivencia directamente proporcional al valor de dicho marcador. De este modo, **a mayor valor de MUC1, mayor tiempo de supervivencia** lo cual confirma nuestra hipótesis del valor pronóstico de esta glicoproteína.
- El **valor pronóstico de MUC1** no se ve influenciado por los otros aspectos analizados que incluyeron el sexo, la edad, el hábito de fumar, el hábitat, el haber tenido un cáncer previo ni por el tratamiento.
- Los **factores de riesgo significativos para mortalidad** de los pacientes fueron:
 - el valor de MUC1, con mayor riesgo para los valores de MUC1 inferiores a 10 U/ ml
 - hábitat, con mayor riesgo para los pacientes de hábitat urbano
 - haber padecido un cáncer previo.
- El tiempo de supervivencia de los pacientes se incrementa considerablemente en caso de que se aplique tratamiento médico e independientemente del valor de MUC1.
- Finalmente, en el caso de la supervivencia a 18 meses, **las variables más determinantes para lograr alcanzar al menos 18 meses de supervivencia** son:
 - mayor valor de MUC1
 - vivir en hábitat rural
 - no haber padecido un cáncer previo
 - el haber recibido tratamiento.

Los **datos basales de este grupo de pacientes** son similares a otros publicados en la literatura⁵³

En ellos se muestra un porcentaje de mujeres menor que el de hombres (18,43%) y una mediana de edad de casi 65 años siendo más jóvenes las mujeres que los hombres. Los varones por su parte tenían valores más altos de MUC1 y una mayor dispersión del valor de esta glucoproteína.

Un dato discordante respecto a otras publicaciones es el porcentaje, 14,47%, de fumadores activos que en otras suele ser mucho más alto, entre el 80 y 90%⁵⁴ y que fue incluso inferior en mujeres. Esto se debe muy probablemente a que nuestra muestra sólo incluye adenocarcinomas con mutación de EGFR que son más frecuentes en pacientes no fumadores⁵⁵

En cuanto al hábitat, urbano o rural, y los antecedentes de otro cáncer previo no existen apenas datos publicados que describan su valor pronóstico. En este estudio, la mayoría de pacientes corresponden al entorno urbano mostrando dicha variable una influencia estadísticamente significativa en el pronóstico (peor pronóstico vivir en hábitat urbano).

En la actualidad, la mayor disponibilidad de fármacos, activos y bien tolerados, está aumentando el número de pacientes que reciben tratamiento con quimioterapia o con agentes antidiaria que en este grupo alcanzó el 86,84%.

Varios estudios prospectivos y aleatorizados fase III han comparado la quimioterapia de primera línea frente a ITK en pacientes con **CPCNP avanzado con mutación EGFR**, han demostrado el beneficio de estos agentes antidiaria al obtener una mayor tasa de respuesta (hasta un 70%) y de supervivencia libre de progresión (SLP) (9-15 meses). Estos estudios se han realizado con dos ITK reversibles, **gefinitib** y **erlotinib** y uno irreversible, **afatinib**. Por dicho motivo, estos tres inhibidores tienen indicación en la actualidad para el tratamiento de pacientes con CPCNP en estadios III-IV que presentan mutaciones de EGFR+.

En la tabla 9 se muestran los resultados de SLP de los estudios fase III que compararon la eficacia de fármacos antiEGFR frente a quimioterapia en pacientes con cáncer de pulmón EGFR mutados⁵⁶:

AUTOR	ESTUDIO	AÑO	PACIENTES	ANTI EGFR	SLP (meses)
Mok	IPASS	2009	132 asiáticos	GEFITINIB	9.8
Mitsudomi	WJTOG	2010	86 japoneses	GEFITINIB	9.2
Maemondo	NEJ002	2010	114 japoneses	GEFITINIB	10.8
Zhou	OPTIMAL	2011	154 chinos	ERLOTINIB	13.7
Rosell	EURTAC	2012	135	ERLOTINIB	9.7
Sequist*	LUX-Lung3	2013	345	AFATINIB	11.1

Wu**	LUX-Lung6	2013	364	AFATINIB	11
Estudio de tesis doctoral		2015	54 asturianos ^a	GEFITINIB- ERLOTINIB	SG: 7.5 ^a

Tabla 11. Resultados de los estudios. a: subgrupo que falleció antes de 18 meses. SG: supervivencia global.

* 57

** 58

Dos ensayos clínicos fase III han confirmado la mayor actividad de **crizotinib** sobre el tratamiento quimioterápico cisplatino y pemetrexed en segunda línea (estudio PROFILE 1007)⁵⁹ y primera línea (estudio PROFILE 1014)⁶⁰ en pacientes con CPCNP y reordenamiento de ALK, subgrupo en el que está aprobado su utilización. Otros agentes como **ceritinib** o **alectinib** también actúan sobre la misma diana y están aprobados en pacientes con progresión o intolerancia a crizotinib.

Dos nuevos fármacos se están ensayando en cáncer de pulmón especialmente en aquellos que muestran niveles altos de MUC1. **Tecemotide** tiene un estudio fase III negativo en su objetivo primario mientras que el estudio fase IIB-III con **TG4010** todavía está en marcha.

Tecemotide es un agente inmunoterápico, antígeno frente a MUC1, que en el estudio fase III START no alcanzó su objetivo primario pero si mostró un incremento notable en supervivencia frente a placebo, 25.8 meses versus 22.4 meses (HR 0.89, CI 95% 0.77-1.03, p= 0.111), respectivamente. Un análisis exploratorio en el subgrupo predefinido de pacientes tratados concurrentemente con quimiorradioterapia reveló una supervivencia clínicamente relevante de pacientes tratados con tecemotide frente a aquellos con placebo (29.4 versus 20.8 meses; HR 0.81, IC 95% 0.68-0.98, p= 0.026). Niveles más altos de MUC1 parecen correlacionarse con un beneficio en supervivencia con tecemotide (p= 0.0085) y por tanto, MUC1 podría utilizarse como biomarcador para seleccionar los pacientes que se benefician de este fármaco⁶¹

TG4010 es un agente inmunológico basado en un poxvirus que asocia el antígeno frente a MUC1 y la interleucina 2. El estudio fase IIB en combinación con quimioterapia, cisplatino y gemcitabina, sugirió un valor aditivo del fármaco con una toxicidad tolerable por lo que está en marcha un estudio fase III confirmatorio⁶².

En relación con la supervivencia de nuestros pacientes, todos ellos con un cáncer de estirpe adenocarcinoma y mutación de EGFR, la mediana para los fallecidos en el intervalo de 18 meses fue de 7.5 meses. Esta supervivencia que está por debajo de la descrita en estadios IV de adenocarcinoma podría deberse a que excluye la de los 22 pacientes (28.94%) con mejor pronóstico, es decir, vivos a los 18 meses.

En cuanto a los resultados de los distintos **test estadísticos**, el de Anderson-Darling aplicado a la variable MUC1 y a las otras dos variables no categóricas, edad y tiempo de supervivencia, muestra una falta de normalidad únicamente para MUC1. La falta de normalidad de la variable obligó al uso del test no paramétricos U de Mann-Whitney.

En el **análisis de la correlación del valor de la glicoproteína MUC1 frente al resto de variables del estudio** utilizando el coeficiente de Pearson no se demostró dicha correlación con las variables, edad ($p= 0.76$), sexo ($p= 0.58$), hábitat ($p= 0.11$), consumo de tabaco ($p= 0.36$), existencia de cáncer previo ($p= 0.64$), tratamiento con quimioterapia o fármacos antidiaria ($p= 0.83$) Sin embargo, el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson arrojó un valor significativo () y el modelo de regresión lineal mostró que a mayor valor de la glicoproteína MUC1, mayor tiempo de supervivencia.

En el **análisis del tiempo de supervivencia de los pacientes de la muestra en función de las distintas variables** disponibles en el estudio, se calcularon las curvas de Kaplan-Meier y el test de long Rank. Estos mostraron resultados muy similares entre ambas categorías: varón y hembra ($p= 0.86$), hábitat urbano o rural ($p= 0.43$) y entre fumadores y no fumadores ($p= 0.74$) mientras que hubo diferencias a favor de quienes recibieron tratamiento frente a los que no ($p=0.0009$).

Las curvas Kaplan Meier de tiempo de supervivencia muestran una mediana inferior para quienes padecieron un cáncer previo, 4.31 meses, frente a quienes no lo habían padecido, 48,67 meses. A pesar de esto, el test de log-rank no aprecia diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($p= 0.38$).

El grupo de pacientes que previamente habían padecido un cáncer es bastante más pequeño (8 pacientes) que el de aquellos que no lo habían padecido. Este podría ser uno de los motivos que explica estos resultados que aunque claramente distintos según las curvas Kaplan Meier no alcanzan la significación estadística.

En el **modelo multivariante de regresión de Cox** se encontraron dos variables correlacionadas con menor supervivencia, hábitat urbano y cáncer previo y otras dos fuertemente relacionadas con mayor supervivencia, MUC1 y el tratamiento:

- **MUC1 (>10):** HR= 0,097 (IC95%, 0.04-0.24), p= $2,36 \times 10^{-7}$
- **Hábitat (urbano):** HR= 2,14 (IC95%, 1.11-4.10), p= 0,023
- **Cáncer previo (sí):** HR= 2,92 (IC95%, 1.11- 7.70), p= 0,030
- **Tratado (sí):** HR= 0.22 (IC95%, 0.09- 0.51), p< 0.001

El nivel de significación del modelo parece robusto dado que fue confirmado por los valores p obtenidos en los test de razón de verosimilitud, Wald y log-rank.

Los resultados obtenidos con un **modelo discriminante** permiten afirmar que las variables de mayor importancia desde el punto de vista de supervivencia a los 18 meses son el haber recibido el tratamiento, no haber padecido cáncer previamente y el hábitat rural.

Este **modelo aplicado a cada paciente utilizando una validación cruzada** muestra una precisión global de clasificación del 80% con un coeficiente Kappa de 0,548, una sensibilidad y especificidad del 81,13% y 77,27%, con un valor predictivo positivo y negativo del 89,59% y 62,96%, respectivamente.

Estudios previos en cáncer de pulmón que evaluaron el **valor pronóstico de MUC1** han arrojado resultados y datos contradictorios lo mismo ocurre con otras mucinas de la misma familia como MUC4.⁶³ Así Hirasawa y col. lo consideran factor pronóstico asociado con mayor supervivencia mientras que Raina y col. lo asocian con peor supervivencia.

El primer estudio publicado por Hirasawa y col. examinó el **valor pronóstico de MUC1** en 30 pacientes con CPCNP y en 60 voluntarios sanos. El estudio multivariante con regresión de Cox, mismo método multivariante usado en nuestro análisis, mostró una fuerte correlación del estado anti-KL-6/MUC1 con la supervivencia seguido de otras variables como la afectación ganglionar, los niveles de albúmina, el sexto, los valores de lactato dehidrogenas (LDH) y los niveles del marcador antígeno carcinoembrionario (CEA). Así en el caso de MUC1, sus altas concentraciones se asociaron con mayor supervivencia a un año que las bajas, 90.9% versus 21.1%, p < 0.001, respectivamente.

Estos resultados fueron similares a los descritos en nuestra serie respecto a los valores altos de MUC1 y su asociación con mayor supervivencia pero nosotros no encontramos correlación de la supervivencia con las variables sexo y edad.^{64 y 65}

Raina y col. asocian MUC1 con peor supervivencia en CPCNP lo cual podría explicarse por la cascada de señales intracelulares inducidas por esta y que conllevan a la fosforilación de AKT y la inhibición de mTOR (*mmamalian target of rapamycin*). En este estudio preclínico se evaluó la actividad del **agente antiMUC1, GO-203**, mostrando un bloqueo de la vía PI3K → Akt, una inhibición del crecimiento, una inducción de la necrosis por la vía dependiente de ROS, todo lo cual conllevaba una regresión tumoral⁶⁶ (Situ y col. describieron mayor expresión de MUC1 en adenocarcinoma de pulmón, 86.3% que en carcinoma epidermoide, 39.1% y recogen a MUC1 como un factor pronóstico independiente para la supervivencia global y libre de progresión en CPCNP estadio IB.⁶⁷

A pesar de que los resultados obtenidos arrojan datos significativos del valor pronóstico de MUC1 con distintos modelos estadísticos, debemos tener en cuenta que el estudio presenta una **serie de limitaciones**.

La limitación más importante es que existe una **preselección de pacientes según la mutación EGFR** que por sí misma se suele asociar con mayor supervivencia, predicción de respuesta al tratamiento con fármacos antiEGFR y menor porcentaje de fumadores.

Otras limitaciones son el pequeño tamaño muestral aunque al tratarse de pacientes de una zona geográfica y un intervalo de tiempo de un año dicho tamaño es superior al que se describe en otras series similares.

Finalmente, el tiempo de seguimiento de 18 meses, parece adecuado para un cáncer cuya mediana de supervivencia es inferior a los 12 meses pero podría debilitar la potencia de alguno de los análisis de supervivencia.

Esto hace que los datos deban ser validados en una muestra externa de mayor tamaño y de hospitales de diferentes zonas geográficas siendo de especial interés estudiar el valor del modelo Cox descrito dado que las variables cáncer previo y hábitat no suelen incluirse en análisis multivariante ni univariante en cáncer de pulmón.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los datos obtenidos y teniendo en cuenta las limitaciones propias de un estudio de esta naturaleza, se pueden deducir las siguientes conclusiones en concordancia con la hipótesis inicial y los objetivos a conseguir:

- 1. Los pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón con EGFR+ y expresión de MUC1, presentan una supervivencia que es directamente proporcional al valor de dicho marcador. Es decir, a mayor valor de MUC1, mayor tiempo de supervivencia. Por lo tanto, y a la vista de nuestros resultados sería útil la determinación de MUC1 en todos los pacientes con adenocarcinoma y mutación EGFR+. Sería pues un buen biomarcador.**
2. El valor de MUC 1 no se ve influenciado por el sexo, edad, hábito de fumar o hábitat del paciente de los pacientes.
3. Tampoco el haber tenido un cáncer previo de cualquier localización influye sobre el valor de MUC1 obtenido.
4. Los factores de riesgo significativos del tiempo de supervivencia de los pacientes son: el valor de MUC1, con mayor riesgo para los valores de MUC1 inferiores a 10, hábitat, con mayor riesgo para los pacientes de hábitat urbano y haber padecido un cáncer previo.
5. El tiempo de supervivencia de los pacientes se incrementa considerablemente en caso de que se aplique el tratamiento.
6. Finalmente, en el caso de la supervivencia a 18 meses, las variables más determinantes para lograr alcanzar al menos 18 meses de supervivencia son el vivir en hábitat rural, no haber padecido un cáncer previo así como el ser mujer.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. D'Souza G1, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007; 356(19): 1944-56.
2. Lipsich L, Brugge JS, Boettiger D. Expression of the Rous sarcoma virus src gene in avian macrophages fails to elicit transformed cell phenotype. *Mol Cell Biol* 1984; 4(7): 1420-4.
3. Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386(3): 193-205.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *A Cancer J Clin* 2011; 6(2): 69-90.
5. Ferlay J, Soerjomatarm I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C. *Globocan 2012. IARC.*
6. Doll R, Hill A. A study of aetiology of carcinoma of the lung. *Br Med J*.1952; 2(4797): 1271-86.
7. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Ins.* 1999; 91(14): 1194-210.
8. Powell HA, Iyen-Omofoman B, Hubbard RB, Baldwin DR, Tata LJ. The association between smoking quantity and lung cancer in men and women. *Chest* 2013; 143(1): 123-9.
9. Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *JAMA*.2005; 294(12): 1505-10
10. Lee PN, Forey BA, Coombs KJ. Systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence in the 1900s relating smoking to lung cancer. *BMC Cancer* 2012; (12): 385
11. Banderrey MI, Monsó E, Teixido A, Pifarré R, Rosell A, Llatjós M. Frecuencia y riesgo de neoplasia broncopulmonar relacionada con el asbesto. *Med Clin (Barc)* 2001; 117: 1-6.
12. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 2005; 330(7485): 223.
13. Al-Wadei HA, Schuller HM. Beta-carotene promotes the development of NNk-induced small airway-derived lung adenocarcinoma *Eur J Cancer* 2009; 45(7): 1257-64.
14. Zoz DF, Lawson WE, Blackwell TS. Idiopathic pulmonary fibrosis: A disorder of epithelial cell dysfunction. *Am J Med Sci* 2011; 341(6): 435-38.
15. Abal J, Ponente I, Almazán R, Blanco J, Toubes ME, Marcos P. Cáncer de pulmón y EPOC: una asociación frecuente. *Arch Bronconeumol* 2009; 45(10): 502-7.
16. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2005; 93(7): 825-33.
17. Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Kristjansson K, Arnason S et al. Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *JAMA*.2004; 292(24): 2977-83

18. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350(21): 2129-39.
19. Riely GJ. Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3(6 Suppl 2):S146-9.
20. Cools J, Wlodarska I, Somers R, Mentens N, Pedeutour F, Maes B, et al. Identification of novel fusion partners of ALK, the anaplastic lymphoma kinase, in anaplastic large-cell lymphoma and inflammatory myofibroblastic tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34(4): 354-62.
21. Choi YL, Takeuchi K, Soda M, Inamura K, Togashi Y, Hatano S, et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2008; 68(13): 4971-76.
22. Sasaki T, Rodig SJ, Chirieac LR, Jänne PA. The biology and treatment of EML4-ALK non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46(10): 173-80
23. Inamura K, Takeuchi K, Togashi Y, Nomura K, Ninomiya H, et al. EML4-ALK fusion is linked to histological characteristics in a subset of lung cancers. *J Thorac Oncol* 2008; (3):13-7.
24. Neri M, Cesario A, Granone P, Dominioni L, Puntoni R, D'Angelillo RM, et al. Prognostic role of K-Ras mutations in non-small cell lung cancer: still an issue for open debate. *Lung Cancer* 2006; 53(3): 393-95.
25. Yousem SA, Nikiforova M, Nikiforov Y. The histopathology of BRAF-V600E-mutated lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2008; 32(9): 1317-21.
26. Hunt JL. Molecular testing in solid tumors: an overview. *Arch Pathol Lab Med* 2008; 132(2): 164-7.
27. Puri N, Salgia R. Synergism of EGFR and c-Met pathways, cross-talk and inhibition, in non-small cell lung cancer. *J Carcino.* 2008; (7): 9.
28. Bartolucci R, Wei J, Sanchez JJ, Perez-Roca L, Chaib I, Puma F, et al. XPG mRNA expression levels modulate prognosis in resected non-small-cell lung cancer in conjunction with BRCA1 and ERCC1 expression. *Clin Lung Cancer.* 2009; 10(1): 47-52.
29. Lau SK, Boutros PC, Pintilie M, Blackhall FH, Zhu CQ, Strumpf D, et al. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(35): 5562-69.
30. Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2007; 356(1): 11-20.
31. Endoh H, Tomida S, Yatabe Y, Konishi H, Osada H, Tajima K, et al. Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 2004; 22(5): 811-19.

32. Raponi M, Zhang Y, Yu J, et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* 2006; (66): 7466–72.
33. Yan Lu, William Lemon, Peng-Yuan Liu, Yijun Yi, Carl Morrison, Ping Yang, et al. A Gene Expression Signature Predicts Survival of Patients with Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS Med.* 2006; 3(12): e467.
34. Kaye F.J. Molecular Biology of Lung cancer. *Lung Cancer.* 2001; (34): 35-41
35. Humphrey L.L, Teutsch S, Johnson M. Lung Cancer Screening with Sputum Cytologic examination, Chest Radiography, and Computed Tomography: An Update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Annals of Internal Medicine* 2004; 140(9): 740-53
36. Russell PA, Barnett SA, Walkiewicz M, Wainer Z, Conron M, Wright GM, et al. Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol* 2013; 8(4): 461-68.
37. Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Macha MA, Haridas D, Majhi PD, Kaur S, et al. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *J Thorac Oncol* 2015; 10(1): 19-27.
38. Anderson TW, Darling DA. Asymptotic theory of certain "goodness-of-fit" criteria based on stochastic processes. *Annals of Mathematical Statistics* 1952; 23 (2): 193-212.
39. Freedman DA. *Statistical Models: Theory and Practice.* Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press; 2009.
40. Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Annals of Mathematical Statistics* 1947; 18 (1): 50-60.
41. Fay MP, Proschan MA. Wilcoxon–Mann–Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules. *Statistics Surveys* 2010; 4: 1-39.
42. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 1958; 53 (282): 457–81.
43. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports* 1966; 50 (3): 163-70.
44. Peto R., Peto J. Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures. *Journal of the Royal Statistical Society, Series A* 1972; 135 (2): 185–207.
45. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B* 1972; 34 (2): 187–220.
46. Fisher RA. The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Annals of Eugenics* 1936; 7 (2): 179–88.
47. McLachlan GJ. *Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition.* Hoboken, New Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons Inc; 2004.

48. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 1977; 33 (1): 159-74.
49. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clinical Chemistry* 1993; 39 (4): 561-77.
50. Gardner IA, Greiner M. Receiver-operating characteristic curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Veterinary Clinical Pathology* 2006; 35 (1): 8-17.
51. Council for the International Organizations of Medical Sciences –CIOMS–, Ginebra, 1991.
52. Revisión de Seúl, Octubre de 2008.
53. Natale RB1, Bodkin D, Govindan R, Sleckman BG, Rizvi NA, Capó A, et al. Vandetanib versus gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from a two-part, double-blind, randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2009; 27(15): 2523-9.
54. Natale RB1, Bodkin D, Govindan R, Sleckman BG, Rizvi NA, Capó A, et al. Vandetanib versus gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer: results from a two-part, double-blind, randomized phase II study. *J Clin Oncol* 2009; 27(15): 2523-9.
55. Gervas P, Ivanova A, Vasiliev N, Ananina O, Zharkova O, Rogovieva O, et al. Frequency of EGFR Mutations in Non-small Cell Lung Cancer Patients: Screening Data from West Siberia. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16(2): 689-92.
56. Paz-Ares L1, Soulières D, Moecks J, Bara I, Mok T, Klughammer B. Pooled analysis of clinical outcome for EGFR TKI-treated patients with EGFR mutation-positive NSCLC. *J Cell Mol Med* 2014; 18(8): 1519-39.
57. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013; 31(27): 3327-34.
58. Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(2): 213-22.
59. Blackhall F, Kim DW, Besse B, Nokihara H, Han JY, Wilner KD, et al. Patient-reported outcomes and quality of life in PROFILE 1007: a randomized trial of crizotinib compared with chemotherapy in previously treated patients with ALK-positive advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2014; 9(11):1625-33.
60. Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al; PROFILE 1014 Investigators. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371(23): 2167-77.

61. Mitchell P, Thatcher N, Socinski MA, Wasilewska-Tesluk E, Horwood K, Szczesna A, et al. Tecemotide in unresectable stage III non-small cell lung cancer in the phase III START study: Updated overall survival and biomarker analyses. *Ann Oncol* 2015. pii: mdv104. [Epub ahead of print].
62. Quoix E, Ramlau R, Westeel V, Papai Z, Madroszyk A, Riviere A, et al. Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol* 2011; 12(12): 1125-33.
63. Majhi PD, Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Jain M, Das S, Kaur S, et al. Pathobiological implications of MUC4 in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2013; 8 (4): 398-407.
64. Hirasawa Y, Kohno N, Yokoyama A, Kondo K, Hiwada K, Miyake M. Natural autoantibody to MUC1 is a prognostic indicator for non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; (161): 589-94.
65. Raina D, Kosugi M, Ahmad R, Panchamoorthy G, Rajabi H, Alam M, et al. Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(5): 806-16.
66. Raina D, Kosugi M, Ahmad R, Panchamoorthy G, Rajabi H, Alam M, et al. Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(5): 806-16.
67. Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Macha MA, Haridas D, Majhi PD, Kaur S, et al. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *J Thorac Oncol* 2015; 10(1): 19-27.

9. INDICES

Figura 1. Incidencia cáncer 2008 ambos sexos.	5
Figura 2. Mortalidad cáncer 2008 ambos sexos.	6
Figura 3. Incidencia cáncer ambos sexos 2012.	6
Figura 4. Mortalidad cáncer ambos sexos 2012.	7
Figura 5. Prevalencia a 5 años cáncer ambos sexos 2012.	7
Figura 6. Incidencia cáncer hombres 2012.	8
Figura 7. Mortalidad cáncer hombres 2012.....	8
Figura 8. Prevalencia a 5 años cáncer hombres 2012.....	9
Figura 9. Incidencia cáncer mujeres 2012.....	9
Figura 10. Mortalidad cáncer mujeres 2012.....	10
Figura 11. Prevalencia a 5 años cáncer mujeres 2012.	10
Figura 12. TC proyección axial con adenocarcinoma en pulmón derecho.	28
Figura 13. Abordaje terapéutico estadios I-II CPCNP.....	38
Figura 14. Abordaje terapéutico estadio III.	39
Figura 15 – MUC1.....	48
Figura 16 - MUC1 (120-225 kDa).....	52
Figura 17 - Molecular beacons.....	55
Figura 18 - Sondas Fret	56
Figura 19. Curva patrón para identificación.	58
Figura 20. Determinación de mutaciones puntuales mediante análisis de curvas de disociación.....	59
Figura 21. Distribución por edades de los pacientes del estudio.	68
Figura 22. Distribución por edades de los pacientes del estudio (hombres).....	68
Figura 23. Distribución por edades de los pacientes del estudio (mujeres).....	68
Figura 24. Distribución por sexo de los pacientes de la muestra.	69
Figura 25. Distribución del valor de la MUC1 en los pacientes del estudio.....	69
Figura 26. Distribución del valor de la MUC1 en los pacientes del estudio (hombres).....	70
Figura 27. Distribución del valor de la MUC1 en los pacientes del estudio (mujeres).	70

Figura 28. Hábitat de los pacientes.	70
Figura 29. Hábito tabáquico.	71
Figura 30. Número de paquetes de tabaco año consumidos por los pacientes fumadores (hombres)	72
Figura 31. Cáncer previo.....	72
Figura 32. Aplicación de tratamiento.	73
Figura 33. Distribución del tiempo de supervivencia en pacientes con supervivencia igual o inferior a 18 meses.....	73
Figura 34. Estudio de la normalidad de la variable MUC1 a través del test de Anderson-Darling.	74
Figura 35. Estudio de la normalidad de la variable edad a través del test de Anderson-Darling. .	75
Figura 36. Estudio de la normalidad de la variable tiempo de supervivencia a través del test de Anderson-Darling.....	75
Figura 37. Modelo de regresión de MUC1 frente a la edad de los pacientes.	76
Figura 38. Modelo de regresión de MUC1 frente a la edad de los pacientes.....	78
Figura 39. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos según su sexo.....	79
Figura 40. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos según su hábitat.	80
Figura 41. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos en fumadores y no fumadores.	80
Figura 42. Función de supervivencia estimada de los pacientes divididos en función de si tuvieron un cáncer previo o no.....	81
Figura 43. Función de supervivencia estimada de los pacientes tratados frente a los no que no fueron sometidos a tratamiento.	82
Figura 44. Modelo de Cox de riesgos proporcionales con intervalo de confianza al 95%.	83

Tabla 1. Clasificación TNM para cáncer de pulmón.....	33
Tabla 2. Modificado de STAGING HANDBOOK IN THORACIC ONCOLOGY. International Association for the Study of Lung Cancer. Editorial Rx-Press. Florida. EEUU. 2009.	34
Tabla 3. Modificado de STAGING HANDBOOK IN THORACIC ONCOLOGY. International Association for the Study of Lung Cancer. Editorial Rx-Press. Florida. EEUU. 2009.	35
Tabla 4. Modificado de STAGING HANDBOOK IN THORACIC ONCOLOGY. International Association for the Study of Lung Cancer. Editorial Rx-Press. Florida. EEUU. 2009.	35
Tabla 5. Escala de clasificación funcional.	36
Tabla 6. Resumen de las características de los pacientes de la muestra. Valores medios y desviaciones estándar (entre paréntesis).	66
Tabla 7. Resumen de las características de los pacientes hombre de la muestra. Valores medios y desviaciones estándar (entre paréntesis).	67
Tabla 8. Resumen de las características de las pacientes mujer de la muestra. Valores medios y desviación estándar (entre paréntesis).....	67
Tabla 9. Resultados del modelo de regresión de Cox.	84
Tabla 10. Modelo de análisis discriminante. Coeficientes de la función lineal discriminante.	85
Tabla 11. Resultados de los estudios. a: subgrupo que falleció antes de 18 meses. SG: supervivencia global.	89