

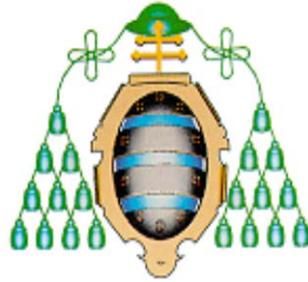


# **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: Investigación en Medicina**

**“Análisis de la vía de p38MAPK y su papel pronóstico en carcinoma de pulmón no microcítico estadio localizado”**

**Pablo Pardo Coto**



# **UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: Investigación en Medicina**

**“Análisis de la vía de p38MAPK y su papel pronóstico en carcinoma de pulmón no microcítico estadio localizado”**

**Pablo Pardo Coto**

A todos los enfermos de cáncer, en especial mi abuelo Manolito al que el cáncer se llevó, y a mi madrina Luisa María, que lleva más de 11 años en la brecha, y seguirá largo tiempo



## **Agradecimientos:**

Quiero expresar mi más sentido agradecimiento a todos los que me han ayudado en este proyecto, en los aspectos moral, material e intelectual:

En primer lugar a Emilio Esteban González, mi mentor y maestro, por prestarme su tiempo, conocimiento, paciencia y fundamentalmente su amistad y cariño. Sin su apoyo incondicional y su empuje este proyecto no habría seguido adelante.

En segundo lugar a Aurora Astudillo, por su disposición, conocimiento y eficacia, por darme su tiempo en las situaciones no siempre más fáciles para ella. Gracias a las personas de su laboratorio, especialmente Aitana Vallina, por su ánimo, paciencia y la tranquilidad que me transmitió en todo momento, a María Daniela, por su trabajo con los anticuerpos en la segunda parte de este trabajo y a Laura Suárez Fernández, que fue inicialmente quien puso a punto el anticuerpo p38, sin olvidar a las técnicas Aurora Fernández, Isabel Flórez, Nieves A. León y Concepción Bueno.

A Amalia Fernández, cuya ayuda también en los inicios fue fundamental.

A Norberto Corral, con cuya fundamental ayuda además he aprendido que el trabajo estadístico, imprescindible y riguroso, es sumamente agradable. Gracias también a Pablo Martínez-Cambor por su ayuda.

A Raquel Lavandera, de la Oficina de Investigación Biosanitaria (OIB)-FICYT, y a los servicios de archivos del HUCA (Consuelo y Menchu), Cabueñes y San Agustín.

Al servicio de cirugía torácica del HUCA, en especial a su jefe Jesús Rodríguez, así como a los servicios de neumología del INS, Cabueñes, Avilés, Riaño y Mieres, porque fueron fundamentales en el diagnóstico y manejo de los pacientes del estudio.

A los servicios de anatomía patológica del INS, Cabueñes, San Agustín, Valle del Nalón, y Álvarez-Buylla, por la cesión de muestras. En especial a la memoria del Dr. Merino de Cabueñes, que falleció poco tiempo después de ayudarme.

A Teresa Sampedro por facilitarme la revisión de historias en su servicio de Oncología de Cabueñes, y en una fase previa del trabajo al Dr. Gracia. En Avilés, Paula G. Teijido, por su disposición y amabilidad. En el Hospital de Jove, al Dr. Escribano y la Dra. Cienfuegos, así como a Covadonga Cuervo-Arango y María Fueyo. En el Hospital Valle del Nalón al Dr. Daniel Santirso.

A todo el personal del IMOMA, por facilitarme el trabajo tantas tardes, y a la gente del laboratorio por ayudarme con la conservación de los Anticuerpos.

A todos mis compañeros de residencia, con quienes he compartido gran parte de este trabajo, en especial a mi amiga Marta Izquierdo y a Carlos Álvarez, que me ayudó muchísimo con la recogida de datos y múltiples detalles finales así como Carolina Muriel, por su ánimo y su ejemplo para mí y al igual que Miguel F. Sanmamed.

A todos los médicos de los cuales he aprendido durante mi etapa de residente en el HUCA, tanto del Servicio de Medicina Interna, con quienes aprendí a ser médico, como fundamentalmente del Servicio de Oncología Médica. De todos y cada uno de ellos aprendí algo y lo empleo en el día a día con mis pacientes.

Al Miguel Valle Pereda, mi compañero y amigo, por su forma de ser, por facilitarme las cosas y por su ayuda en aspectos importantes para terminar este proyecto.

A tres personas que sirvieron de inspiración para este proyecto: Julio Aguirre-Ghiso, del cual surgió la idea inicial para este proyecto aunque él no lo sepa. Ángel Nebreda, ex-jefe del grupo de señalización celular y cáncer del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, ahora en el ICO en Bellvitge y especialmente a Alberto Jiménez Schuhmacher, un amigo siempre dispuesto a la reflexión.

A Rubén, quien me animó en momentos de dificultad y me impulsó a continuar cuando retomé el proyecto. Sin su ánimo, quizás este día no habría llegado.

A Carlos-López Otín, por algo no relacionado con esta tesis, sino por ser la primera persona que me hizo reflexionar sobre lo que era el cáncer, haciendo nacer en mí el interés por la oncología.

A dos personas que han hecho posible la lectura de la tesis, María Teresa Usín y Fernando Santos, del Departamento de Medicina de la Universidad de Oviedo. No me debían nada y no les di nada a cambio, pero su ayuda fue imprescindible e impagable. También a las otras dos secretarias del Departamento, Ana y Tere, por su labor con el papeleo para la lectura de la tesis.

Muy especialmente, a toda mi familia, sobre todo a mis padres y mi hermana Nair y su marido Adrián, así como mis tíos, primos y abuela, por haberme animado y soportado. Yo soy lo que ellos me han enseñado a ser y no sería nada sin ellos.

Y sin lugar a dudas, a Cristina, a la cual le he dedicado menos tiempo por dárselo a mi tesis, pero que supo estar a mi lado y ser mi primera consejera y crítica cuando no entendía los porqués de lo que hacía; sus preguntas y reflexiones, aunque ella no lo crea, me han servido para establecer muchas conclusiones de este trabajo.

A todas las personas que no nombro, pero que saben que también les estoy agradecido, especialmente a todos los que me aconsejaron a lo largo de este tiempo.

# Índice:

1. Introducción .....	5
1.1. Carcinoma de pulmón: .....	7
1.1.1. Epidemiología: .....	7
1.1.2. Factores de riesgo: .....	8
1.1.3. Clasificación histológica de las neoplasias de pulmón: .....	10
1.1.4. Manifestaciones Clínicas: .....	11
1.1.5. Diagnóstico: .....	12
1.1.6. Estadificación: .....	13
1.1.7. Tratamiento de la neoplasia pulmonar: .....	13
1.1.7.1. Estadios tempranos (I y II) (Pacientes resecables): .....	13
1.1.7.2. Estadios localmente avanzados (III-A y B) (No resecables): .....	13
1.1.7.3. Tratamiento adyuvante: .....	15
1.1.8. Biología molecular del carcinoma de pulmón: .....	16
1.1.9. Factores pronósticos y predictivos: .....	19
1.2. Vía de las MAPK: .....	24
1.2.1. Vía de las MAPK y procesos de señalización celular: .....	24
1.2.2. Caracterización funcional y estructural de p38MAPK: .....	27
1.2.3. Papel de p38 en distintos procesos fisio-patológicos: .....	28
1.2.3.1. Papeles fisiológicos de p38: .....	28
1.2.3.2. Papel de p38 en procesos patológicos no tumorales: .....	29
1.2.3.3. Regulación de la tumorigénesis por p38 $\alpha$ : .....	30
1.2.4. Quimioterapia y p38 MAPK: .....	31
1.2.4.1. Mediación de respuesta y resistencia a CDDP por MAPK: .....	32
1.2.4.2. p38 y toxicidad de la quimioterapia .....	32
1.2.5. p38 y MAPK (JNK, ERK) en tumores humanos y su implicación clínica.....	33
1.2.5.1. Trabajos no centrados en CPNM: .....	34
1.2.5.2. Trabajos centrados en CPNM: .....	35
1.2.5.3. Inhibición de p38 como terapia: .....	37
2. Objetivos .....	39
3. Material y Métodos .....	43
3.1. Pacientes y características de las muestras: .....	45

3.1.1. Estadios III (localmente avanzados):	45
3.1.2. Estadios I y II (iniciales):	46
3.2. Estudio inmunohistoquímico:	46
3.2.1. p38:	48
3.2.2. JNK:	49
3.2.3. ERK:	49
3.2.4. EGFR:	50
3.2.5. HER-2:	50
3.2.6. p53:	51
3.3. Seguimiento, evaluación y análisis estadístico:	52
3.3.1. Seguimiento:	52
3.3.2. Evaluación:	52
3.3.3. Análisis inmunohistoquímico:	53
3.3.4. Análisis estadístico:	54
4. Resultados	57
4.1. Características clínico-patológicas de los pacientes:	59
4.1.1. Estadios III (localmente avanzados):	60
4.1.2. Estadios I y II (iniciales):	61
4.2. Resultados de la expresión por IHQ:	62
4.3. Asociación entre marcadores moleculares IHQ:	64
4.4. Asociación entre Variables moleculares y clínico-patológicas:	66
4.4.1. Edad, sexo y estado general:	66
4.4.2. Tabaquismo:	67
4.4.3. Histología y Grado tumoral:	67
4.4.4. Estadio clínico y/o quirúrgico:	69
4.4.5. p38 y quimioterapia en estadios III:	70
4.4.5.1. Relación de p38 con respuestas clínicas e infraestadificación:	70
4.4.5.2. Tratamiento con esquema basado en platinos:	70
4.5. Análisis de supervivencia:	71
4.5.1. Supervivencia y variables clínico-patológicas:	71
4.5.1.1. Cohorte de pacientes con estadio III:	71
4.5.1.2. Cohorte de pacientes con estadio I y II:	72
4.5.2. Supervivencia y p38 en estadios III:	75

4.5.2.1 p38 en biopsias diagnósticas: .....	75
4.5.2.2. p38 en biopsias quirúrgicas: .....	76
4.5.3. Supervivencia y marcadores moleculares en estadios I y II: .....	77
4.5.3.1. p38 y supervivencia:.....	77
4.5.3.2. JNK y supervivencia: .....	78
4.5.3.3. ERK y supervivencia:.....	79
4.5.3.4. EGFR y supervivencia: .....	81
4.5.3.5. p53 y supervivencia:.....	81
4.5.3.6. HER-2 y supervivencia: .....	82
4.5.3.7. MAPK agrupadas y supervivencia:.....	83
4.5.3.8. Análisis de subgrupos: .....	86
4.5.3.9. Resumen variables moleculares y supervivencia: .....	87
4.5.4. Modelo multivariante en estadios III: .....	88
4.5.5. Modelo multivariante en estadios I y II: .....	90
4.5.5.1. Modelo para Supervivencia Global:.....	90
4.5.5.2. Modelo para Supervivencia Libre de Enfermedad:.....	91
4.6. Imágenes representativas de la IHQ: .....	92
4.6.1. Imágenes p38MAPK: .....	92
4.6.2. Imágenes JNK:.....	94
4.6.3. Imágenes ERK 1/2: .....	95
4.6.4. Imágenes p53: .....	96
4.6.5. Imágenes EGFR:.....	97
4.6.6. Imágenes HER-2:.....	98
5. Discusión.....	99
6. Conclusiones .....	117
7. Acrónimos .....	121
8. Anexo .....	125
8.1. Escalas de evaluación del estado general.....	127
8.2. Criterios de evaluación de respuesta de la OMS .....	128
8.3. Estadificación del carcinoma no microcítico pulmonar (previa):.....	129
8.4. Estadificación del carcinoma no microcítico pulmonar (actual): .....	130
8.5. Clasificación histológica del carcinoma pulmonar:.....	131
9. Bibliografía .....	133



# 1. Introducción

---



## 1.1. Carcinoma de pulmón:

### 1.1.1 . Epidemiología:

La incidencia del cáncer de pulmón ha ido aumentando progresivamente a lo largo de la segunda mitad del siglo XX, llegando a constituir la primera causa de mortalidad en ambos sexos conjuntamente en países desarrollados. El tabaco es el factor de riesgo más importante, así como principal causante de muerte evitable por cáncer.

El registro internacional GLOBOCAN, auspiciado por la OMS, en su última actualización de 2008 mostró que este tumor se diagnostica anualmente en 1.608.800 personas (1.095.200 hombres y 513.600 mujeres), causando 1.378.400 muertes (951.000 en hombres y 427.400 en mujeres), constituyendo un 13 y 18% de diagnósticos y muertes por cáncer y la primera causa de mortalidad por cáncer en hombres y la segunda en las mujeres tras el de mama (1).

Según las estadísticas de la sociedad americana de cáncer, constituyó el 14% del total de cánceres diagnosticados, prácticamente igualada la incidencia en hombres y mujeres, con 226.000 casos, 111.470 en hombres y 109.690 en mujeres, provocando 160.340 muertes. En dicho país el cáncer es la primera causa de muerte tanto en hombres como en mujeres, acercándose al 30% y la probabilidad de desarrollarlo a lo largo de la vida se acerca al 6,7% en hombres y al 4,9% en mujeres (2).

En Europa se diagnostican 400.000 nuevos casos al año, causando en torno a unas 375.000 muertes con 80/20% de hombres respecto a mujeres. En 2004 fue la causa del 20% de muertes por cáncer, siendo la primera causa de cáncer no cutáneo y la primera causa de mortalidad por cáncer. Esta incidencia y mortalidad varían geográficamente, con mayor incidencia en hombres en el Este de Europa, menor en el Norte. En mujeres ocurre lo contrario, con mayor incidencia y mortalidad en el Norte que en Sur y Este, probablemente en relación con los distintos hábitos tabáquicos regionales (3).

En el año 2006 en nuestro país la prevalencia total estimada fue de 1.175 casos de cáncer por 100.000 habitantes (4). La última actualización del atlas de mortalidad por cáncer realizada en 2009 por el Instituto de Salud Carlos III pone de manifiesto el ligero aumento de la mortalidad, con 17.265 hombres fallecidos con una media de edad de 68,75 años y un total de 3.115 mujeres con una media de edad de 65,97 años. Las cifras de incidencia y mortalidad presentan variaciones en las distintas áreas geográficas.

En Asturias, el análisis realizado en 2001 por la Dirección General de Salud Pública de la Consejería de Salud y Servicios Sanitarios mostró una supervivencia del

## Introducción

11% a los 5 años entre los pacientes diagnosticados de cáncer pulmonar en 1992, siendo la segunda comunidad en mortalidad, por encima de la mortalidad estándar en España.

La mayoría de los pacientes se diagnostican en la quinta y sexta década de la vida, con una curva ascendente para cada sexo en función de la edad. Presenta una gran disparidad geográfica y étnica, siendo más frecuente en los países desarrollados. Entre las mujeres norteamericanas la mortalidad es similar en blancas y negras, pero 26% mayor en los hombres negros que en los blancos. La mortalidad de hispanos, americanos nativos y asiáticos es significativamente inferior que en los negros.

Hasta hace unas décadas, el subtipo histológico más frecuente era el epidermoide seguido del microcítico, con un aumento progresivo en la incidencia del adenocarcinoma en los últimos años, convertido incluso en el más frecuente en algunos países, hecho que podría estar en relación con la mejoría en las técnicas diagnósticas, así como con el cambio en las características de los cigarrillos con modificaciones en los carcinógenos. El pronóstico es aún pobre, con una supervivencia relativa ajustada por edad a los cinco años del 12% en hombres en España, y cifras generalmente inferiores en el resto de los países europeos.

### 1.1.2 . Factores de riesgo:

#### Causas ambientales:

**Tabaco:** la mayoría de los carcinomas de pulmón están causados por el hábito de fumar. Los primeros estudios que asociaron tabaco y cáncer de pulmón son historia de la epidemiología clínica (5-7). Todas las formas y tipos de tabaco se asocian a un mayor riesgo, que aumenta con la dosis, tanto en fumadores activos como pasivos, en todos los tipos histológicos. El abandono del hábito tabáquico hace disminuir el riesgo, aunque uno de cada cuatro casos se diagnostica en ex-fumadores.

El tabaco contiene más de 300 sustancias, y entre ellas hay 40 carcinógenos, siendo los más importantes los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), entre los que destaca el Benzopireno (BP). Entre el resto destacan las nitrosaminas, aminas aromáticas, aminas heterocíclicas (naftilamina), aldehídos (formaldehído), compuestos orgánicos volátiles (benzeno) y otros compuestos orgánicos (óxido de etileno, cloruro de vinilo, acrilamida) e inorgánicos (As, Be, Ni, Cr, Cd) (8). La forma activa, BPDE crea aductos en las guaninas (G) del ADN, dando lugar a mutaciones tipo transversión G>T (timina) por errores de replicación. El espectro mutacional del gen p53 tras la exposición a este agente presenta un predominio de cambios G>T, con una distribución

no aleatoria y preferencia por ciertos codones (157, 158, 245, 248, 273), espectro típico y específico de los tumores pulmonares a diferencia de la práctica totalidad del resto de neoplasias, con predominio (30 frente a 10%) de estas transversiones en fumadores, lo que constituye una huella molecular típica del cáncer de pulmón (9-10).

**Exposición ambiental y ocupacional:** varios agentes químicos aumentan el riesgo de carcinoma pulmonar, y algunos son compartidos o potenciados por el tabaco. Entre ellos destaca el asbesto, fibra de sílice, compuestos orgánicos como el cloro-metil-éter, gases diesel y la polución aérea, así como ciertos metales y radiaciones ionizantes.

**Radiación:** Hay un aumento de riesgo del diagnóstico de cáncer de pulmón en pacientes que han recibido radioterapia previa. Este riesgo se ha descrito fundamentalmente en pacientes con el diagnóstico previo de carcinoma de mama que recibió radioterapia complementaria y que eran fumadoras (11).

**Dieta:** la dieta rica en  $\beta$ -carotenos así como en Vitamina C podrían asociarse con menor riesgo de carcinoma pulmonar. También se han visto menores niveles de folato en pacientes con cáncer de pulmón, que podrían tener relación con una menor capacidad reparadora del ADN en estos pacientes.

#### **Predisposición genética:**

A diferencia del cáncer de mama o de colon, en los que hay descritos genes relacionados con síndromes de agregación familiar, en el carcinoma pulmonar no hay evidencias contundentes bien definidas a favor de la herencia, aunque ciertos estudios epidemiológicos que demostraban cierta asociación con la historia familiar proporcionaron las primeras pruebas de la posible susceptibilidad genética (12).

Entre los genes implicados, destacan la mutación germinal en p53, pRb, así como mutación germinal en EGFR (13). Más recientemente, como se ha comentado previamente, se ha encontrado un SNP en 15q24 y 15q25.1 (14-15), en relación con el receptor nicotínico de Acetilcolina (ACh), que aumenta el riesgo de carcinoma. También se ha relacionado con mutaciones germinales en genes reparadores como ERCC1 (16).

**Genes de alta penetrancia y poco frecuentes:** se analizan en estudios de agregación familiar, en base al grado de ligamiento. De este modo se ha encontrado el locus 6q23-25 aunque aún no se sabe el gen responsable.

**Genes de baja penetrancia pero relativamente frecuentes:** de este modo se analizan genes candidatos por su función previamente conocida, que podrían tener un

## Introducción

papel en la reparación tumoral, como por ejemplo genes relacionados con el metabolismo de sustancias tóxicas, genes reparadores de ADN, de ciclo celular, etc.

Entre los genes metabólicos destacan CYP1A1 y GSTM1, conociéndose polimorfismos que confieren un aumento de riesgo, aunque modesto. Para CYP1A1 se conocen dos polimorfismos que confieren una mayor actividad de la enzima que convierte el BP en BPDE, activando su actividad carcinogénica y aumentando sus niveles, y en GSTM1 se conoce una delección que limita su función conjugante de compuestos electrofílicos con glutatión, aumentando el producto tóxico (17).

**Genome wide association studies (Estudios de asociación genómica, GWAS):** consisten en el genotipado de gran número de variantes de único nucleótido (SNP) en el genoma, proporcionando un escrutinio de las variaciones genéticas más comunes e identificar rasgos genéticos que constituyen mayor riesgo para una determinada enfermedad. Esto es posible desde que se dispone de la secuencia del genoma humano, y gracias al proyecto HapMap de genotipado poblacional.

Se conocen dos locus asociados a mayor riesgo de cáncer de pulmón, uno en 5p15.33 (SNP rs8034191), que contiene dos genes, el TERT (telomerasa transcriptasa reversa), y el CLPTM1L (cisplatin resistance-related gene); el otro en 15q25, que contiene seis genes, incluyendo dos subunidades de los receptores nicotínicos de Ach CHRNA3 y CHRNA5, asociados a la dependencia nicotínica. Los receptores nicotínicos se expresan en el tejido pulmonar y son activados por nitrosaminas del tabaco, y aunque en principio se creía que el aumento de riesgo relacionado con estos polimorfismos se debería al aumento del hábito tabáquico, se cree que su relación es directa puesto que no se asocian significativamente al incremento del hábito y también incrementa el riesgo en no fumadores (14-15).

### 1.1.3 . Clasificación histológica de las neoplasias de pulmón:

La clasificación actual realizada por la OMS en 2004 diferencia cuatro tipos de histología, escamoso, adenocarcinoma, células grandes y célula pequeña (microcítico), con variantes adicionales (18). Aunque esta clasificación sigue vigente, en el año 2011 la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) creó una nueva propuesta para redefinir los subtipos de adenocarcinoma pulmonar (19), desapareciendo en ella los subtipos Bronquiolo-alveolar (BAC) y adenocarcinoma mixto. Aparecen lesiones precoces como adenocarcinoma mínimamente invasivo y adenocarcinoma in situ, los carcinomas invasivos son reclasificados según el patrón

predominante y los antiguos BAC pasarían a llamarse adenocarcinoma de pulmón con patrón lepidico no mucinoso. (Ver anexo).

Clásicamente se solía simplificar aún más dividiendo el carcinoma pulmonar entre microcítico (CPM) y no microcítico (CPNM), dado que su manejo variaba radicalmente de uno a otro. Posteriormente comenzó a cobrar importancia el subtipo histológico en los CPNM, con la trascendencia clínica del adenocarcinoma. Hoy día la diferenciación va más allá, y no sólo es importante el subtipo histológico, sino los diversos subtipos moleculares.

#### **1.1.4 . Manifestaciones Clínicas:**

- Tos: presente entre el 50-75%, sobre todo en tumores centrales como el carcinoma escamoso y el microcítico. Se asocia a neumonía post-obstructiva.
- Hemoptisis: 25-50% de los diagnosticados la presentan, aunque la primera causa de hemoptisis es la bronquitis crónica.
- Dolor torácico: suele ser debido a la afectación de pared torácica o pleura (por tanto sobre todo en los tumores periféricos), aunque en ocasiones la afectación central y subsiguiente neumonitis post-obstructiva también pueden causar dolor.
- Disnea: aparece en un 25% de los casos y suele ser de origen multifactorial.
- Afonía: en el caso del carcinoma pulmonar ocurre por afectación del nervio laríngeo recurrente, que puede ser directa por invasión o indirecta por compresión. Confiere mal pronóstico sobre todo en el primer caso.
- Síndrome de vena cava superior: se manifiesta en forma de dilatación venosa del cuello, edema en esclavina y enrojecimiento. Cursa con dolor, embotamiento y disnea y es una urgencia oncológica. Su principal causa dentro del grupo de tumores pulmonares es el CPNM.
- Síndrome de Pancoast: debido a tumores pulmonares en el sulcus superior. Se manifiesta con dolor (hombro, antebrazo, escápula y dedos), síndrome de Horner, destrucción ósea y atrofia de los músculos del brazo y mano.
- Síndromes paraneoplásicos: alteraciones de tipo hormonal o neurológico que producen sintomatología independientemente de la existencia o no de metástasis. Los más frecuentes son el SIADH, la hipercalcemia por HPTH y varios síndromes neurológicos como el Eaton-Lambert.

### 1.1.5 . Diagnóstico:

La exploración física irá seguida de pruebas de laboratorio con hemograma completo, iones, calcio, albúmina, pruebas hepáticas y función renal. Nos valen para valorar el estado general del paciente y para valorar la afectación a distancia. La presencia de pruebas hepáticas alteradas obliga a descartar metástasis hepáticas, a hipercalcemia metástasis óseas o síndrome paraneoplásico con hiperparatiroidismo, la elevación aislada de fosfatasa alcalina metástasis hepáticas u óseas si la GGT es normal y la anemia suele manifestar enfermedad avanzada.

En cuanto a las pruebas de imagen, la prueba inicial debe ser la *radiografía de tórax*, seguida de una *TC tóraco-abdominal*, que permite iniciar la estadificación TNM. Es útil para estadificar el tumor primario y descartar o confirmar la presencia de metástasis a distancia, siendo menos fiable que la PET para la afectación ganglionar sobre todo en el mediastino y si los ganglios son menores de 1-1,5 cm. Siempre que la TC de entrada no descarte enfermedad a distancia, hay indicación para hacer *PET*, que sirve para enfermedad a distancia, siendo superior al TC en todas las localizaciones salvo cerebro e hígado, así como para estadificar el mediastino, al detectar lesiones en ganglios de tamaño normal, con gran VPN pero pobre VPP, por lo que precisa siempre confirmación histológica. El *scan óseo* se reserva para pacientes sintomáticos o alteración en pruebas de laboratorio sugestivas, con menor valor tras la llegada de la PET. La *RM cerebral* sólo estaría indicada si hay signos o síntomas neurológicos, aunque útil para descartar la afectación metastásica dado que la PET es menos fiable.

En cualquier lesión tumoral es mandatorio un diagnóstico histológico para realizar cualquier actitud terapéutica y en el carcinoma de pulmón es un aspecto complicado, por la dificultad en su obtención y por ser necesario además para la realización de pruebas moleculares. Si la lesión está limitada al tórax, habrá que obtener material histológico a partir de una *broncoscopia* o en su defecto una *punción transtorácica*, que nos podrían ayudar a obtener la mejor muestra histológica posible, la Biopsia con Aguja Gruesa (BAG). Cuando esto no es posible se recurre a la Punción aspiración con aguja fina (PAAF), tanto de cualquiera de las lesiones adenopáticas, como de posibles localizaciones metastásicas. También es posible el diagnóstico a través de líquido pleural o esputo, pero en este caso sólo daría rentabilidad para realizar un diagnóstico histológico. Hoy en día, la necesidad de realizar estudios moleculares hace que el diagnóstico histológico exclusivo sea insuficiente.

### 1.1.6 . Estadificación:

Se utiliza el sistema TNM, que valora tumor primario (T), afectación ganglionar regional (N) y diseminación a distancia (M). La versión vigente hoy es la séptima edición de la clasificación "TNM Classification of Malignant Tumors", aceptada por la UICC y la AJCC y publicada en 2009 (20-21). Se diferencia de la previa fundamentalmente en la reclasificación del derrame pleural y pericárdico (pasan a considerarse metástasis, M1a) y de los nódulos satélites (pueden ser T3). Otros cambios incluyen nuevos puntos de corte en el tamaño y nuevas subdivisiones de T1 (en T1a y T1b), T2 (en T2a y T2b), y M1 (M1a y M1b). (Ver anexo).

### 1.1.7 . Tratamiento de la neoplasia pulmonar:

#### 1.1.7.1. Estadios tempranos (I y II) (Pacientes resecables):

**Pacientes operables:** sin no hay afectación metastásica o mediastínica el tratamiento adecuado es la cirugía, siendo la lobectomía la mejor opción siempre que sea posible, ya que la neumonectomía está relacionada con peor supervivencia (22). Se ha de realizar linfadenectomía mediastínica reglada, pues es un elemento fundamental para la estadificación quirúrgica. El protocolo de la ESTS recomienda la resección de al menos 6 ganglios y 3 estaciones ganglionares, que deben incluir la infracarinal (23).

**Pacientes no operables:** en ocasiones existen comorbilidades que impiden al paciente soportar una cirugía a pesar de poder ser curativa. No hay un papel para la quimioterapia, pero sí para la radioterapia estereotáxica extracraneal, consiguiéndose un control local de hasta el 97% y con menor toxicidad que la radioterapia clásica (24).

#### 1.1.7.2. Estadios localmente avanzados (III-A y B) (No resecables):

Es un tema controvertido actualmente quedando la cirugía relegada a un papel mínimo, dado el escaso beneficio para los pacientes con afectación mediastínica. Estadios III-A sin afectación mediastínica (T4N0-1) serían los mejores candidatos a una inducción con quimioterapia previa a cirugía con intención curativa, mientras que en los estadios III-A N2 el tratamiento sería multimodal con quimio y radioterapia como pilares del tratamiento curativo. En los III-B las opciones curativas son aún menores y la quimioterapia asociada o no a la radioterapia son las mejores armas disponibles.

### **Quimioterapia neo-adyuvante o primaria:**

En estadios precoces (I a IIIA) los estudios son contradictorios, mostrando un trabajo francés mejoría en la respuesta, supervivencia libre de enfermedad (SLE) así como metástasis a distancia, pero no en supervivencia global (SG) al administrar un triplete de cisplatino, manteniéndose las diferencias en los IB y II (25). Un grupo americano inició otro estudio con carboplatino y taxol en estadios IB a IIIA, sugiriendo alguna ventaja del tratamiento previo, pero no confirmada al cerrarse precozmente (26).

En los estadios clínicos IIIA resecables (mediastino positivo por histología), tres trabajos con asignación aleatoria compararon cirugía sola frente a quimioterapia previa, utilizando todas combinaciones de cisplatino de segunda generación y confirmándose ventaja significativa en supervivencia a favor de la quimioterapia neo-adyuvante en dos de ellos (27-29). Un estudio de nuestro centro ha demostrado que no hay diferencias entre la administración de dos o tres drogas en un esquema de cisplatino de tercera generación como inducción o neo-adyuvante (3 ciclos) a cirugía o radioterapia (30).

Para los estadios clínicos IIIA no quirúrgicos y IIIB, las opciones de tratamiento se basaban en la radioterapia exclusiva con una mediana de supervivencia de un año y un 5-10% a los 5 años (31). Posteriores estudios mostraron mejoría al asociar quimio neoadyuvante a la radioterapia radical, confirmada en dos meta-análisis, con reducción del 13% de la mortalidad y mejoría de un 4% en la supervivencia a 2 años (32-33). A partir de entonces diversos estudios han sugerido mejor supervivencia en estadios III con quimio y radioterapia concurrente frente a su administración secuencial con un reciente meta-análisis que ha mostrado que la concomitancia aporta un beneficio de un 5,7% y un 4,5% a los tres y cinco años en SG, a expensas de mejor control local. Sin embargo el aumento de la toxicidad, fundamentalmente la esofagitis, hace que su utilización se limite a pacientes con buen estado general y función respiratoria (34).

Globalmente la incorporación de quimioterapia neoadyuvante a la radioterapia y/o cirugía, sugieren la posibilidad de alcanzar un 15-20% de largos supervivientes sin poder delimitar una clara diferencia entre un tratamiento local con cirugía, radioterapia o ambas en pacientes estadio III, existiendo dos estudios que comparan quimioterapia con o sin radioterapia previa a cirugía o radioterapia con intención curativa.

El estudio europeo trató a pacientes N2 con una combinación de platino y los que no progresaron tras la inducción (332 pacientes) se asignaron a cirugía o radioterapia sin encontrar diferencias en la mediana de supervivencia global (16 vs 17 meses) ni en porcentaje de vivos a los 5 años (15,7 vs 14), con peor supervivencia en los

neumonectomizados (35). El americano asignó aleatoriamente a 396 pacientes estadio T1-3N2 a un esquema con cisplatino y etopósido concurrente con radioterapia (45 Gy) seguido de cirugía o radioterapia con dosis radicales (61 Gy) sin cirugía. Volvió a demostrar ausencia de diferencia en SG (23 vs 22 meses) y en porcentaje de vivos a los 5 años (27 vs 21%), pero sí en SLE a favor de la inducción con quimio-radioterapia seguida de cirugía (22 vs 11 meses). La ausencia de diferencia en SG podría estar en relación con el alto porcentaje de neumonectomías entre los operados y por otro lado en que un menor porcentaje de los operados llegaba a recibir la quimioterapia de consolidación (36). Análisis secundarios ponen de manifiesto que sólo si se produce esterilización mediastínica, la cirugía posterior mejora la supervivencia.

Por lo anterior, la indicación de cirugía se podría considerar sólo si existiera infraestadificación del mediastino tras la inducción evitando la neumonectomía (37), siendo controvertida la cirugía tras radioterapia radical (>60 Gy) por la alta tasa de complicaciones y discutibles ventajas (38), aunque posible con dosis menores (45 Gy).

#### 1.1.7.3. Tratamiento adyuvante:

**Quimioterapia:** Diversos trabajos promueven el uso de quimioterapia adyuvante cuando la enfermedad es potencialmente curable y se ha resecado por completo (39-43), estando indicada en pacientes con estadio II y III, aunque últimamente se discute también en los IB de >4 cm (43-44), siendo la neumonectomía un factor en contra del tratamiento quimioterápico por mayor riesgo de fístula postquirúrgica. El esquema más adoptado utiliza Cisplatino y Vinorelbina (41).

**Radioterapia:** La principal indicación de la radioterapia pacientes resecaos es la afectación mediastínica como hallazgo quirúrgico. Otra de las indicaciones es la presencia de bordes afectos tras la cirugía de resección radical (R1-2). Los tumores T3, con afectación de pared torácica presentan una mayor dificultad para lograr resecciones completas (R0), por lo que este subgrupo se podría beneficiar del tratamiento adyuvante con radioterapia, pero siempre que no se haya hecho resección R0 (45).

Un reciente meta-análisis comparó cirugía más quimioterapia versus cirugía exclusiva, con beneficio significativo para lo primero, con un aumento absoluto de la supervivencia del 4% a los 5 años. En el mismo artículo se publicaba otro meta-análisis que comparaba cirugía más radioterapia y quimioterapia versus cirugía y radioterapia solamente en los casos indicados, con beneficio significativo al añadir quimioterapia, representando un incremento absoluto en la supervivencia del 4% a los 5 años (44).

### 1.1.8. Biología molecular del carcinoma de pulmón:

El carcinoma de pulmón es uno de los tumores cuyo conocimiento molecular y su aplicación clínica directa más ha cambiado en los últimos tiempos, con multitud de nuevas alteraciones que se descubren año tras año. El adenocarcinoma pulmonar es la histología que más ha evolucionado, con el descubrimiento de alteraciones moleculares específicas con repercusión predictiva de respuesta a fármacos en algunos casos y en otros pronóstica. En el carcinoma escamoso esta labor ha ido más lenta y ha sido más difícil encontrar mutaciones específicas aunque en todo caso parece que comienza a haber resultados. El carcinoma microcítico es poco estudiado, por su menor frecuencia y porque no suele ser subsidiario de cirugía, motivo por el cual se carece de material tumoral adecuado y/o suficiente en muchos casos.

Los trabajos iniciales identificaron diversas alteraciones cromosómicas, fundamentalmente deleciones en 3p14-25, 9p21 (incluye p16), y 17p13 (incluye p53), conteniendo todos estos loci genes supresores tumorales. Posteriormente el estudio se centró en la búsqueda de alteraciones génicas de tipo puntual, que pudieran favorecer el desarrollo de terapias dirigidas. Así se conocen mutaciones puntuales, bien en oncogenes como EGFR, HER-2, KRAS, PIK3CA, o en genes supresores como p53, LKB1, RB1 y p16INK4A, siendo más frecuente en este último la metilación que la mutación (12). Mucho más recientemente se ha descrito la presencia de activación por translocación de genes como ALK, ROS1 o RET.

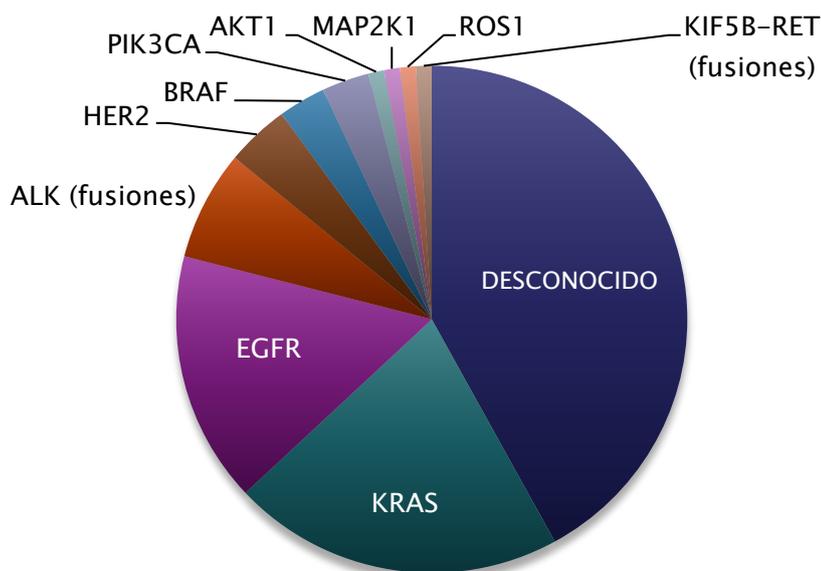
Las mutaciones en EGFR se encuentran principalmente en adenocarcinomas, en aproximadamente el 10% de la población caucásica y en el 40% de la asiática, más en mujeres y no fumadores, y se asocian a respuesta a los inhibidores de tirosina kinasa de EGFR (TKI *en inglés*). La mayoría de las mutaciones ocurren en el exón 21 (variante L858R) y en el exón 19 (E19del) y ambas confieren mejor pronóstico y respuesta a los TKI (46). En pacientes resistentes se ha identificado una mutación en el exón 20 (T790M).

Otros genes de la vía como HER2 se han encontrado amplificados y podrían relacionarse con sensibilidad a los TKI aunque parece que su alteración relevante en pulmón es por mutación. La vía de Ras-Raf-MAPK también tiene interés, en base a la activación de KRAS por mutaciones activantes, fundamentalmente en adenocarcinomas en pacientes fumadores, siendo prácticamente excluyente su mutación con la de EGFR (14).

En 2007 se demostró que una inversión en el cromosoma 2p daba lugar al gen de fusión EML4-ALK, con lo que éste último estaba constitutivamente activado (47). La activación del gen ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase) es más frecuente en histología no escamosa y no fumadores, (aunque puede aparecer en carcinomas escamosos), en hombres y más jóvenes que EGFR (48-49). Su principal compañero de translocación es EML4, aunque no es exclusivo y parece que lo importante es la activación de ALK, existiendo un inhibidor de dicha proteína (crizotinib) con importancia clínica.

Recientemente ha sido descrita la translocación del receptor tirosina kinasa ROS1 de la familia del receptor insulínico. Su frecuencia ha sido cuantificada en torno al 2% en un screening de 1000 pacientes. Sólo aparece alterado en adenocarcinomas, sobre todo en no fumadores y mujeres alrededor de 50 años de edad. El mismo crizotinib parece ser capaz de inhibir líneas celulares con ROS1 alterado (50-51). Aún más recientemente se han descubierto translocaciones activadoras en RET, también en no fumadores, adenocarcinomas y exclusivas con el resto de las previamente descritas. En este caso fue descrito por tres grupos independientes y el gen con el que RET se transloca es KIF5B, conociéndose 7 variantes distintas en total (52-55).

El gen LKB1, responsable del síndrome de Peutz-Jeghers, es un supresor tumoral que puede estar mutado en adenocarcinomas y la vía PI3K-Akt-mTOR puede estar activada en la carcinomas pulmonares con mutaciones en PIK3CA (53).



**Fig. 1. Subtipos moleculares de Adenocarcinoma pulmonar. Modificada de Pao & Hutchinson, Nat Med 2012.**

## Introducción

En carcinomas escamosos se ha descubierto recientemente una alteración interesante, la amplificación de FGFR1, presente en el 22% de los mismos y además en fumadores, lo que supondría un gran avance en este subtipo de enfermedad tan falto de medicamentos novedosos y basados en la biología del tumor (56).

La heterogeneidad genética de los tumores pulmonares es la principal causa de que los pacientes con el mismo estadio e histología presenten distinta evolución. Por ello se han desarrollado perfiles genéticos y proteicos que intentan diferenciarlos en su pronóstico con independencia de los factores clásicos. Un ejemplo son los microarrays de expresión, y entre ellos Metagen predice la evolución de pacientes con estadio IA mejor que los factores clásicos (57), habiéndose identificado en otro caso un grupo de 5 genes que predice de forma independiente la supervivencia global y libre de enfermedad (58). Recientemente un grupo californiano ha desarrollado un test que analiza la expresión de 14 genes en muestras de parafina de adenocarcinomas pulmonares resecados, en los cuales identifica 3 grupos de bajo, intermedio y alto riesgo de recurrencia. Dicho test se validó en 2 cohortes independientes de 433 y 1006 pacientes y parece ser independiente del estadio, siendo útil en estadios I, II y III. Los perfiles de expresión de miRNA aún están en fase precoz de desarrollo clínico (59). Ninguno de los modelos desarrollados hasta la fecha ha pasado la barrera de la clínica, a diferencia del carcinoma de mama en el que existen 2 test de expresión génica y 1 de expresión proteica en el mercado (60-63).

También podría ser útil el análisis de dichas alteraciones en sangre periférica, habiéndose demostrado que es posible aislar ADN o células tumorales circulantes en pacientes con carcinoma pulmonar, analizando mutaciones específicas. (64-65).

El perfil de expresión de mRNA (o miRNA), no siempre se correlaciona con los niveles proteicos y no explica las interacciones proteína-proteína y las modificaciones post-translacionales como la fosforilación, que podrían ser críticas para la regulación de la actividad proteica (como ocurre con P-p38) (66). La forma más utilizada y sencilla de analizar proteínas de forma individual es la inmunohistoquímica (IHQ), que puede ser útil en el pronóstico y/o la predicción de respuesta a tratamiento. Más recientemente están surgiendo técnicas proteómicas como la espectrometría de masas o los microarrays proteicos que permiten ver redes de señalización completas en vez de individualmente. Estas técnicas son aplicables al tejido tumoral y a la sangre de los individuos enfermos, y se ha encontrado por ejemplo un perfil proteómico de predicción pronóstica en pacientes resecados de carcinoma pulmonar (67).

### 1.1.9. Factores pronósticos y predictivos:

Un marcador pronóstico es un indicador de la supervivencia global del paciente con independencia del tratamiento que reciba, es decir, es un indicador de la agresividad innata del tumor o del huésped. Un marcador predictivo es un indicador de la eficacia terapéutica, es decir, existe una relación entre una característica del paciente o del tumor y el tratamiento de cara al resultado terapéutico en el paciente. Clásicamente, los factores relacionados con el pronóstico en CPNM han sido el estadio de la enfermedad y el estado general del paciente, y en menor medida el género y la histología (68-69). En los últimos tiempos el conocimiento de la biología del CPNM conduce a un tratamiento adaptado a las características moleculares tumorales y no sólo a los aspectos clínico-patológicos tradicionales (21, 70). Algunos de estos marcadores son:

#### **Excision Repair Cross-Complementing 1 (ERCC1):**

Es una enzima del sistema del sistema de reparación por excisión de nucleótidos, que reconoce y elimina los aductos de platino. Sus niveles bajos de mRNA estudiados por RT-PCR se han relacionado con mayor supervivencia en pacientes con CPNM tratados con cisplatino y gemcitabina. El mecanismo sería la apoptosis celular por la incapacidad de reparación del daño provocado por el platino cuando los niveles del mismo son bajos. Esos bajos niveles podrían ser factor de buen pronóstico (71).

#### **Breast Cancer Gene 1 (BRCA1):**

Niveles bajos de esta proteína implicada en la reparación por recombinación homóloga, que también participa en la reparación del daño platino, parecen también correlacionarse con mejor sensibilidad al tratamiento con cisplatino (72).

#### **Subunidad M1 de la Ribonucleótido Reductasa (RRM1):**

Es una proteína esencial para la síntesis del ADN, transformando el ribonucleótido 5' difosfato (R5D) a deoxirribonucleótido 5' difosfato. La gemcitabina compete con el R5D en su incorporación al ADN, y la sobreexpresión de RRM1 se relaciona con menor eficacia de este agente, como se ha comprobado en un estudio en que los pacientes tratados con cisplatino y gemcitabina con baja expresión tumoral de RRM1 tenían mejor supervivencia que los que tenían niveles elevados (73).

#### **Timidilato sintasa (TS):**

Es una proteína implicada en la vía del metabolismo del ácido fólico. Adenocarcinomas y carcinomas de célula grande tienden a mostrar un menor nivel de expresión de la misma, con mejor supervivencia tras tratamiento con cisplatino-

## Introducción

pemetrexed (que interfiere la vía del folato), que aquellos con nivel altos, en especial los carcinomas escamosos (74).

### **Epidermal growth factor receptor (EGFR):**

Esta proteína pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico y actúa como tirosina quinasa, pudiendo activar entre otras, la vía de las MAPK. Para determinar su estado se utilizan fundamentalmente 3 métodos, análisis mutacional, determinación de número de copias génicas y nivel de expresión de EGFR.

A nivel clínico el más utilizado es el análisis mutacional por su relación con respuesta a un tratamiento específico. Las mutaciones con relevancia clínica son la delección del exón 19, la mutación L858R en el exón 21, ambas por relacionarse con mejor respuesta. La T790M se relaciona con resistencia tanto primaria como secundaria.

En principio la predicción de respuesta a inhibidores de la actividad quinasa de EGFR (gefitinib o erlotinib) se basaba en aspectos clínicos como sexo femenino, raza asiática, no fumadores y la variante bronquioloalveolar del adenocarcinoma. Sin embargo en los últimos años, numerosos estudios fase III han probado que la presencia de mutaciones parece ser el factor predictivo más importante, tanto para gefitinib como erlotinib. Los principales estudios se han dirigido a la primera línea en enfermedad metastásica (75-81), aunque también podrían tener un papel en la segunda línea y siguientes (82-86), así como en el mantenimiento en pacientes no seleccionados (87). El efecto pronóstico de dichas mutaciones no está claro, dado que la mayoría de los estudios se limitan a pacientes en tratamiento activo, y quizás la mayor supervivencia en los tratados tiene además que ver con un mejor pronóstico. Lo que sí parece claro es que en un futuro nuevos inhibidores que reviertan la resistencia a los ya comercializados se unirán al espectro terapéutico ya disponible (88), siendo el afatinib (un inhibidor irreversible de la kinasa de EGFR) de los más avanzados en desarrollo clínico, aunque quizás también en primera línea, como muestra el estudio *LUX-LUNG3* (89) y no en la progresión a inhibidores previos, donde parece no ser tan eficaz (90).

El análisis del número de copias de EGFR (FISH, Fluorescence in situ hybridization) podría tener un papel como factor predictivo de respuesta a Ac anti-EGFR (Cetuximab), aunque el trabajo inicial que proponía mejores resultados en pacientes con aumento del número de copias, no ha podido ser reproducido posteriormente, no encontrándose diferencias entre ambos subgrupos (aumento y no aumento) (91-92).

La expresión de EGFR analizada por IHQ no ha podido ser claramente relacionada con la predicción de respuesta a fármacos, tanto Anticuerpos monoclonales

como Cetuximab o inhibidores de la actividad tirosín-quinasa como Gefitinib (93-94), además no se ha demostrado correlación entre la existencia de mutación y expresión por IHQ (95). Lo que sí parece es tener un importante papel definiendo un grupo de peor pronóstico (96). Ha sido descrita su sobreexpresión en líneas celulares y muestras tumorales de pacientes con CPNM, asociándose con aumento en la proliferación, peor diferenciación, mayor incidencia de metástasis en ganglios linfáticos, así como una peor supervivencia. En un trabajo se estudió junto con HER-2, considerándose ambos factores de mal pronóstico y en otro similar junto con p53 y HER-2, en el cual EGFR fue considerado peor aunque no significativamente, con similares resultados para p53 y muy pocos casos con expresión de HER-2 (97-98). Se ha descrito más frecuentemente asociado a estadios III y fundamentalmente al subtipo histológico escamoso, encontrándose en este último que el pronóstico empeoraba si la expresión de EGFR se asociaba a la de p53 (99-100). Un reciente meta-análisis sugería que la expresión por IHQ de EGFR podría ser un factor de peor pronóstico en pacientes con CPNM (101).

### **p53:**

Es una proteína nuclear que bloquea la progresión de las células en el ciclo celular, con un papel fundamental en la regulación de los eventos nucleares, particularmente en respuesta al daño del ADN, radiación ionizante y varios carcinógenos, por lo que es considerado uno de los principales genes supresores tumorales (102). Como comentado previamente, las mutaciones en p53 son el evento más frecuente en los carcinomas pulmonares de fumadores (9-10).

La presencia de mutación en esta proteína evitaría su degradación y favorecería su acúmulo nuclear, detectable por medio de IHQ (103). Esta teoría motivó la realización de múltiples estudios que intentaron ver la influencia de dicha alteración en la supervivencia de los pacientes. Trabajos iniciales en carcinoma de vejiga parecían comprobar este hecho, al mostrar que había relación entre acumulación nuclear de p53 y mutación de dicha proteína, así como la tendencia a progresión y peor pronóstico entre lesiones iniciales en aquellos con acúmulo anómalo de p53 en núcleo (104).

Sin embargo, y sobre todo en carcinoma de pulmón, los trabajos posteriores han sido contradictorios y poco concluyentes. Una de las razones es la heterogeneidad en el método de detección de la alteración, en unos casos mutación y en otros expresión nuclear por IHQ, con una concordancia entre mutación y expresión IHQ más baja de lo esperable (entorno al 55%) (105-106). Además la expresión de p53 por IHQ podría ocurrir sin la necesidad de la existencia de la mutación génica, simplemente por

## Introducción

sobreexpresión de la proteína normal, pudiendo ser dicho acúmulo una respuesta al daño del ADN o a la alteración de otras vías tumorales (107-108). Lógicamente, en ocasiones puede ocurrir lo contrario, la presencia de mutación en p53 sin poder detectar dicha proteína en la IHQ (105).

Los múltiples trabajos que analizan el papel de p53 en la supervivencia de los pacientes con carcinoma pulmonar han sido revisados en dos meta-análisis publicados hace una década. Uno de ellos mostró que la alteración de p53 por IHQ y mutación se relacionaba con peor pronóstico, pero tan sólo era consistente en los adenocarcinomas, no en los carcinomas escamosos (109). En el otro se encontró que en ambas histologías era peor pronóstico, tanto para la IHQ, con independencia del anticuerpo utilizado, como para la presencia de mutación (110). Sin embargo la heterogeneidad de los trabajos al respecto es muy grande, tanto en la forma del análisis (mutación o sobreexpresión), las características clínico-patológicas de los pacientes (distinto estadio, tratamiento o no con quimio o radioterapia), así como en cuanto al número de pacientes incluidos. Como consecuencia no ha sido posible que p53 pueda ser establecido como un factor pronóstico estándar en carcinoma de pulmón, aunque sí a tener en cuenta.

### **Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2):**

HER2 pertenece también a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, con gran importancia clínica establecida en carcinoma de mama y gástrico, aunque en carcinoma de pulmón hay pocos trabajos con la suficiente potencia estadística para obtener conclusiones.

La sobreexpresión de HER2 por IHQ en CPNM puede considerarse baja, pudiendo variar entre 5-30%, aunque parece correlacionarse con un mayor estadio y con la histología adenocarcinoma, e incluso parece ser mayor en las metástasis (cerebrales) que en el primario (98, 111-112). La presencia de la sobreexpresión se correlacionó generalmente con peor pronóstico, que podría limitarse al adenocarcinoma (111, 113-114). Su asociación con otros marcadores como p53 podría influir en el peor pronóstico, incluso en estadios I (115).

En carcinoma de pulmón la amplificación por FISH de HER2 no ha podido ser demostrada con contundencia, pudiendo considerarse un 2-5% de positividad global. Dicha amplificación por FISH estaría limitada a los casos 3+, aunque no todos los casos 3+ podrían ser posteriormente FISH positivos (116). Más recientemente se han descrito mutaciones en HER2 en CPNM, siendo el dominio alterado el equivalente a la mutación

L858R del EGFR, lo que podría conferir sensibilidad a fármacos específicos en un futuro, aunque su frecuencia es baja (117).

#### **Translocación ALK:**

Como se ha comentado previamente, la presencia de esta translocación hace que se active dicha proteína tirosina quinasa. La forma de analizarla, en el momento actual es la realización de un FISH. Probablemente en un futuro sea suficiente con la realización de IHQ, pero aún no se ha logrado demostrar dicha posibilidad. Recientemente se ha publicado un ensayo fase II que demostraba una importante y duradera respuesta a un inhibidor de ALK llamado crizotinib, en un grupo de pacientes que previamente habían recibido quimioterapia, seleccionados por presentar dicha translocación (118). Incluso se conocen ciertos mecanismos de resistencia al tratamiento, siendo publicados a la vez que los primeros resultados de actividad del fármaco, lo que conllevó su aprobación, incluso antes de ensayos fase III aún en marcha (119).

#### **ROS 1 y RET:**

Con respecto a estas alteraciones más recientemente descritas, cabe destacar que el grupo que describió la translocación de ROS 1 refería en el mismo reporte que un paciente portador de dicha alteración había hecho una respuesta mantenida al menos 6 meses (50-51). Con respecto a RET, aún no se ha publicado nada al respecto en carcinomas pulmonares, aunque sí existen inhibidores de RET en ensayos clínicos publicados en otras patologías (120-121).

Probablemente en el futuro se impongan los métodos de análisis genómico masivo en vez del análisis gen a gen actual, abaratando costes y tiempo. Para ello se han creado el Internacional Cancer Genome Consortium y el Cancer Genome Atlas (122). Proponen la secuenciación del ADN completo (en un principio sólo la porción codificante) de cientos de tumores, incluyendo carcinomas pulmonares, pareados con tejido sano, con el fin de identificar la presencia de alteraciones genéticas recurrentes que permitan establecer nuevas dianas terapéuticas así como grupos pronóstico.

En esa misma línea de pensamiento podría plantearse el cambio tanto en la forma de seleccionar pacientes como en la forma de realizar los ensayos clínicos. En cada paciente se debería analizar su genoma en busca de mutaciones, su epigenoma en busca de aberraciones epigenéticas y su perfil de expresión diferencial, para así poder identificar alteraciones que se han denominado “accionables” en referencia a aquellas sobre las cuales puede incidirse de forma farmacológica (123).

## 1.2. Vía de las MAPK:

### 1.2.1. Vía de las MAPK y procesos de señalización celular:

En los últimos años se ha descrito que en la biología del cáncer no sólo es importante la célula tumoral por sí misma, sino también el entorno que la rodea y las relaciones que establece con él, tanto de forma local como a distancia, adquiriendo una serie de cualidades que le permiten sobrevivir en condiciones adversas. Entre dichos mecanismos, que han sido revisados recientemente, está la autosuficiencia proliferativa en ausencia señales de crecimiento, que normalmente sólo ocurre en situaciones fisiológicas como el desarrollo embrionario, o patológicas como la cicatrización o la regeneración epitelial (124). Para ello la célula tumoral utiliza para su beneficio factores de señalización extra e intracelular, agrupados en cascadas de señalización.

Una de las principales vías es la de las MAPK (mitogen-activated protein kinases), que consiste en un conjunto de proteínas altamente conservadas filogenéticamente cuya misión es fosforilar a otras y así regular el crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular (125). Esta vía consiste en una cascada de proteín-kinasas que conectan las señales extracelulares de crecimiento con la transcripción nuclear. De forma genérica los receptores de factores de crecimiento situados en la membrana celular y diversas tirosín-kinasas activan Ras, que luego activa a Raf, éste a MEK y finalmente las MAPK, que se trasladan al núcleo y regulan la transcripción a través de la fosforilación de diversos factores. De forma muy resumida se puede decir que la señalización por MAPK consiste en tres módulos de kinasas que se fosforilan de forma consecutiva de modo que la MAPK es fosforilada por una MAPKK (MAPK kinasa, MAP2K), que a su vez se activa por una MAPKKK (MAPKK kinasa, MAP3K) (126).

Este conjunto de factores tiene importancia clínica en cáncer, en el *diagnóstico* (translocación COL1A1-PDGFR $\alpha$  en dermatofibrosarcoma protuberans), *pronóstico* (HER-2 neu en cáncer de mama, EGFR en carcinoma de pulmón), *predicción* de respuesta (HER 2 en cáncer de mama, EGFR en cáncer de pulmón, mutación de KRAS en cáncer de colon), y *tratamiento* (cetuximab y panitumumab, Ac monoclonales anti-EGFR; trastuzumab, anticuerpo monoclonal anti-HER2; erlotinib y gefitinib, péptidos miméticos TKI de EGFR; imatinib, inhibidor TK de PDGFR $\alpha$  y c-kit; sorafenib, inhibidor de Raf, PDGFR $\alpha$  y varias kinasas más, así como vemurafenib, inhibidor de BRAF V600E en melanoma) (127-129).

Hasta la actualidad se conocen seis tipos de MAPK, que se pueden agrupar en tres fundamentales: Extracellular signal-regulated kinase (ERK), Jun N-terminal kinase (JNK), y p38 MAPK. JNK y p38 se denominan SAPK (MAPK activadas por estrés) y actúan en respuesta a estímulos como hipoxia, ausencia de nutrientes, inflamación y estrés metabólico por desregulación de procesos energéticos, activándose también por estrés genotóxico y farmacológico derivados del tratamiento con quimio y radioterapia, con gran importancia en la inflamación, respuesta al daño en ADN y apoptosis.

La vía de ERK, que es la más estudiada, es una vía proliferativa y se considera pro-oncogénica, encontrándose alterada en un tercio de los tumores humanos. ERK 1/2 es la MAPK, MEK la MAPKK, y Raf la MAPKK, que es activado por Ras. A diferencia de las otras dos MAPK, ERK se activa por factores de crecimiento y su papel es fundamental en la transducción de señales al interior celular, pudiendo considerarse el prototipo clásico de MAPK. Una vez activada, actúa fosforilando numerosos factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto u otras proteínas reguladoras que incluyen otras kinasas (130).

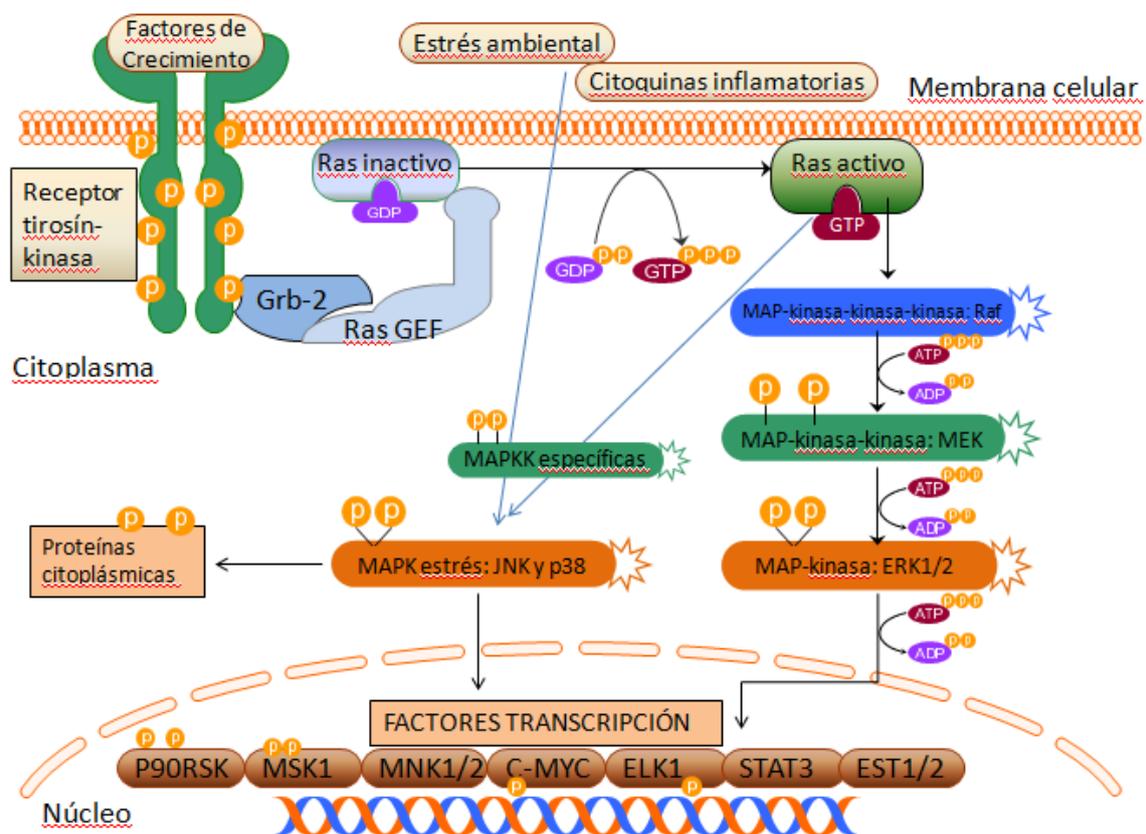


Fig. 2. Esquema general del funcionamiento de la vía de las MAPK, con la activación genérica por la vía Ras-Raf-MEK-ERK y vías alternativas. Modificado de Biocarta.

## Introducción

En cuanto a JNK, la familia está formada por tres genes, jnk 1, 2 y 3, cuya expresión es variable dependiendo de los tejidos (125). Su activación requiere una doble fosforilación, y una vez activada se transloca al núcleo desde el citoplasma. Como se describe más adelante, junto con p38, con la que presenta múltiples interrelaciones, regula numerosos procesos fisiológicos y patológicos, estando implicada en patología inflamatoria, enfermedades degenerativas así como en el desarrollo tumoral (131). En este último apartado, el papel de JNK se puede considerar como dual, ya que puede comportarse como un supresor tumoral en respuesta a estímulos lesivos (estrés oxidativo o genotóxico), bien a través de p53, o por su efecto pro-apoptótico como antagonista de NF- $\kappa$ B y por el otro lado, puede comportarse de modo pro-oncogénico siendo su principal sustrato el factor de transcripción c-Jun, que refuerza la actividad transcripcional de AP-1 (132-133). Lo más probable es que su efecto global en el desarrollo tumoral provenga del balance entre ambas funciones, que será distinto en cada situación celular (134).

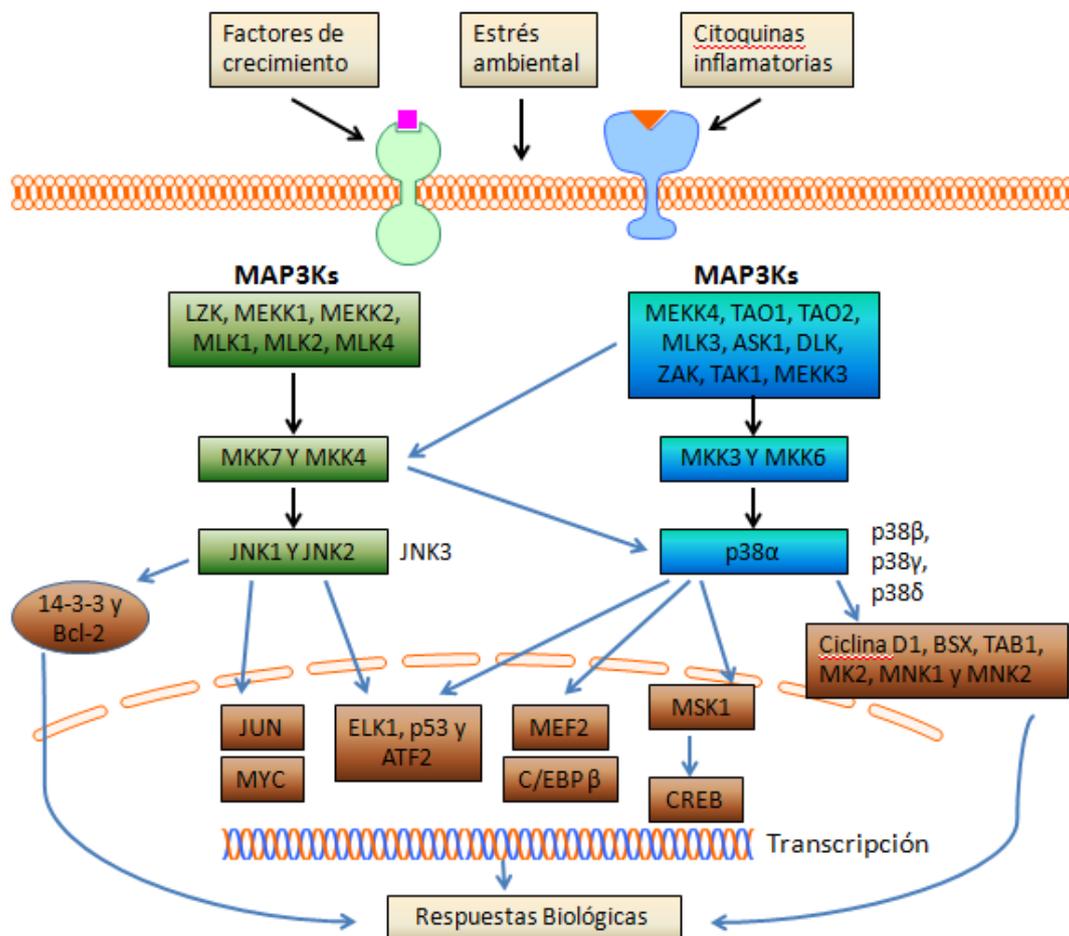


Fig. 3. Resumen de la señalización por JNK y p38MAPK, donde se aprecian las interconexiones entre ambas. Modificado de: Wagner & Nebreda. Nat Rev Cancer 2009.

### 1.2.2. Caracterización funcional y estructural de p38MAPK:

La proteína p38 MAPK, también llamada RK, SAPK2A ó CSBP está codificada por el gen MAPK14 localizado en el cromosoma 6p21.3-p21.2. Se han descrito otras tres isoformas, codificadas cada una por un gen distinto. Por ello tenemos 4 isoformas: p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (ERK6 ó SAPK3) y  $\delta$  (SAPK4), siendo las más relevantes y estudiadas la  $\alpha$  y la  $\beta$ . Mientras que  $\alpha$  y  $\beta$  tienen un patrón de expresión más ubicuo,  $\gamma$  y  $\delta$  tienen un patrón más limitado a músculo esquelético, corazón y pulmón (135).

El gen de p38 $\alpha$ MAPK es el ortólogo mamífero del Hog1 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica a HOG (high osmolarity glycerol response), MAPK osmosensora descubierta a principios de los 90 (136). Posteriormente se describió al homólogo mamífero como una MAPK estimulada por endotoxinas e hiperosmolaridad, que se diferenciaba del resto de MAPK por la fosforilación específica en Thr180 y Tyr 182 de la proteína p38 $\alpha$ , formando el triplete aminoacídico TGY a diferencia del TEY del resto de MAPK (137). Poco después fue descrita en células humanas formando parte de una cascada de proteín-quinasas activadas en respuesta a diversos tipos de estrés, que activaban proteínas de choque térmico (138).

La vía de p38 es activada por diversos tipos de estrés, como el choque osmótico, citoquinas inflamatorias, lipopolisacárido (LPS), luz ultravioleta y factores de crecimiento. Esta activación se produce tras su fosforilación por MAPKK kinasas, como MTK1, MLK2-3, DLK y TAK1 y las subsiguientes MAPK kinasas, como MKK3-4-6, las cuales juegan un papel como marcadores de su activación. También se han descrito otras dos formas de activación no canónicas, mediadas por autofosforilación en respuesta a la interacción con MAP3K7IP1/TAB1, que participa en la respuesta al TGF $\beta$ , o por la activación del TCR en linfocitos, que fosforila una Tyr diferente (139).

Una vez activada se separa del complejo que la mantiene estable en el citoplasma y se transloca al núcleo, aunque se conoce también su actividad citoplásmica (140). Sus sustratos incluyen a otras kinasas, como MK-2, reguladores transcripcionales como ATF2, MEF2C, reguladores del ciclo celular, como CDC25B, y supresores tumorales como p53. Su actividad es inhibida por fosfatasa duales de MAPK (que actúan sobre JNK y p38), como son las proteín-fosfatasa 2C y Wip1 (Wild type p53 induced phosphatase 1), que eliminan sus residuos fosfato. Un trabajo reciente que analiza expresión génica ha mostrado cómo distintas vías de activación de p38 conducen a distintos patrones de expresión dependientes de p38 (141).

Según lo descrito, p38 se regula por fosforilación, no por transcripción, por lo que sus niveles de expresión no se modifican sustancialmente tras su activación, sino su nivel de fosforilación, por lo que es difícil estudiar su papel mediante el análisis de la expresión génica, y hay que recurrir al estudio de los niveles de fosforilación o la detección de la proteína fosforilada, y también serán útiles las nuevas tecnologías que permiten analizar perfiles proteómicos y arrays de kinasas.

### 1.2.3. Papel de p38 en distintos procesos fisio-patológicos:

Existen numerosas evidencias a favor del papel de p38 $\alpha$  como supresor tumoral, que está mediado por la regulación negativa de la progresión del ciclo celular y la inducción de la apoptosis, mientras que la inducción de diferenciación terminal contribuye de forma positiva a sus funciones supresoras tumorales (142). Sin embargo p38 $\alpha$  puede tener funciones oncogénicas, mediadas por su relación con procesos clave en la progresión del cáncer como son la invasión, inflamación y angiogénesis (143). Antes de estudiar el papel de p38 en tumorigénesis, se analizará su papel en procesos no directamente implicados en cáncer de una forma directa, pero con relevancia clínica y relación indirecta que permitirán conocer mejor su función.

#### 1.2.3.1. Papeles fisiológicos de p38:

**Desarrollo embrionario:** En *Drosophila*, p38 participa en la posición de los ejes corporales (144). En mamíferos su estudio es más complicado, por la existencia de varias isoformas redundantes, aunque tiene un papel crucial en la embriogénesis (145).

**Diferenciación celular:** p38 participa en la diferenciación de diversos tipos celulares, como las células  $\beta$  pancreáticas (146), o los progenitores hemopoyéticos, por lo que se ha postulado su posible inhibición terapéutica en la anemia aplásica (147).

**Organogénesis:** p38 $\alpha$  se localiza en las porciones distales de las ramificaciones broncogénicas en las células endodérmicas y su inhibición provoca disminución del número de ramificaciones (148), que podría ser mediado por la regulación negativa de E-Cadherina. Un modelo knockout condicional de p38 Cre-Lox en células epiteliales bronquiales resalta su papel en la regulación de la homeostasis pulmonar *in vivo* (149).

**Migración celular:** p38 $\alpha$  está implicada en la transmisión de señales quimiotácticas al interior celular, claves para la motilidad celular. Por ello podría ser importante en embriogénesis y reparación de daño tisular.

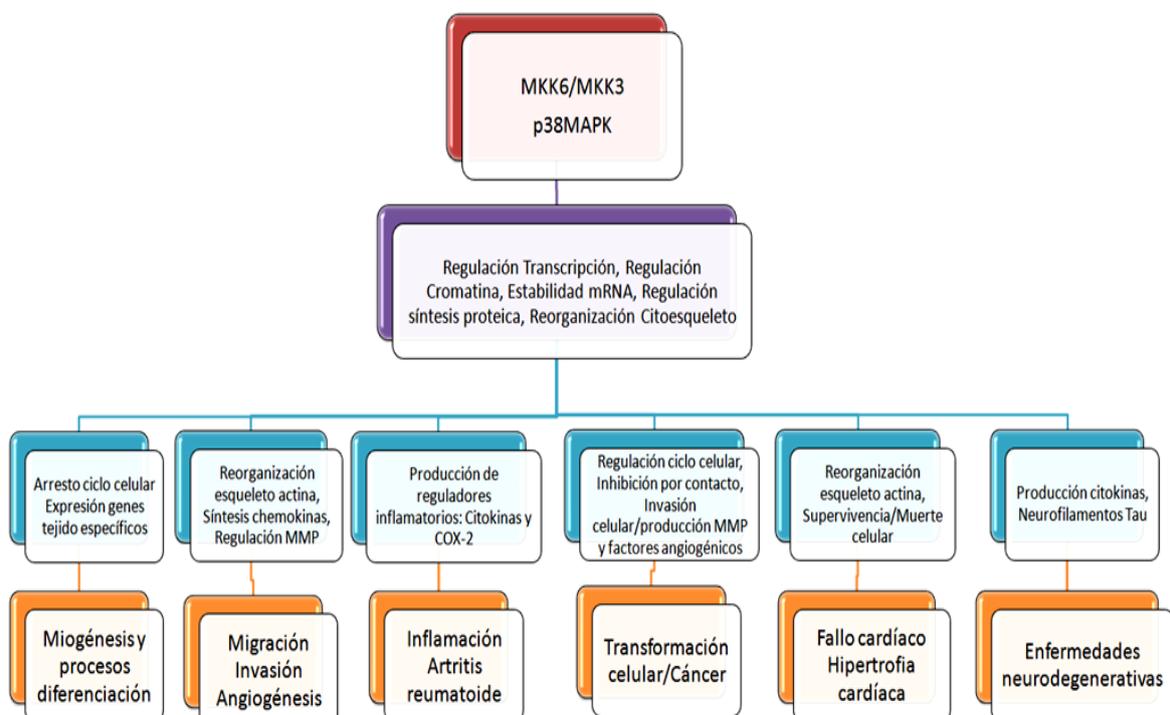
### 1.2.3.2. Papel de p38 en procesos patológicos no tumorales:

**Inflamación:** p38 participa en respuesta a la lesión celular de forma fisiológica, aunque lo más conocido es su papel patológico (150). Regula la síntesis de citoquinas y otros mediadores inflamatorios a nivel traduccional, al interactuar con la región ARE en los 3'-UTR de dichos genes (151). El papel indirecto de p38 en las enfermedades inflamatorias ha hecho que se estudien inhibidores de en el tratamiento de las mismas, aunque de momento la eficacia es limitada y la toxicidad importante (152).

**Dolor:** p38, así como el resto de MAPK son elementos muy importantes en la vía del dolor, tanto por la vía inflamatoria como por un mecanismo directo por su activación glial, comprobado en modelos de daño neuronal (153).

**Disfunción cardiovascular:** en modelos animales p38 se relaciona con el desarrollo de hipertensión y apoptosis-necrosis tras lesiones isquémicas cardiacas, al alterar el citoesqueleto y provocar hipertrofia por las señales de estrés (154).

**Enfermedad de Alzheimer:** se ha demostrado que el acúmulo de  $\beta$ -amiloide y la microglía activan la vía p38, siendo tanto p38 como JNK capaces de fosforilar a Tau, por lo que junto con otros mecanismos, podrían contribuir a su hiperfosforilación y así al aumento de acúmulo de sus neurofilamentos (155-156).



**Fig. 4. Resumen de los distintos mecanismos fisiopatológicos en los que se implica a p38 MAPK. Modificado de Cuenda, A et al. Biochimica et Biophysica Acta, 2007**

### 1.2.3.3. Regulación de la tumorigénesis por p38 $\alpha$ :

p38MAPK se considera supresor tumoral por su acción reguladora negativa del ciclo celular, en relación con la respuesta al estrés por contacto y al daño por radicales libres (139), relacionados directa o indirectamente con la senescencia inducida por oncogenes y *dormancy*. Sin embargo exhibe también funciones tumorigénicas, en relación con la inflamación, migración celular, invasión y angiogénesis (142).

**Regulación del ciclo celular:** p38 regula *negativamente* la progresión del ciclo celular, a nivel G1/S y G2/M. El retraso en la transición G1/S, se produce por p38 en respuesta a estrés, tanto a nivel transcripcional (disminuyendo la ciclina D1), como fosforilativo (degradación de Ciclinas D, Cdc25A, etc.) (139). Modula la expresión y actividad de p53, y puede bloquear el ciclo en G1/S en la inhibición celular por contacto, a través del inhibidor de CDK p27<sup>Kip1</sup>, así como activando a los inhibidores de G1 p16<sup>INK4a</sup> y p19<sup>ARF</sup> (142). p38 $\alpha$  inhibe la transición G2/M en respuesta a radiación gamma o citotóxicos por medio de MK2, al unirse Cdc25B fosforilado al inhibidor mitótico 14-3-3 (157). Sin embargo también puede regularlo positivamente en función del tipo y grado de malignidad celular, como se ha visto en condrosarcomas (158).

**Regulación de la supervivencia celular y apoptosis:** Suele *inducir apoptosis* en respuesta a estrés (159), fosforilando e inactivando factores anti-apoptóticos, activando proteínas pro-apoptóticas o fosforilando a EGFR, provocando su internalización y consecuente apoptosis vía p53 (160). Se ha demostrado su implicación en el balance apoptosis-autofagia en respuesta a fluoropirimidinas (161). En ocasiones es *anti-apoptótica*, al inducir diferenciación y parada del ciclo y reparación de ADN, como se ha observado en células de CPNM tras exposición a radiación (162).

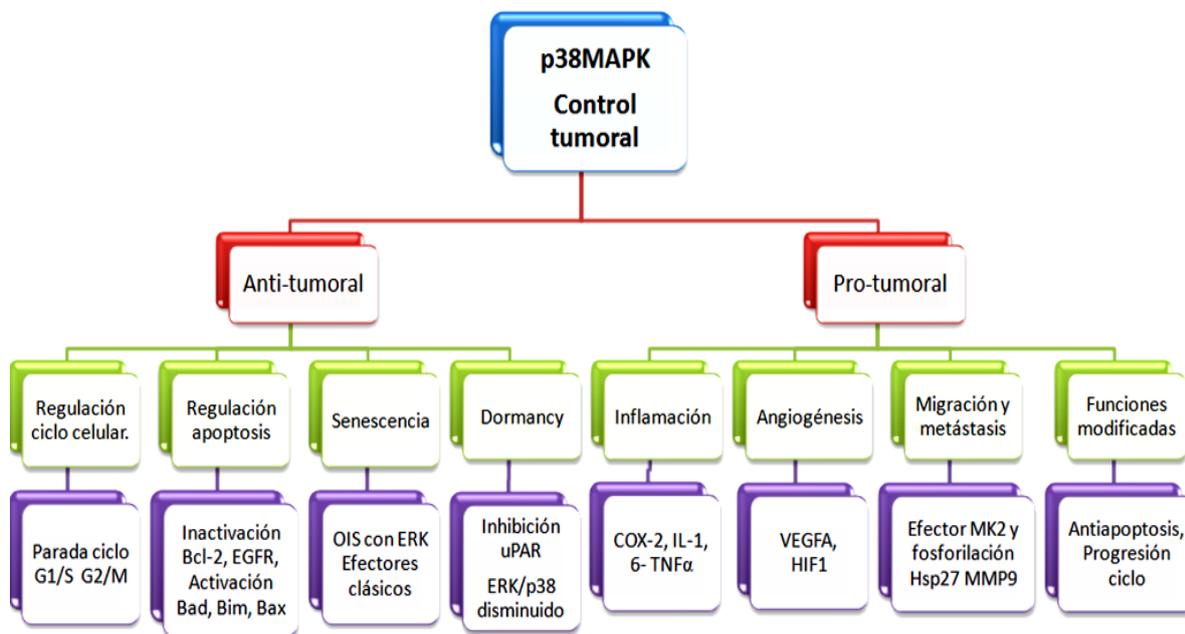
**p38 y Senescencia:** Consiste en un estado celular irreversible de reposo celular, provocado por estímulos de estrés como acortamiento telomérico, drogas, oxidantes, etc. Junto a ERK1/2, p38 $\alpha$  contribuye a la activación de la senescencia inducida por oncogenes (OIS), con la participación de sus efectores entre los que está p53 (163).

**“Dormancy”:** Es un estado celular similar a la quiescencia, con parada en G0-1, sin crecimiento ni proliferación celular y resistencia a quimioterapia, lo que favorecería la aparición de metástasis tardías. El diálogo entre microambiente y célula tumoral juega un papel muy importante en la inducción de *dormancy*, que precisa de la inhibición de vías de proliferación, como la disminución de uPAR y secundariamente EGFR y ERK, así como la activación de vías de estrés como p38MAPK. En *dormancy*

por tanto, el ratio ERK/p38 suele ser bajo, mientras que las lesiones metastásicas activas, con alto índice de proliferación tumoral, presentan elevación del mismo (164).

**Inflamación, migración, angiogénesis y metástasis.** p38 $\alpha$  regula la inducción de COX2 y citoquinas como TNF $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (interleuquinas), que tienen actividad pro-inflamatoria, pro-supervivencia y angiogénica, pero también podría favorecer la invasión tumoral y angiogénesis de forma independiente a la inflamación, con cambios en la matriz extracelular (165), o aumentando la extravasación tumoral (166).

Otra vía sería la regulación positiva de VEGFA, factor inductor de supervivencia tumoral y angiogénesis, y de HIF1 $\alpha$ , clave en la expresión de factores angiogénicos tras hipoxia y una revisión reciente ha puesto de manifiesto que la señalización por la vía de p38 participa en los diferentes pasos del proceso metastásico, sugiriendo que la célula tumoral necesita modular de forma adecuada la actividad de p38MAPK para conseguir metastatizar de forma eficaz (167).



**Fig. 5. Resumen de la regulación de la tumorigénesis por p38MAPK.**

#### 1.2.4. Quimioterapia y p38 MAPK:

Diversos estudios han implicado a esta proteína con la regulación de la acción de distintos agentes quimioterápicos, la resistencia a los mismos, sus efectos adversos y su toxicidad, aunque la mayoría de ellos se han realizado de forma preclínica, con líneas celulares y/o modelos animales. Clásicamente se ha atribuido a dicha proteína un papel en la resistencia a platino, aunque interacciona con muchos otros agentes.

### **1.2.4.1. Mediación de respuesta y resistencia a CDDP por MAPK:**

El Cisplatino (Cis-diamin-dicloro-platino, CDDP) es el principal representante de su familia, introducido hace 35 años y básico en el tratamiento de diversos tumores, incluido el pulmón. Su acción antitumoral se atribuye a la producción de aductos inter-intracatenarios con el ADN, alterando su estructura, transcripción y reparación (168). A pesar de que la unión del CDDP al ADN y los daños producidos inducen muerte celular, sólo el 10% del mismo se une a ADN, mientras que el resto se une a ARN, proteínas del citoesqueleto y membrana celular, por lo que se especula que podrían existir mecanismos alternativos de apoptosis por platino desconocidos (169).

Dado el papel de las MAPK en la respuesta al estrés celular, en los últimos años ha surgido el interés por su estudio en relación con los efectos del CDDP, siendo su activación fundamental en la decisión del destino celular en respuesta al mismo, aunque su papel es controvertido, pudiendo inducir no sólo apoptosis sino lo contrario en función del tipo celular, grado de diferenciación o estado proliferativo, pero sí está claro que las MAPK y en particular p38 $\alpha$ , regulan los efectos del CDDP de forma crucial y la alteración en su señalización podría ser uno de los mecanismos de resistencia (170).

En CPNM se ha investigado la modulación por p38 de la respuesta a platino en relación con el balance entre sus MAPK kinasas, MK3 y MK6. La sensibilidad celular al CDDP precisa de la presencia de P-p38, mientras que el diálogo entre MK3 y MK6 regularía la resistencia, de modo que las células resistentes presentan mayor nivel de MK3 basal, impidiendo la activación de p38 en respuesta a CDDP (171). Entre otros mecanismos está el papel de p38 en la internalización de EGFR, permitiendo al CDDP provocar muerte celular (160), o la activación tras el daño al ADN de c-Abl, que a su vez activa p38, haciéndose las células deficientes en c-Abl resistentes a la apoptosis al no poder activar p38; al contrario Rac-1 impide la apoptosis mediada por p38 (172).

### **1.2.4.2. p38 y toxicidad de la quimioterapia**

p38 se ha implicado en la mediación de la toxicidad de la quimioterapia, debido a su conocido papel en la respuesta inflamatoria. En este sentido, la astenia inducida por quimioterapia podría estar regulada por medio de p38, puesto que un estudio puso de manifiesto que la administración de distintos agentes (doxorrubicina, etopósido ó 5-Fluorouracilo) aumentan la producción de citoquinas pro-inflamatorias macrofágicas tras ser activada esta proteína, disminuyendo dicho efecto con su inhibición (173).

Otro estudio realizado también en un modelo murino *in vivo*, investigó el papel de p38 en la nefrotoxicidad inducida por CDDP, demostrando que la activación de TNF $\alpha$  en el túbulo renal mediaba en parte el daño tubular. Dicha activación es mediada por p38 y su inhibición impedía la producción de TNF, disminuyendo el daño renal (174). Un estudio posterior reprodujo los resultados viendo atenuada la nefrotoxicidad del CDDP con inhibidores de p38 (175).

### **1.2.5. p38 y MAPK (JNK, ERK) en tumores humanos y su implicación clínica:**

Aunque existen numerosos trabajos que investigan el papel de las MAPK en cáncer, la gran mayoría han sido realizados en modelos murinos y líneas celulares tumorales humanas investigando la vía de p38, JNK o ERK en particular o la de las MAPK en general, habitualmente analizando el papel de las mismas en la regulación de la proliferación celular y tumoral, en la mediación de la respuesta a drogas antitumorales o en su toxicidad. Sin embargo, son escasísimos los trabajos que lo hacen estudiando cohortes de pacientes para analizar las alteraciones de las mismas en relación con otras variables clínico-patológicas como estadio o agresividad tumoral y secundariamente con el pronóstico de estos pacientes.

En relación con la mutación de las MAPK, p38 prácticamente no se ha encontrado mutada en tumores humanos, aunque sí se han encontrado dichas alteraciones en proteínas implicadas en su vía de señalización en mamíferos y líneas celulares humanas, tanto en proteínas de la vía canónica de MAPK, con mutaciones inactivantes en MKK4, en el 5% de cánceres pancreáticos, pulmonares, mama, colon y próstata (176), como en las fosfatasa inhibidoras de MAPK PPM1D y DusP26 (177-178). Estudios de secuenciación a gran escala han identificado mutaciones somáticas en varios puntos de la vía de p38 MAPK en un pequeño número de tumores, pero no la proteína p38 en particular (179). Estrictamente en p38 y en tumores humanos sólo se ha descrito una mutación definida en una línea celular (P322RL) y en otro estudio simplemente la existencia de mutación en menos de un 1% de las muestras (180).

La activación de la vía, estudiada por medio de anticuerpos anti-proteína fosforilada (P-p38, P-JNK o P-ERK), ha sido descrita en varios trabajos que se describirán a lo largo de este epígrafe. En un principio se comentarán los trabajos generales, para luego focalizar la revisión en tumores pulmonares.

#### 1.2.5.1. Trabajos no centrados en CPNM:

- Un estudio inicial con muestras tumorales humanas de neoplasias de mama, pulmón, colon, ovario, riñón, etc., encontró que la activación de p38 era escasa en los tumores y se correlacionaba con el estadio, mientras que era intensamente positiva en tejidos normales y órganos adyacentes, por lo que se especulaba que sería detectable en tejidos sanos, pero no en tejido tumoral donde su actividad estaría inhibida (181). Sin embargo este hallazgo no se corresponde con lo observado en la mayoría de los trabajos, como se detallará a continuación.
- Un análisis de P-p38 en carcinoma de colon por western-blot, puso de manifiesto la positividad nuclear y citoplásmica en un 90% y 70% de casos, con negatividad prácticamente absoluta en tejido sano. Esta activación no se asoció con las variables clínico-patológicas edad, sexo, estadio, o histología (182).
- En un trabajo sobre carcinoma de mama, se utilizó IHQ cuantitativa para analizar P-p38 y también P-JNK. P-p38 no se correlacionó con el tamaño tumoral, ganglios axilares ni con los receptores hormonales, encontrándose niveles elevados de P-p38 fueron más frecuentes en pacientes menores que mayores de 50 años, sin analizar la supervivencia (183).
- Otro trabajo en carcinoma de mama centrado en la expresión de COX-2, analizó P-ERK y P-p38, por medio de IHQ. En este caso consideró positiva la presencia de tinción nuclear de p38 si era mayor o igual al 50% y también la citoplásmica (aunque con distintos parámetros), mientras que para ERK la simple presencia de tinción nuclear se consideró positiva. No se analizó supervivencia en función de las mismas y no se modificó su nivel en función de los niveles de COX-2, mostrando ambas aproximadamente un 40% de positivities (184).
- En la misma época se publicó otro trabajo en carcinoma de mama que estudió los niveles de las tres MAPK fosforiladas por medio de IHQ e inmunoblotting (IB) en pacientes con derrame pleural metastásico. Para la IHQ en este caso se consideró un score de 0 a 4 nuclear para las MAPK, considerándose positivo cualquier tinción a partir del 5%. La expresión nuclear por IHQ de JNK y p38 fue mayor en los líquidos afectados que en los tumores primarios, con casi un 100% de líquidos pleurales positivos por IB para ERK, JNK y p38. Esta última se correlacionaba significativamente con peor supervivencia (185).

- P-p38 también ha sido estudiada en carcinoma renal por IHQ, construyendo un score basado en la intensidad y el porcentaje de células positivas. Los niveles de P-p38 aumentaban con el grado tumoral y con el grado de apoptosis (al contrario de lo presumido) a pesar de que P-p38 se relacionaba inversamente con bcl-2. No se asoció con tamaño tumoral, ni pareció influir en la supervivencia (186).
- Un trabajo que analizó también por medio de IHQ la vía de MAPK (P-ERK, P-JNK y P-p38) en melanomas y lesiones melánicas premalignas, consideró positiva cualquier tinción en más del 5% de las células. Se encontró que JNK parecía ser muy frecuentemente expresada en lesiones premalignas, y también aunque menos en lesiones malignas primarias y metastásicas. También se encontró expresión de p38, así como ERK en núcleo y citoplasma en las lesiones malignas. La expresión de las tres MAPK se mostraba asociada entre sí y para JNK y p38 significaba tumores más agresivos y peor supervivencia libre de recurrencia, concluyendo los autores que probablemente el papel de JNK sea distinto en función del proceso evolutivo tumoral, protegiendo en fases iniciales y confiriendo agresividad cuando la malignidad está establecida (187).
- En un trabajo reciente, el análisis de la expresión IHQ de ERK y p38 en 99 adenocarcinomas pancreáticos mostró una relación entre la expresión de los mismos y peor supervivencia tanto global como libre de recurrencia, entre los pacientes que no recibieron quimioterapia adyuvante. También se analizaba la MKK4, que se asoció a un mayor índice proliferativo (188).
- Otro trabajo reciente, en este caso en carcinomas del área ORL tratados con radioterapia, se midieron los niveles en plasma de p38 antes, durante y después del tratamiento, demostrando en los pacientes respondedores que sus niveles de p38 descendían significativamente. Se trataba de una cohorte fundamentalmente con estadios T altos y N positivos y curiosamente los niveles de p38 pretratamiento eran superiores entre aquellos con menor estadio inicial (189).

#### **1.2.5.2. Trabajos centrados en CPNM:**

- Un estudio analizó globalmente las tres MAPK en 19 casos de CPNM y CPM, por medio de western-blot e IHQ, analizando la activación de la vía estudiando la presencia de proteína fosforilada en los tres casos, observando que la única de las tres rutas activada fue la de p38. No se encontró correlación entre la histología,

## Introducción

estadio y otras variables clínicas con la activación de p38. Tampoco se encontró activación de p38 tras hipoxia en líneas celulares de CPNM (190).

- Un trabajo publicado en dos artículos observó la vía de MAPK por medio de IHQ en 108 tumores pulmonares resecados. Se consideró positiva p38 y ERK cuando lo era en al menos el 15% de células, tanto en núcleo como citoplasma, con correlación entre casos positivos en núcleo y citoplasma para ERK; para JNK se consideró expresión positiva si al menos 50% de las células la presentaban. Los resultados mostraron que JNK se asociaba sobre todo a tumores iniciales, mientras que ERK lo contrario, sin diferencias para p38. En el caso de las SAPK (JNK y p38) en ambas hubo tendencia a mejor pronóstico en los casos positivos, mientras que ERK se correlacionó con peor pronóstico. (191-192).
- El análisis de una población asiática, que estudió P-p38 y Smad4 en CPNM resecados, puso de manifiesto el mejor pronóstico con la baja expresión por IHQ de P-p38, que asimismo se correlacionaba con los niveles de Smad 4 y con el estadio (193). Un estudio previo del mismo grupo correlacionó P-p38 con el estadio tumoral y la afectación ganglionar, P-ERK con el subtipo histológico, estadio y ganglios y P-JNK con la localización tumoral. Construyeron un modelo multivariante en el que los pacientes con CPNM con expresión negativa de P-p38, estadio clínico I, ausencia de metástasis ganglionares y buena diferenciación tumoral tenían mejor pronóstico (194). En ambos estudios los pacientes no habían recibido quimioterapia.
- Otro grupo también cuantificó por IHQ las tres MAPK fosforiladas en 188 muestras quirúrgicas de adenocarcinoma pulmonar sin quimioterapia previa, correlacionando los resultados con la historia de tabaquismo. Se observó que los no fumadores presentaban mayor nivel de expresión de P-p38 (y P-JNK) que la población no fumadora. Tras realizar un análisis multivariante con edad, sexo e histología, la única que se mantenía independiente era p38 (195).
- Un trabajo más reciente estudió la vía MAPK y PI3K por IHQ y su papel en la supervivencia de pacientes con carcinoma pulmonar tratados con quimioterapia adyuvante, utilizando el H score para clasificarlos. Se encontró un 27% de casos P-ERK1/2 positivos, los cuales presentaban mejor pronóstico, mientras que ocurría lo contrario con P-Akt1. También estudió ERK1/2 no fosforilada, siendo su expresión mayor (50%) y asociándose también a mejor pronóstico (196).

### 1.2.5.3. Inhibición de p38 como terapia:

Como se ha comentado previamente, gran número de pequeñas moléculas inhibidoras de p38 MAPK han sido estudiadas para tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, con resultados insuficientes y tóxicos hasta el momento. En relación al cáncer, es bien conocida la relación de la inflamación crónica con su desarrollo y las citoquinas son importantes factores de supervivencia para las células cancerosas, por lo que la inhibición de p38 podría ser beneficiosa en el tratamiento de tumores asociados a la inflamación como páncreas o colon y fundamentalmente en aquellos tumores que utilizan la actividad de dicha proteína para su progresión (143).

Aunque la inhibición de p38 podría realizarse de forma individual en monoterapia, parece que su combinación con fármacos citotóxicos y genotóxicos podría ser más eficaz, impidiendo la parada del ciclo celular y reparación de ADN que media p38 en condiciones normales, lo cual provocaría muerte de la célula tumoral (157). De ese modo aumentaría la sensibilidad al efecto de las drogas quimioterapéuticas que habitualmente actúan sobre células en división (197).

Por otro lado, dadas las acciones tumorigénicas que p38 puede controlar tanto en la célula tumoral como en el microambiente, así como su papel dual como oncogén y gen supresor, es importante considerar el tipo celular y el estadio antes de intentar modular su actividad. También sería interesante considerar, dado el papel de p38 como supresor tumoral, que quizás su inhibición en tejido sano podría conllevar un aumento en la predisposición al cáncer, por lo que se ha especulado incluso con lo contrario, su activación farmacológica inhibiendo sus fosfatasa como estrategia a explorar para sensibilizar a las células cancerosas a la muerte por apoptosis, con la temida contrapartida del aumento de inflamación, angiogénesis e invasión (143).

En consonancia con todo lo anterior, en el Congreso ASCO 2.012 se presentó en sesión oral, dentro de la sección Developmental Therapeutics, el primer ensayo fase I de la molécula LY2228820, inhibidor oral de p38MAPK, en diversos tipos tumorales. Se trataba de un trabajo inicial en el que se buscaba obtener una dosis adecuada, sin haberse encontrado respuestas objetivas (reducción en el tamaño tumoral en más de un 30%), pero sí estabilización de la enfermedad en 15/58 pacientes, que fue de larga duración en 5 de ellos (198).

## Introducción

Por todo lo expuesto a lo largo de esta introducción, además de los factores clásicos utilizados desde hace años en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de pulmón, es necesaria la búsqueda de nuevos elementos basados en los conocimientos moleculares, que ayuden a estratificar a los pacientes a recibir o no una quimioterapia que de por sí es tóxica y conlleva riesgos sobreañadidos a la propia enfermedad o bien que ayuden a estrechar el seguimiento en aquellos que puedan tener peor pronóstico.

En cuanto a p38, a pesar de los diversos estudios incluso en carcinoma pulmonar sobre su expresión tisular, los datos son escasos y no permiten obtener conclusiones claras, además prácticamente en ninguno de ellos se analizan datos relacionados con los resultados de la quimioterapia. Su estudio en carcinomas pulmonares resecados, ofrece una plataforma para investigar las interacciones de las proteínas de la vía entre sí, la posible redundancia o contraposición en sus papeles, así como su valor pronóstico en dichos pacientes. Otras proteínas como p53, HER-2 y EGFR podrían ser interesantes para ver su interacción con p38 antes y después de su activación y al mismo tiempo hacer una revisión sobre su propio papel pronóstico.

## **2. Objetivos**

---



- **Objetivo primario:**

Analizar p38 y varios de los componentes implicados en la vía señalización de las MAPK (JNK, ERK, p53, EGFR, HER-2) en relación con la supervivencia en los pacientes con carcinoma de pulmón estadio localizado.

- **Objetivos secundarios:**

- Valorar la relación de las MAPK (p38, JNK, ERK) y el resto de marcadores moleculares (p53, EGFR y HER-2) con las distintas variables pronósticas clínico-patológicas conocidas en el carcinoma de pulmón localizado.
- Estudiar la asociación y posibles interacciones de las proteínas MAPK entre sí y con el resto de marcadores moleculares.
- Considerar la posible activación de p38MAPK por quimioterapia y su valor como factor predictivo de respuesta a la misma.
- Comprobar el valor de las variables pronósticas clásicas en carcinoma de pulmón.
- Realizar un estudio multivariante para identificar posibles variables pronósticas.



### **3. Material y Métodos**

---



Para este trabajo se ha realizado un análisis de cohorte retrospectivo en dos fases. En ambas se incluyeron pacientes con estadio localizado al diagnóstico que recibieron un tratamiento con intención curativa. Una primera parte analizó pacientes con estadio III que recibieron quimioterapia neoadyuvante y en una segunda se analizó pacientes con estadio I y II que permitió realizar cirugía de entrada sin ningún tratamiento sistémico.

En la primera fase se analizó la posibilidad de utilizar p38MAPK como marcador pronóstico en CPNM, poniendo a punto el anticuerpo utilizado de forma específica. En base a los resultados de esa primera fase, la posibilidad de utilizar el mismo en clínica y de contar con una mayor serie de pacientes se decidió realizar la segunda fase en la que se analizó una cohorte de casos intervenidos en fase temprana, permitiendo obtener una mejor precisión en los resultados, por lo que se estudió no sólo a p38 sino a varios elementos relacionados con su vía de señalización.

### **3.1. Pacientes y características de las muestras:**

#### **3.1.1. Estadios III (localmente avanzados):**

Para esta fase inicial se utilizó una cohorte de casos obtenida a partir de la base de datos del banco de tumores del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), diagnosticados de CPNM (fundamentalmente adenocarcinoma y carcinoma escamoso) entre enero 2000 y diciembre de 2006, clasificados al diagnóstico como localmente avanzados (estadios IIIA ó IIIB), de los cuales se conocía que habían recibido quimioterapia y/o radioterapia y/o cirugía. Posteriormente el seguimiento se basó en los datos obtenidos de las historias clínicas del HUCA y del Hospital de Cabueñes.

Se utilizaron muestras tumorales conservadas en bloques de parafina en los servicios de Anatomía Patológica del HUCA y de los Hospitales de Cabueñes, Valle del Nalón, San Agustín y Álvarez-Buylla. Se analizaron tres tipos de muestras, las procedentes de la cirugía (biopsias quirúrgicas), las del proceso diagnóstico inicial de la enfermedad (biopsias diagnósticas), que eran libres de tratamiento alguno y en algún caso muestras procedentes de la extirpación de metástasis.

### 3.1.2. Estadios I y II (iniciales):

En esta fase del estudio se utilizó una cohorte de casos analizando pacientes con CPNM registrados en la base de datos del banco de tumores del HUCA. Se estudiaron pacientes intervenidos por CPNM entre enero de 1999 y abril de 2004 con la intención de seleccionar únicamente aquellos en estadio I ó II. En todos los casos los pacientes fueron intervenidos por el servicio de cirugía torácica del HUCA, obteniéndose una pieza quirúrgica, analizada y conservada por medio de bloque de parafina en el servicio de anatomía patológica del mismo hospital.

### 3.2. Estudio inmunohistoquímico:

En la primera fase (estadios III) se elaboraron tissue microarrays (TMA: matrices de tejido) con las muestras procedentes de cirugía del tumor primario o de las metástasis estudiadas y para las biopsias endobronquiales, en vez de ser añadidas al TMA al ser el tumor de pequeño tamaño, se hicieron cortes de varios casos que se incluyeron en varios portas. Con las muestras quirúrgicas de la segunda parte, que incluyen la mayoría de los pacientes, se elaboraron TMA para todas ellas (ver tabla).

**Tabla 1. Biopsias utilizadas y manejo de las mismas.**

Tipo de muestra	Técnica	Nº muestras/cristal	Nº cristales
Biopsia bronquial	Muestras sueltas en portas	9	3
Biopsia qx y mtx 1ª fase	TMA	28	3
Biopsia qx 2ª fase	TMA	30	8

Para construir el TMA, se perforaron los bloques originales en las regiones tumorales seleccionadas previamente por el patólogo para asegurarse de que contenía realmente tumor maligno y que la zona seleccionada era representativa del mismo, utilizando agujas de 1 mm y un Tissue Microarrayer de la casa Beecher Instruments®. Estas se insertaron en un bloque nodriza que se homogeneizó con todas las muestras en estufa de 37°C una noche, y se practicaron 30 cortes por bloque para estudios. Se realizó una sección adicional para control de calidad, comprobando que todos los tumores muestreados eran representados en el TMA, con al menos un cilindro (2%), teniendo en la mayoría (97%) dos o más.

Para realizar la técnica inmunohistoquímica se siguieron una serie de pasos comunes a todos los anticuerpos utilizados, que son descritos a continuación:

Se colocaron secciones parafinadas de tres micras en cristales tratados Dako REAL Capillary Gap Microscope Slides<sup>®</sup>, que se mantuvieron en estufa a 56°C toda una noche. Posteriormente se procedió al desparafinado, rehidratación y recuperación antigénica con el sistema PT-Link<sup>®</sup> (Dako) que permite realizar los tres pasos en uno. La recuperación antigénica es la fase previa a la inmunotinción con cada anticuerpo y se realizó a una temperatura de 95 °C durante 20 minutos a pH 9.

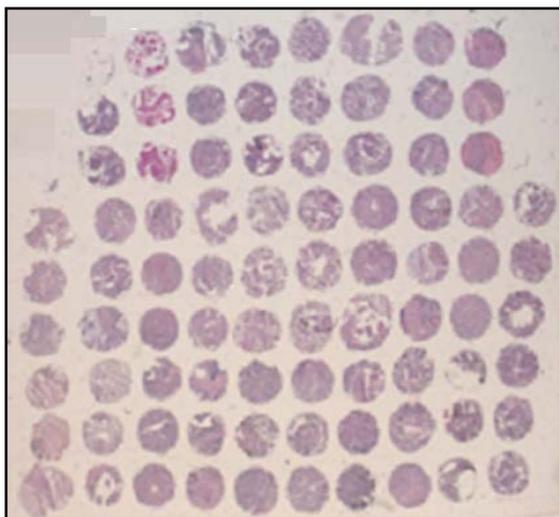
La inmunotinción se realizó en Autostainer (Labvision Corporation). Las muestras se mantuvieron previamente cinco minutos en un medio bloqueante de la actividad peroxidasa endógena y posteriormente se añadió el Ac primario con una dilución que varió en cada caso particular, aspecto por el cual los detalles referidos a la dilución y los aspectos de la inmunotinción serán descritos de forma específica para cada anticuerpo.

La inmunodetección se realizó con el sistema EnVision+ (EnVision Plus, Dako), añadiendo la solución PDE (polímeros de dextrano Envision) con la cual se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos y se reveló con el cromógeno Diamobenzidina (Dako DAB+) durante 10 minutos.

El sistema Envision<sup>™</sup> plus es una técnica de tinción en dos pasos, la primera la incubación de la muestra con el anticuerpo primario y en la segunda se añade un polímero de alto peso molecular (dextrano) al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de peroxidasa de rábano y de anticuerpo secundario, con lo que se consigue aumentar la sensibilidad del método y las diluciones del anticuerpo primario.

Finalmente se realizó contra-tinción con hematoxilina Dako durante 10 minutos, y posteriormente lavado en agua 5 minutos y deshidratación en alcoholes progresivos y xilol. El montaje se realizó con la resina sintética Entellan<sup>®</sup> (Merck).

Todas las muestras fueron revisadas por el mismo patólogo e investigador principal, con un microscopio de doble observador Leica. Las imágenes fotográficas reproducidas en este trabajo se tomaron con la cámara AxioCam (Zeiss) a través del microscopio Jenamed 2 (Zeiss).



**Fig. 6. Imagen a representativa de la construcción de un TMA (x4). Cada círculo corresponde a una muestra tumoral.**

### **3.2.1. p38:**

Para IHQ con p38 $\alpha$ , en ambas partes del estudio, el anticuerpo (Ac) utilizado fue el Ac monoclonal anti P-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (12F8) de conejo (Cell Signaling Technology®), que funciona para IHQ aunque también para inmuno-fluorescencia y Western-Blot, y es el más utilizado en la literatura (186).

El anticuerpo es producido por inmunización animal con un fosfopéptido sintético (unido a KHL), correspondiente a los residuos alrededor de las Thr180/Tyr182 de la p38 MAPK humana. Detecta niveles endógenos de p38 MAPK sólo cuando están fosforilados dualmente en Thr 180 y Tyr 182 y no tiene reacción cruzada con formas fosforiladas de p42/44 MAPK (ERK1/2) ni de SAPK/JNK.

En este caso se utilizó una dilución 1:100, con un período de incubación de 45 minutos, con desenmascaramiento a pH 9. El control interno positivo fueron en primer lugar los vasos sanguíneos que han sido habitualmente descritos como positivos (181, 195). En las muestras de los tumores en estadio I y II el control positivo fueron muestras de carcinoma pulmonar previamente analizadas. El control negativo fue el mismo tejido incubado sólo con diluyente del anticuerpo.

Se analizó la positividad de p38 MAPK en las muestras tumorales, en el núcleo y citoplasma. Siguiendo estudios previos, se analizó intensidad y porcentaje de positividad, para por un lado construir un score nuclear y citoplásmico y por otro lado analizar simplemente la positividad o negatividad de la muestra en ambos (191, 199). En el núcleo la intensidad se valoró de 0 a 3+ y en el citoplasma de 0 a 2+. Para calcular el score final se realizó un promedio con los distintos porcentajes de positividad de la

muestra, y se consideró cero si era menor de 0,10, uno si estaba entre 0,10 y 1,20, dos si estaba entre 1,20 y 2,20, así como tres si era mayor de 2,20. Si la tinción promedio era del 10% en conjunto pero sólo en una muestra, se consideró negativo. De forma semejante para el citoplasma. Finalmente, se consideraron positivos los scores mayores que cero y negativos los cero. Se decidió analizar el citoplasma además del núcleo, en relación con los trabajos que refieren la presencia de p38 en el núcleo y citoplasma celular normal, que es translocada al núcleo al activarse, aunque otros han mostrado que p38 activada también se expresa en el citoplasma de las células estimuladas (200-201).

### **3.2.2. JNK:**

Se utilizó el Ac monoclonal p-JNK (G-7) (Santa Cruz Biotechnology®) Este anticuerpo es útil para detectar las isoformas JNK1, JNK2 y JNK3 fosforiladas en la Thr 183 y Tyr 185, válido en principio para Wetstern Blotting, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, ELISA (Enzima Linked Inmunosorbent assay) e IHQ. Se realizó incubación durante 45 minutos, con una dilución de 1:100. El desenmascaramiento se realizó a pH 9. Como control positivo se utilizó material de carcinoma ductal infiltrante y como control negativo el mismo tejido incubado sólo con diluyente del anticuerpo. Hay varios trabajos que describen el uso de este Ac, aunque la mayoría se refieren al Western-Blotting, siendo poco frecuente su uso en IHQ (202-204), pero sí se han utilizado otros Ac contra JNK semejantes en IHQ (205).

Para su lectura se utilizó la misma estrategia que p38, considerándose positivo siempre que hubiera al menos un 10% de células N1 positivas. Score 0,1 a 1,2: 1, 1,2 a 2,2: 2, >2,2: 3. Los scores mayores que 0 se consideraron positivos y los 0 negativos. No se analizó la tinción citoplásmica, al ser siempre negativa.

### **3.2.3. ERK:**

Se utilizó el Ac monoclonal Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (20G11) de conejo #4376 (Cell Signaling Technology®). En este caso, se realizó inmunotinción durante 45 minutos, con una dilución 1:200 y desenmascaramiento a pH 6-9. Como control positivo se utilizó material de carcinoma de colon humano y como control negativo el mismo tejido incubado sólo con diluyente del anticuerpo. Los vasos arteriales funcionaron como control interno positivo cuando eran visibles. Ha sido

## Material y Métodos

descrito su estudio en IHQ en varios trabajos, siendo útil tanto para IHQ como para Western Blotting (206-209).

Para su interpretación se siguió la misma estrategia que p38 y pJNK, haciendo un score nuclear y citoplásmico, aunque también se analizó la positividad de la tinción en el estroma. En el núcleo de las células tumorales, los scores mayores que 0 se consideraron positivos y los 0 negativos. En el estroma se consideró positivo cualquier grado de tinción.

### **3.2.4. EGFR:**

Para su estudio se utilizó el Ac utilizado de rutina en el HUCA, el anticuerpo murino antiEGFR humana, IgG1, clon 2-18C9 (Dako®). Este anticuerpo tiene una peculiaridad: antes del proceso de incubación se digieren las muestras con Proteinasa K (para liberar el antígeno diana de sus posibles ligandos) durante 0,5 minutos. Posteriormente se realiza el proceso habitual, en este caso con un período de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, con pH 7,5. No se realiza dilución adicional, pues es un prediluido comercial.

Esta proteína se expresa en membrana celular, por lo que en la interpretación se realizó un score siguiendo estudios previos, cuyo rango va de 0 a 3 en función de la cantidad e intensidad de las células teñidas, siendo 0 cuando la expresión afectaba a menos del 10% de las células estudiadas (98). Se consideró expresión positiva o sobreexpresión, de forma agrupada en aquellos cuya expresión era mayor que 0.

### **3.2.5. HER-2:**

Para su inmunotinción se utilizó el Ac utilizado de rutina en HUCA, (Herceptest, Dako®), que se obtiene a partir de inmunización de conejo con un fragmento sintético de la terminación C (parte intracitoplásmica) de la proteína HER2 humana enlazado con hemocianina de lapa californiana. Se incubó durante 45 minutos a 95 °C y el desenmascaramiento se hizo a pH 7,5. No precisa dilución adicional, pues es un prediluido comercial. Como control positivo el sistema aporta muestras de tumores de mama con distintos grados de positividad.

Para su lectura se utilizaron los criterios de consenso de los tumores de mama (Consenso de las Sociedades españolas de anatomía patológica y oncología médica, SEAP y SEOM) (210): se ha de valorar exclusivamente el componente infiltrante y la tinción de membrana. Se considera negativo 0 en ausencia de tinción de membrana o tinción en menos del 10% de las células. En caso de que la tinción de membrana sea débil e incompleta en más del 10% de las células se considerará 1+. 0 y 1+ se consideran negativos. Borderline (2+), cuando haya tinción completa de membrana, débil o moderada en más del 10% de las células o tinción completa e intensa en 10-30% de las células. Positivo (3+), cuando exista tinción de membrana completa e intensa en más del 30% de las células. En este trabajo se consideró positivo cualquier grado de tinción, dado que no existieron casos 3+.

### 3.2.6. p53:

Para esta tinción se utilizó el Ac para p53 utilizado de rutina en el HUCA, el Ac anti-proteína p53 humana FLEX clon DO-7, (Dako®). Este anticuerpo está diseñado para detectar la proteína mutada, aunque también puede detectar proteína de tipo salvaje, reconociendo un epítipo ubicado entre los aminoácidos 35 y 45 del extremo amino-terminal de la misma. Para realizar la técnica IHQ, se hizo una incubación de 20 minutos y un pase por Envision algo más rápido, en este caso 20 minutos, realizando el desenmascaramiento a pH 9. No se realizó dilución, pues el producto es un prediluido comercial y no precisa dilución adicional. Como control positivo se utilizó una muestra de carcinoma de mama positiva.

Se analizó el Ac según Esrig en carcinoma de vejiga, en el que se consideraba p53 sobreexpresado cuando lo hacía en 10% o más de las células tumorales (104).

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados y características de la IHQ utilizada. pH: pH de desenmascaramiento. N/P: no precisa.**

Ac	Dilución	Tiempo inclusión	pH	Peculiaridades
p38	1:100	45	9	
JNK	1:100	45	9	
ERK	1:200	45	6-9	
EGFR	N/P	30	7,5	Proteinasa K
HER2	N/P	45	7,5	
p53	N/P	20	9	

### **3.3. Seguimiento, evaluación y análisis estadístico:**

#### **3.3.1. Seguimiento:**

El seguimiento se basó en los datos obtenidos en las historias clínicas del HUCA y en menor medida en el Hospital de Cabueñes fundamentalmente, aunque en algún caso también se consultó en el Hospital San Agustín, Valle del Nalón y Jove. En los pacientes con estadio III, el seguimiento finalizó con fecha 31 enero de 2009 y en los estadios I y II, la fecha límite de análisis de datos fue el 1 de abril de 2012.

En los casos con estadio III de inicio se analiza la respuesta al tratamiento citotóxico entre aquellos que recibieron quimioterapia neoadyuvante. La valoración de dicha respuesta se llevó a cabo aplicando los criterios de la OMS (ver anexo). Para valorar el efecto de la quimioterapia, se analizó la mejoría (infra-estadificación) clínico-patológica basándose en la disminución del estadio clínico (al diagnóstico antes del tratamiento) en relación con el quirúrgico en pacientes que han sido operados. A pesar de que la estadificación clínica puede infravalorar la quirúrgica, todos los pacientes se valoraron por los mismos criterios por lo que a priori parecen útiles para evaluar el efecto del tratamiento. El estadio, en todos los casos se clasificó siguiendo la TNM Classification of Malignant Tumors de 1996 (anexo) debido a que los pacientes fueron estadificados e intervenidos según dichos criterios y no con la nueva clasificación. El estado general según el Índice de Karnofsky (anexo).

#### **3.3.2. Evaluación:**

Las principales variables clínico-patológicas analizadas globalmente en este estudio fueron:

- Estadio clínico (aquellos que recibieron tratamiento previo) y quirúrgico (todos los pacientes operados).
- Estado general (no analizado en estadios precoces, pues era bueno en todos), basado en la escala de Karnofsky (211). (Ver anexo).
- Tabaquismo (se agrupó entre fumadores en algún momento y nunca fumadores) .
- Sexo (masculino o femenino).
- Edad (en algún análisis se agrupó entre mayores y menores de 70 años).
- Histología (adenocarcinoma vs carcinoma escamoso).

- Grado tumoral: Bien vs Moderadamente o Mal diferenciado.
- Intención y tipo de quimioterapia (con o sin platino), en los pacientes con estadio III de inicio, no en los de estadio I y II.
- Cirugía y tipo de cirugía con neumonectomía o resección subtotal (lobectomía).
- Como variables de respuesta se utilizó: respuesta clínica e infraestadificación clínico-quirúrgica.
- Como variables de supervivencia se utilizaron las variables clásicas: supervivencia libre de enfermedad (SLE) y la supervivencia global (SG) (212):
  - o La SLE se midió desde el inicio del tratamiento hasta el día de confirmarse la recidiva o progresión de la enfermedad. Si algún paciente en el momento del análisis no presentaba ninguno de estos eventos fue censurado en las curvas de supervivencia libre de enfermedad.
  - o La SG se calculó desde el inicio del tratamiento, cualquiera que fuera, hasta el día de la muerte del paciente. De nuevo, en el caso de que el evento no existiera en el momento del análisis, el dato era censurado. De modo puntual se analizó la supervivencia a los 5 años (S5) de modo semejante a la SG, y la supervivencia específica por tumor (SET), semejante a la SG pero en este caso las censuras se aplicaban cuando la causa de la muerte no era tumoral o se desconocía.

### **3.3.3. Análisis inmunohistoquímico:**

En los pacientes estadio III analizados en una primera fase, se analizó exclusivamente p38MAPK, mientras que en el resto de pacientes estadio I y II, se analizaron los 6 marcadores referidos, p38, JNK, ERK1/2, EGFR, HER-2 y p53.

En la cohorte de casos estadio III, se decidió analizar de forma separada los datos procedentes de las biopsias diagnósticas con respecto a los de las quirúrgicas, tanto en los análisis de supervivencia, como en los de asociación entre p38 y las variables clínico-patológicas estudiadas. Esto fue debido a que a priori cabía pensar que los niveles de p38 podrían variar en función de la exposición previa o no a la quimioterapia, pues como se comentó previamente esta proteína está implicada en la

respuesta celular al tratamiento oncológico. De esta forma se considera que se podrían evitar equívocos no deseados.

Se debe tener en cuenta la extremada heterogeneidad reportada en la literatura para el análisis de las proteínas MAPK, considerando positivas tinciones desde >5% de las células a >50% (184, 187), y en algunos casos no habiendo distinción entre núcleo o citoplasma (191-192), aunque sí existe homogeneidad en que siempre se analiza de proteína activa, esto es, fosforilada. En el presente trabajo se decidió analizar núcleo y citoplasma de forma independiente para analizar el distinto papel de la localización subcelular y evitar confusión, decidiendo utilizar un score que combinara intensidad y porcentaje de tinción puesto que al analizar cada caso se vio que la mayoría de los positivos siempre presentaban más del 10% de las células con una tinción 1+, eligiéndose esto como punto de positividad para las MAPK. Para p53, EGFR y HER2 se utilizó el método aplicado en clínica salvo que para HER-2 se consideró positiva cualquier tinción, por el escaso número de positivos.

A lo largo de la descripción de los resultados, se procuró mantener el mismo lenguaje para referirse a los marcadores moleculares estudiados. En el caso de las MAPK los anticuerpos utilizados identifican proteína activa (fosforilada), por lo que hay que tener en cuenta que, pese que en el texto serán referidos según el nombre de la proteína (p38, JNK o ERK), en realidad serán P-p38 $\alpha$ , P-JNK y P-ERK. Para EGFR, HER-2 y p53 simplemente se analiza la presencia de proteína y su nivel relativo. Cuando se habla en conjunto de p38, JNK, ERK (los tres MAPK), p53, EGFR y HER-2, se suele referir como marcadores biológicos o moleculares.

### **3.3.4. Análisis estadístico:**

Para todos los marcadores moleculares, excepto p53 que desde el inicio se clasificó sólo como positivo o negativo, se utilizó tanto el score nuclear-citoplásmico-membrana como su agrupación en positividad o negatividad para analizar su asociación con las variables clínico-patológicas y con la supervivencia. Sin embargo en la mayoría de ocasiones se debió utilizar simplemente los datos agrupados en positivos o negativos, debido bien a que no había diferencias o que no era posible establecerlas por el escaso número de casos con distinto score, lo que añadiría exclusivamente confusión.

Para el análisis de la asociación de los niveles de p38 con las distintas variables clínico-patológicas adicionales o con el resto de marcadores biológicos-moleculares (ERK, JNK, p53, EGFR o incluso HER2) se utilizó el estadístico Chi-cuadrado con el test exacto bilateral de Fisher cuando las tablas eran 2x2 (213). Si alguno de los marcadores moleculares tuviera escasos casos positivos o negativos, su participación en los modelos asociativos será limitada.

En cuanto a la supervivencia, tanto la SLE como SG se calcularon por el método de Kaplan-Meier (214) y analizando el nivel de significación por el test del log-rank (215). De modo aproximativo se utilizó el modelo multivariante de Cox para establecer posteriormente un modelo combinado utilizando las variables mayor significación en dicho modelo (216).

En relación tanto con el Chi-cuadrado, como con el Kaplan-Meier y correspondiente log-rank, así como para los modelos de Cox, se obtuvo un valor “p” de significación estadística, considerándose como estadísticamente significativos aquellos valores de p inferiores a 0,05.

El análisis estadístico se realizó con el programa y SPSS PASW versión 18 aunque algunos resultados previos se analizaron con la versión 15.0.



## **4. Resultados**

---



#### 4.1. Características clínico-patológicas de los pacientes:

Se analizó un total de 127 pacientes estadio III, siendo descartados 54 por varios motivos (estadio inadecuado, histología no primaria pulmonar, ausencia de datos clínicos). De los 73 pacientes restantes, había biopsia diagnóstica en veinte y la mayoría habían recibido tratamiento previo, que fue quimioterapia en 55 casos y radioterapia en tres, siendo intervenidos quirúrgicamente 63. En siete de los 63 pacientes intervenidos no había tumor residual, al haber presentado respuesta completa al tratamiento de inducción, por lo que los niveles de p38 tras la cirugía sólo se analizaron en 56 casos. Además, en cuatro de los pacientes que recibieron quimioterapia y cirugía, pese a que había muestra, esta no presentaba buen estado de conservación por lo que no se consideró adecuada para la determinación de p38.

En consecuencia, en la cohorte de pacientes estadio III fueron analizados los datos de 62 pacientes, existiendo dos grupos fundamentales en el análisis: uno de ellos formado por los casos con *biopsia diagnóstica*, (20 casos), de los cuales recibieron quimioterapia y fueron analizables para las principales variables 18 y otro formado por los casos con *biopsia quirúrgica* y que habían recibido neoadyuvancia (56 casos), de los cuales 48 fueron analizables para supervivencia. Hay 14 pacientes que forman parte de ambos grupos, es decir, pacientes con *ambos tipos de biopsia* y quimioterapia fue formado por 14 pacientes, siendo 12 analizables para supervivencia. Además se contó con siete muestras procedentes de metástasis extirpadas a dichos pacientes a lo largo de su evolución.

En cuanto a los pacientes con estadio I y II, se debía tratar de pacientes que no habían recibido tratamiento quimioterápico previo. Por tal motivo, de los 362 pacientes revisados, finalmente sólo se analizaron 211, eliminando el resto por motivos similares al resto de pacientes (diagnóstico erróneo, estadio inadecuado, falta de datos clínicos o haber recibido quimioterapia previa). Se incluyeron en el análisis inmunohistoquímico 9 casos de pacientes estadio III que se operaron sin recibir neoadyuvancia, aunque en el análisis estadístico posterior sólo se analizaron puntualmente.

A partir de ahora se describirán los resultados procurando distinguir en todo momento entre las dos cohortes de casos.

## 4.1.1. Estadios III (localmente avanzados):

Tabla 3. Características clínico-patológicas de los 62 pacientes estadio III

Edad media	55,8 años	N	%
Sexo	Hombre	47	75
Mujer	15	25	
Tabaquismo	Sí	55	88,7
No	7	11,3	
Exfumador	15	24,5	
Estado general	90-100	39	63
60-80	23	37	
Histología	Escamoso	27	43,5
Adenocarcinoma	29	46,8	
Otra	6	12	
Estadio clínico	IIIA	38	60
IIIB	24	40	
Estadio quirúrgico	IIIA	12	19,4
IIIB	9	14	
I ó II	34	61,3	
R. Completa	4	7	
Cirugía	Neumonectomía	28	45,2
No neumonectomía/Lobectomía	34/29	54,8/47	
Quimioterapia	Neoadyuvante	54	88%
Complementaria	4	7%	
No quimioterapia	4	5%	
Esquema tratamiento	Qt neoadyuvante +Cirugía	52	84%
Qt ó Rt sin Cirugía	3	5%	
Cirugía sin Qt neoadyuvante	7	11%	
Grado tumoral (cirugía)	Bien diferenciado	9	16,7
Moderadamente diferenciado	24	44,4	
Poco diferenciado	21	38,9	

El 96,5% de los pacientes recibieron quimioterapia con platino. Las respuestas clínicas fueron: RC (8,6%), RP (75,9%), NC (12,1%), PE (3,4%). En total 84,5% de respuestas objetivas (RC + RP) y 15,5% no respuestas (NC + PD). El 96,8% fueron intervenidos quirúrgicamente, con resección completa en el 82%. La infraestadificación

clínico-quirúrgica fue favorable en un 68,3% de los casos, NC en el 30% y desfavorable en el 11,7%. De los 62 pacientes evaluables en el momento del análisis, en el 68,9% hubo progresión de la enfermedad, con una SLE de 19 meses y una mediana de SG de 22,18 meses, con un 71% de fallecidos. El 85% de fallecimientos se debió al tumor y el resto generalmente a causas cardio-respiratorias.

ESTADIO CLÍNICO				ESTADIO QUIRÚRGICO (%)					
T		N		T		N		M	
T1	3,2	N0	12,9	T1	25,8	N0	65	M0	98
T2	41,9	N1	3,2	T2	37,1	N1	13,3	M1	2
T3	24,2	N2	72,6	T3	12,9	N2	20		
T4	30,6	N3	6,5	T4	14,5	N3	1,7		
				T0	6,5				

**Tabla 4. Detalle de T, N y M clínico y quirúrgico tras quimioterapia**

#### 4.1.2. Estadios I y II (iniciales):

**Tabla 5. Características clínico-patológicas de los 211 pacientes Est. I-II.**

Edad media		N	%
	65.42 años		
Edad agrupada			
	70 ó <	128	60,7
	> 70	83	39,3
Sexo			
	Hombre	191	90,5
	Mujer	20	9,5
Tabaquismo			
	Sí	185	94,4
	No	11	5,6
	Exfumador	73	38,9
Histología			
	Escamoso	110	52,1
	Adenocarcinoma	101	47,9
Estadio quirúrgico			
	IA Est I: 74,4%	64	30,3
	IB	93	44,1
	IIA Est II: 25,6%	22	10,4
	IIB	32	15,2
Cirugía			
	Neumonectomía	35	16,6
	Lobectomía o Bilobectomía	166	78,7
	Tumorectomía	10	4,7
Grado tumoral			
	Bien diferenciado	21	10
	Moderadamente diferenciado	117	56
	Poco diferenciado	31	34
Radioter. Complementaria			
		7	3,3

## Resultados

En los 211 pacientes analizados con estadio I y II, la mediana de SLE y SG fue de 33,64 y 43,95 meses respectivamente. En el momento del análisis se objetivaron un 34% de recurrencias, siendo en el 13,2% locales, en el 4,3% en pulmón contralateral, en el 7,1% en SNC, en el 4,7% óseo y en el 3,3% abdominal. Existió una diferencia estadísticamente significativa para recurrencia cerebral entre adenocarcinomas frente a los escamosos (10,9 vs 3,6%,  $p=0,05$ ). A lo largo del seguimiento, fallecieron el 51,7% de los casos, de los cuales un 57% fue causado por el tumor, el resto por motivos de índole cardio-respiratoria fundamentalmente.

### 4.2. Resultados de la expresión por IHQ:

Tabla 6. IHQ en pacientes con estadio III.

	SCORE			AGRUPADO		
		N	%		N	%
<b>Biopsias diagnóstico</b>	N=20					
<b>p38 Nuclear</b>						
	0	7	35	Neg	7	35
	1+	7	35	Pos	13	65
	2+	2	10			
	3+	4	20			
<b>p38 Citoplásmica</b>						
	0	18	90	Neg	18	90
	1+	2	10	Pos	2	10
	2+	0	0			
<b>Biopsias quirúrgicas</b>	N=56					
<b>p38 Nuclear</b>						
	0	33	58,9	Neg	33	58,9
	1+	18	32,1	Pos	23	41,1
	2+	3	5,4			
	3+	2	3,6			
<b>p38 Citoplásmica</b>						
	0	40	71,4	Neg	40	71,4
	1+	10	17,9	Pos	16	28,6
	2+	6	10,7			

Se analizaron 7 muestras de metástasis, cuatro eran cerebrales, una intestinal, una de pleura y una de pared torácica entre los pacientes con estadio III. Las cerebrales, todas fueron positivas en núcleo, siendo un 50% 3+, y todas positivas en el citoplasma, (75% 1+). Salvo en un caso en que la muestra quirúrgica era positiva nuclear al igual que su metástasis (1+), el resto eran negativas y se transformaron luego en 3+ ó 2+.

En el grupo de pacientes con estadio I y II, los resultados se resumen en la siguiente tabla, teniendo en cuenta que para cada tipo de anticuerpo utilizado existe pérdida de algún caso debido a fallo en la técnica o en el corte del bloque del TMA:

**Tabla 7. IHQ en pacientes con estadio inicial.**

	SCORE			AGRUPADO			SCORE			AGRUPADO		
		N	%		N	%		N	%		N	%
<b>P-p38</b>	N=197											
	<b>p38 Nuclear</b>						<b>p38 Citoplásmica</b>					
	0	147	74,6	Neg	147	74,6	0	174	88,3	Neg	174	88,3
	1+	40	20,3	Pos	50	25,4	1+	21	10,7	Pos	23	11,7
	2+	7	3,6				2+	2	1			
	3+	3	1,5									
<b>P-JNK</b>	N=200											
	<b>JNK Nuclear</b>						No hubo tinción citoplásmica					
	0	104	52	Neg	104	52						
	1+	68	34	Pos	96	48						
	2+	24	12				<b>ERK estroma</b>			20% positivos		
	3+	4	2									
<b>P-ERK 1/2</b>	N=197											
	<b>ERK Nuclear</b>						<b>ERK Citoplásmica</b>					
	0	166	84,3	Neg	166	84,3	0	174	88,3	Neg	174	88,3
	1+	21	10,7	Pos	31	15,7	1+	21	10,7	Pos	23	11,7
	2+	7	3,6				2+	2	1			
	3+	3	1,5									
<b>EGFR y HER-2</b>	N=195						N=202					
	<b>EGFR membrana</b>						<b>HER-2 membrana</b>					
	0	83	42,6	Neg	83	42,6	0	197	97,5	Neg	197	97,5
	1+	50	25,6	Pos	112	57,4	1+	4	2	Pos	5	2,5
	2+	47	24,1				2+	1	0,5			
	3+	15	7,7				3+	0	0			
<b>p53</b>	N= 200											
	<b>p53 (10% células +)</b>											
	<10	101	50,5									
	10+	99	49,5									

A consecuencia de que HER-2 fue prácticamente negativo en todas las muestras, su análisis en relación con el resto de variables clínicas-patológicas-moleculares, se realizó de forma exploratoria no pudiendo establecerse asociaciones adecuadas al existir tan pocos positivos. Se comentarán puntualmente cuando sean interesantes.

Dentro de esta segunda cohorte se analizaron siete casos estadio III, (no incluidos en el análisis global). En ellos el grado tumoral fue moderadamente diferenciado en el 28,6% y poco diferenciado en el 71,4%, sin casos bien diferenciados.

### 4.3. Asociación entre marcadores moleculares IHQ:

A continuación, utilizando los datos de los pacientes con estadio I y II, se describirá la asociación entre las distintas proteínas de la vía analizada. Dado que en la mayoría de los casos el número de pacientes con score alto fue escaso, se decidió analizar dicha asociación sólo entre casos positivos o negativos. Es importante recordar que cuando se habla de p38, JNK o ERK, se refiere a la presencia de proteína fosforilada, es decir, activa. Se describe con mayor interés la asociación de proteína nuclear para las MAPK y p53, así como membrana para EGFR, aunque también se analizó el resto de localizaciones para p38 y ERK. El escaso número de casos HER-2 positivos no permitió establecer asociaciones.

p38 nuclear se asoció significativamente con su expresión citoplásmica, dado que sólo existió un caso de expresión citoplásmica con núcleo negativo ( $p < 0,0001$ ). También se asoció la expresión nuclear de p38 con la nuclear de JNK y ERK ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ). Existió relación de p38 nuclear con la expresión citoplásmica y en estroma de ERK ( $p < 0,0001$ ). Hubo tendencia a asociación entre positivos nucleares para p38 y p53 ( $p = 0,100$ ) y tendencia inversa con EGFR ( $p = 0,135$ ).

En cuanto a JNK, cabe destacar que además de su asociación con p38 ( $p < 0,0001$ ), existe tendencia a asociación con ERK entre casos positivos ( $p = 0,078$ ). Sí presentó asociación significativa con EGFR, aunque de forma contraria, de forma que cuando EGFR es positivo hay más casos porcentuales de JNK negativo y viceversa ( $p = 0,020$ ). Ninguna asociación con p53 ( $p = 0,394$ ).

ERK se asoció en su expresión nuclear y citoplásmica ( $p < 0,0001$ ), pero no con la expresión en el estroma ( $p = 0,8$ ). Tampoco se asoció con la expresión de EGFR en membrana, aunque existió una tendencia a una asociación inversa ( $p = 0,1$ ), semejante a JNK ( $p = 0,078$ ). No asociación con p53 ( $p = 1$ ).

La expresión citoplásmica de ERK y p38 fue concordante, con asociación entre casos positivos y negativos, aun existiendo muy pocos casos positivos ( $p = 0,03$ ). También hubo relación entre la expresión en estroma de ERK con JNK nuclear y p38 nuclear ( $p < 0,0001$ ).

Al realizar un análisis exploratorio entre las tres MAPK al mismo tiempo, cuando p38 es negativo, la distribución de ERK es independiente de JNK, sin

asociación de casos positivos con positivos o viceversa. Por el contrario, si p38 es positivo, hubo una leve influencia a asociación entre los casos positivos de ERK y JNK.

Por otra parte se estudió la relación de la positividad para las tres MAPK al mismo tiempo (MAPK "Triple Positivos", MTP) con los otros elementos estudiados. De los 15 casos MTP, ninguno fue positivo para HER-2, seis (40%) fueron positivos para EGFR y 11 (73%) para p53 ( $p=1$ ,  $p=0,062$  y  $p=0,182$  respectivamente).

La expresión de EGFR se asoció con JNK como se ha comentado previamente y también con la expresión de ERK en estroma ( $p=0,01$ ), con una tendencia para asociación con ERK nuclear ( $p=0,112$ ). En los tres casos la asociación fue invertida, es decir, casos negativos con positivos y viceversa.

p53, como se ha comentado caso por caso, no se asoció con ninguno de los otros marcadores moleculares, con una tendencia para asociación positiva con p38 ( $p=0,1$ ).

**Tabla 8. Asociación de variables moleculares entre sí en los casos estadio I y II. Se muestran las p, en color azul cuando la asociación es directa (positivos con positivos), en rojo las inversas (+ con -). Los huecos libres serían redundantes y no se repiten.**

	JNK (núcleo)	ERK (núcleo)	EGFR (mb)	p53 (núcleo)
p38 (núcleo)	<0,0001	<0,0001	0,135	0,100
JNK (núcleo)		0,078	0,020	0,394
ERK (núcleo)			0,112	1
EGFR (mb)				0,663

#### **4.4. Asociación entre Variables moleculares y clínico-patológicas:**

En las variables moleculares analizadas, se decidió utilizar la expresión nuclear de las 3 MAPK debido a que la citoplásmica o estroma en el caso de ERK fue poco frecuente. Por ello, salvo en casos particulares en los cuales se especificará, siempre que se hable de p38, JNK o ERK, será en referencia a la proteína nuclear. Por el mismo motivo, se hará referencia a dichas proteínas clasificando su expresión como “positiva” o “negativa”, puesto que el número de casos 3+ ó 2+ fue tan bajo que no permitió analizar subgrupos por el score, algo que va en concordancia con trabajos previos, en que sólo se analiza positividad o no nuclear. En el caso en que se analice el score se especificará previamente. Se describirán los datos obtenidos en ambas cohortes de pacientes, especificando el tipo de muestra al que nos referimos y teniendo en cuenta que en las muestras de pacientes con estadio III sólo se analizó p38. Dado el elevado número de análisis realizados, se procurará reportar sólo las asociaciones con significación estadística, intentando obviar el resto.

##### **4.4.1. Edad, sexo y estado general:**

Entre los pacientes estadio III que recibieron quimioterapia neoadyuvante, para p38 nuclear y citoplásmica, en las 20 biopsias diagnósticas analizadas no hubo diferencias en cuanto al sexo, ( $p=1$  y  $p=1$ , núcleo y citoplasma), con tendencia a mayor número de casos positivos entre los de buen estado general (IK 90-100), en núcleo, sin diferencias en citoplasma ( $p=0,176$ ,  $p=1$ ) y sin diferencias en cuanto a la edad (agrupando entre mayores o menores de 70 años), ( $p=1$  y  $p=1$ ). En las 56 quirúrgicas existió tendencia a mayor positividad nuclear y citoplásmica para p38 en hombres (47% vs 33% y 33% vs 17%) ( $p=0,231$  y  $p=0,186$ ), sin diferencias para estado general ( $p=1$  y  $p=1$ ) ni para edad ( $p=0,66$  y  $p=0,68$ ).

Entre los pacientes estadio I y II, intervenidos sin haber recibido quimioterapia, en relación con el sexo, p38 nuclear tendió a asociarse con una mayor positividad en mujeres que hombres, (45 vs 23,2%,  $p=0,05$ ). Existió tendencia a mayor positividad de p38 y ERK en citoplasma entre mujeres (25% vs 10,2% en ambos casos) ( $p=0,065$  y

p=0,065). En cuanto a la edad, ERK mostró diferencias, siendo más frecuentemente positivo entre pacientes < 70 años (20,8 vs 7,8%, p=0,01). Dichas diferencias también existieron en cuanto a su expresión citoplásmica (p=0,006), aunque el número de pacientes fue menor. JNK, EGFR y p53 no mostraron ninguna diferencia ni tendencia reseñable en relación con estas variables.

#### 4.4.2. Tabaquismo:

En los pacientes con estadio III que recibieron quimioterapia neoadyuvante, en las biopsias diagnósticas sólo hubo un paciente no fumador, lo cual no permitió establecer diferencias con los fumadores. En los 56 pacientes que recibieron quimioterapia con platino, hubo tendencia a mayor positividad nuclear (44% vs 14%) y citoplásmica (33% vs 0%) entre los fumadores (p=0,22 y p=0,17).

En los pacientes con estadio I y II sin quimioterapia previa: hubo asociación con p53, dado que un 52% de los fumadores eran positivos, frente a sólo el 10% entre no fumadores (p=0,009). Con el resto de marcadores no hubo diferencias reseñables.

#### 4.4.3. Histología y Grado tumoral:

En los pacientes con estadio III: en las 20 biopsias diagnósticas no hubo diferencias, pero en las 56 muestras quirúrgicas, se observó un 59% de positividad nuclear en los carcinomas escamosos frente al 38% de adenocarcinomas (p=0,049) y en el citoplasma en un 45% frente a un 19% de adenocarcinomas (p=0,05). El grado tumoral (quirúrgico) no presentó diferencias (p=0,814, p=0,385).

Entre los pacientes con estadio I y II: ERK mostró asociación con la histología, con un 25,5% de carcinomas escamosos positivos frente a un 6,8% de adenocarcinomas (p=0,0003). Dichas diferencias también fueron semejantes en cuanto a su inmunotinción citoplásmica y en estroma, (p=0,028 y p=0,078 respectivamente). Asimismo, EGFR y p53 fueron más frecuentemente expresados en carcinomas escamosos (57,3% vs 41,2% y 69,3% vs 44,7%, p=0,025 y p=0,01 respectivamente). p38 (nuclear y citoplásmica), así como JNK nuclear no presentaron diferencias siendo prácticamente igual su nivel de tinción entre una y otra histología en este tipo de pacientes (p=0,624, p=0,506, p=1, respectivamente).

**Tabla 9. Principales asociaciones de variables moleculares con variables clínico-patológicas. Se refiere a pacientes con estadio I y II salvo cuando se especifica.**

	Asociación con:	Más frecuente en:	p
<b>p38 nuclear</b>	Sexo	Sexo femenino	0,05
	Histología	Escamosos	0,049
<b>p38 citopl</b>	Histología	Escamosos	0,05
<b>ERK nuclear</b>	Edad	Más frecuente en < 70 años	0,02
	Histología	Escamosos	0,0003
<b>ERK citopl</b>	Edad	Más frecuente en < 70 años	0,006
	Histología	Escamosos	0,028
<b>EGFR</b>	Histología	Escamosos	0,025
<b>p53</b>	Tabaquismo	Más frecuente en fumadores	0,009
	Histología	Escamosos	0,01

∞ Estos casos se refieren a datos de pacientes con estadio III.

En relación con el grado tumoral, no hubo asociación con ninguno de los marcadores moleculares, pero hubo tendencia en p38 y JNK, presentando ambos mayor porcentaje de positividad cuanto mayor era el grado de diferenciación, ocurriendo lo contrario con EGFR (Tabla 7). Para el resto de marcadores no existió tendencia alguna.

**Tabla 10. Grado de diferenciación en relación con variables IHQ en estadios I y II.**

	Grado diferenciación vs % casos +.			p
	Bien	Moderado	Poco	
<b>p38 +</b>	40	26	21	0,22
<b>JNK +</b>	62	51	39	0,12
<b>EGFR +</b>	37	60	57	0,16

En cuanto a HER-2, todos los casos positivos fueron en fumadores, en menores de 70 años y su grado tumoral fue moderado, siendo 4/5 casos estadio I (N negativo). No hubo en ninguno de estos casos asociación significativa.

Es necesario comentar que se analizaron las distintas variables clínico-patológico-moleculares en relación con el tipo de recidiva/metástasis. Globalmente hubo muy pocas asociaciones, salvo en los casos que se comentan a continuación:

- Metástasis cerebrales: hubo asociación de la histología adenocarcinoma con el desarrollo de metástasis cerebrales (10,9% vs 3,6%,  $p=0,05$ ). La expresión nuclear y citoplásmica de ERK se asoció con mayor número de metástasis cerebrales en el seguimiento (26% vs 10%;  $p=0,08$  y 26% vs 14%;  $p=0,2$ ). Dos de los pacientes que las desarrollaron fueron HER-2 positivos ( $p=0,045$ ).
- Metástasis óseas: existió asociación con la positividad de ERK en el estroma y metástasis en hueso siendo positivos en un 50% de los metastásicos, frente a un 19% en los no metastásicos, ( $p=0,034$ ). En relación con p38 nuclear, hubo mayor tendencia a positividad entre los metastásicos en hueso, siendo positivos en el 50% de los casos, a diferencia de los negativos (25%), ( $p=0,1$ ).

#### 4.4.4. Estadio clínico y/o quirúrgico:

En los estadios III, no hubo diferencias significativas entre el estadio clínico y los niveles en citoplasma y núcleo de p38, con una tendencia a mayor positividad con el estadio IIIA (45% frente a 12,5%;  $p=0,17$ ). El estadio quirúrgico tampoco se asoció con positividad o negatividad de p38 ni en núcleo ni en citoplasma.

En los estadios I y II, se analizó el estadio quirúrgico directamente, pues no recibieron tratamiento previo que pudiera modificarlo. No hubo asociación de ninguno de los 5 marcadores con el estadio ni en particular con ninguno de los factores implicados en el mismo (T ó N):

- ERK nuclear mostró tendencia a mayor número de positivos estadio I (17,9% vs 9,6%;  $p=0,18$ ), sobre todo en relación con la T, siendo positivo en el 24,3%, 13,2% y 5% en tumores con tamaño T1, T2 y T3, respectivamente ( $p=0,06$ ). p38 nuclear mostró tendencia a mayor positividad en estadios I (27,6% vs 19,2%;  $p=0,27$ ). JNK y EGFR no mostraron diferencias ( $p=0,7$  y 0,5).
- p53 mostró también tendencia a ser más frecuentemente positivo (>10% células) en estadio I que en II (53 vs 39,6) ( $p=0,11$ ), fundamentalmente en este caso en relación con la N (Negativa), ( $p=0,09$ ).

Es necesario comentar que se decidió analizar p38 en 6 casos de la segunda cohorte (estadios I y II) que habían sido mal estadificados y en realidad eran estadio III, encontrándose en ellos que cinco eran negativos para p38 y sólo uno positivo.

#### **4.4.5. p38 y quimioterapia en estadios III:**

##### **4.4.5.1. Relación de p38 con respuestas clínicas e infraestadificación:**

Se analizó la relación de p38 con las respuestas clínicas y la infraestadificación clínico-patológica. Globalmente, en los estadios IIIB clínicos el porcentaje de infraestadificación fue del 76% frente al 65% en los IIIA, y hubo reducción del tamaño tumoral en el 67% de los IIIB frente al 43% de los IIIA.

p38 fue analizable en 18 casos en biopsias diagnósticas y en 48 quirúrgicas. En las biopsias diagnósticas analizadas, no hubo asociación entre el score nuclear o citoplásmico de p38 y las respuestas clínicas ( $p=0,603$  y  $p=1$ ) ni con la infraestadificación, con los mismos resultados si el análisis se hacía agrupado entre positivos y negativos, pese a que había mayor porcentaje de infraestadificación entre los primeros ( $p=0,627$  y  $p=1$ ). En las muestras quirúrgicas, no se encontró asociación de la positividad de p38 con respuesta clínica ( $p=1$  y  $p=1$ ), observándose una tasa de RC/RP del 90% tanto en positivos como negativos en núcleo y citoplasma. Tampoco hubo asociación con infraestadificación clínico-patológica, aunque también con más positivos entre los que tuvieron infraestadificación ( $p=0,376$  y  $p=0,344$ ). No hubo asociación entre el cambio en la fosforilación de p38 antes y después de la quimioterapia en los doce pacientes analizados ( $p=0,58$  y  $p=1$ , para núcleo y citoplasma).

Analizando por separado los estadios T y N en relación con la positividad o negatividad para p38 en muestras quirúrgicas, no se encontraron diferencias significativas ni para los positivos en núcleo ni para los positivos en el citoplasma, con tendencia para la positividad citoplásmica de p38 a infraestadificación T ( $p=0,13$ ).

##### **4.4.5.2. Tratamiento con esquema basado en platinos:**

Entre los evaluables, el 42% de los 56 operados fueron p38+ en el núcleo, y en cuanto al score, los más frecuentemente encontrados fueron 1+ y negativo (en conjunto 90%). Sólo hubo dos pacientes intervenidos sin recibir platino, ambos negativos.

De modo descriptivo, al cruzar los datos de biopsias previas y quirúrgicas en los 12 pacientes analizables que recibieron quimioterapia, de los 8 positivos en el núcleo en biopsia diagnóstica, 5 (60%) permanecieron positivos tras el tratamiento y el resto se negativizaron. De los 4 negativos, 3 (75%) se positivizaron, habiendo en conjunto cambio en un 42%. En el citoplasma hubo 10 negativos al diagnóstico, positivizándose cinco y dos positivos de los que uno se negativizó en la muestra quirúrgica.

## 4.5. Análisis de supervivencia:

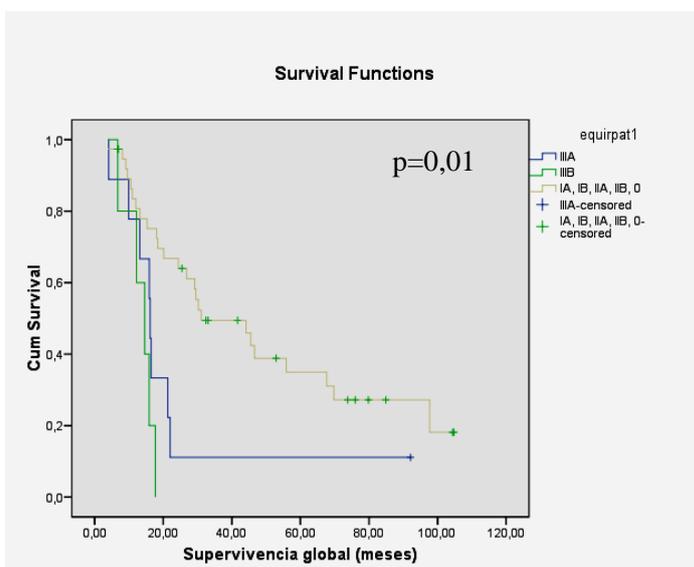
Se describen los datos de supervivencia haciendo una breve mención a las variables clínico-patológicas para posteriormente analizar la supervivencia en relación con las variables moleculares. Dado que la cohorte con mayor número de casos y más variables a analizar es la de los pacientes con estadio I y II, el análisis será más extenso en este caso, indicándose en todo momento a que cohorte se refieren los datos.

### 4.5.1. Supervivencia y variables clínico-patológicas:

#### 4.5.1.1. Cohorte de pacientes con estadio III:

En relación con el índice Karnofsky, la SG tendió a ser mejor entre los pacientes con buen Karnofsky (90-100), pero no la SLE ( $p=0,13$  y  $p=0,56$ ). La histología mostró tendencia a ser mejor para los escamosos en SG y SLE ( $p=0,15$  y  $0,17$ ), mientras que el grado en la pieza quirúrgica no mostró diferencias en SLE ( $p=0,86$ ), aunque con tendencia a ser peor en los bien diferenciados ( $p=0,08$ ). El sexo femenino en este caso tendió a relacionarse con peor evolución ( $p=0,2$  y  $0,06$ ) para SG y SLE. Por último, la edad y el tabaquismo no mostraron diferencias ( $p>0,6$  para SG y SLE).

En cuanto al estadio clínico, la supervivencia fue superior en los IIIB que en IIIA, con una mediana de SG de 45 frente a 18 meses ( $p=0,04$ ). En relación con el estadio quirúrgico, en los 48 pacientes analizables la SG fue semejante para IIIA y IIIB (16,4 vs 14,2 meses), pero en ambos peor a los pacientes con mejoría en el estadio patológico tras la quimioterapia (Estadios inferiores a III) (31 meses) ( $p=0,01$ ). La SLE tendió a ser mayor en los estadios quirúrgicos inferiores a III (25 vs 13 meses,  $p=0,3$ ).



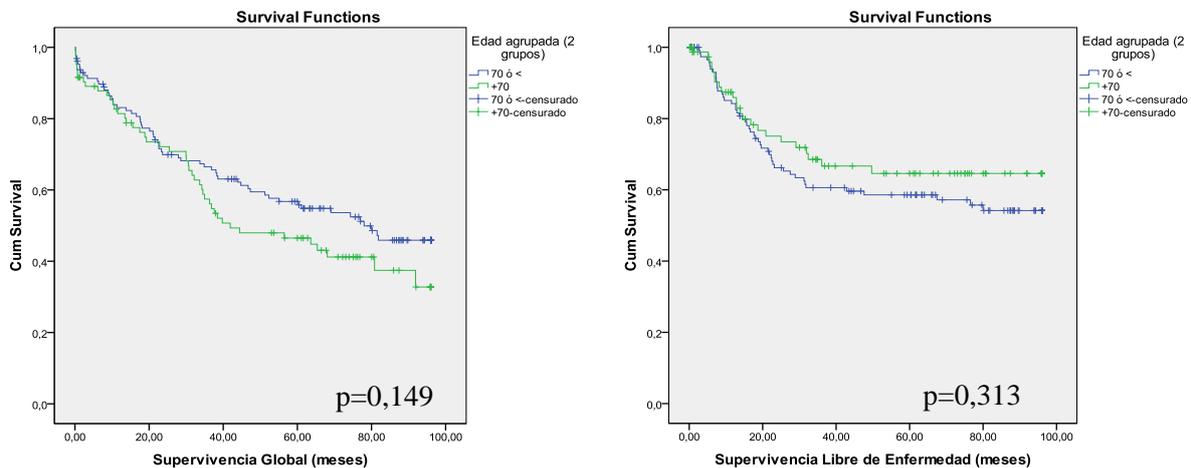
**Fig. 7. SG en relación con el E. quirúrgico (tras quimioterapia). Las cruces indican censuras. Cada caída a un nivel inferior significa un evento (en este caso exitus).**

## Resultados

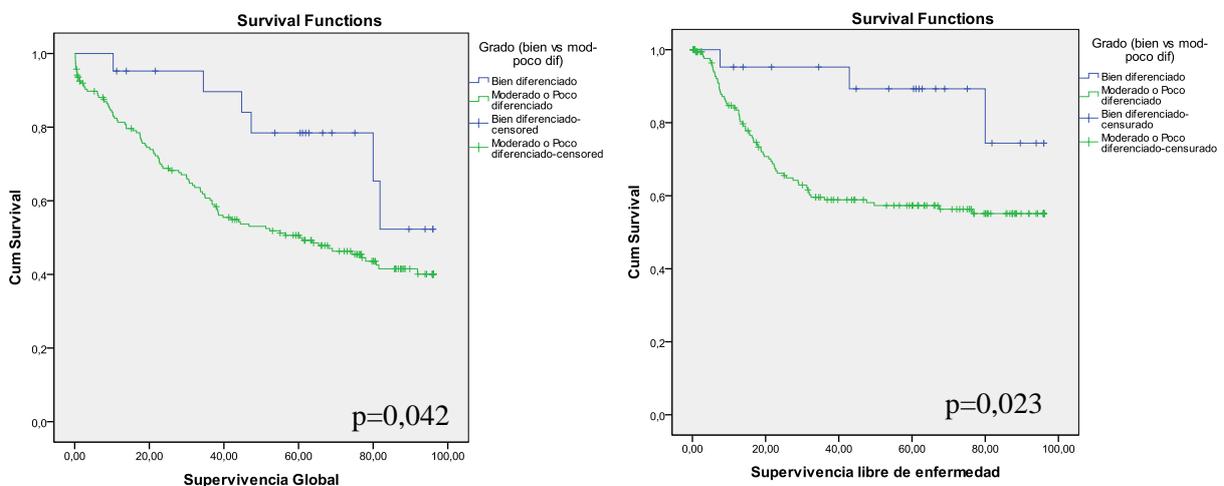
### 4.5.1.2. Cohorte de pacientes con estadio I y II:

Con respecto a la edad, no hubo diferencias ni en SG ni SLE, aunque las curvas de SG se separan a favor de los <70 años, mientras que esa tendencia se invierte para la SLE, siendo mejor para los >70 años, ( $p=0,149$  y  $p=0,313$ ). En cuanto al sexo, no hubo diferencias en SG ni SLE, aunque hubo tendencia a mayor SG en mujeres sin diferencia en SLE ( $p=0,104$  y  $P=0,647$ ). La ausencia de tabaquismo tendió a ser un factor de buen pronóstico para SG y SLE ( $p=0,068$  y  $0,17$ ). En relación con la histología, no hubo diferencia en SG y SLE entre adenocarcinoma y escamoso ( $p=0,69$ ,  $p=0,64$ ).

El grado de diferenciación fue un factor asociado a mayor SG y SLE ( $p=0,042$  y  $0,023$ ), siendo los bien diferenciados los que presentaron mejor supervivencia frente a los moderadamente o poco diferenciados, cuya supervivencia fue similar.



**Fig. 8 y 9. SG y SLE en relación con la edad (mayor o menor de 70 años). Cada caída a un nivel inferior indica un evento, (muerte para SG, recurrencia para SLE).**



**Fig. 10 y 11. SG y SLE en relación con el grado tumoral en pacientes con estadios I y II. Compara los bien diferenciados con los moderadamente o poco diferenciados.**

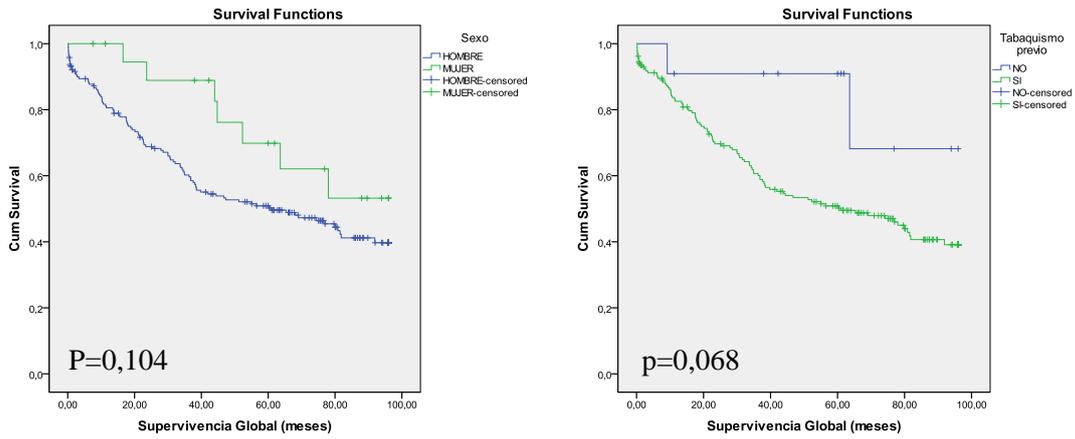


Fig. 12 y 13. SG en relación con sexo y tabaquismo en pacientes con estadios I y II.

En relación con el estadio, hubo diferencia en SG y SLE tanto agrupada (I mejor que II) ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ), separada (IA-IB-IIA-IIB) ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ), como de forma individual para la T ( $p < 0,0001$  y  $p < 0,0001$ ) o la N ( $p = 0,015$  y  $p = 0,114$ ), existiendo en este último caso tendencia a mejor SLE.

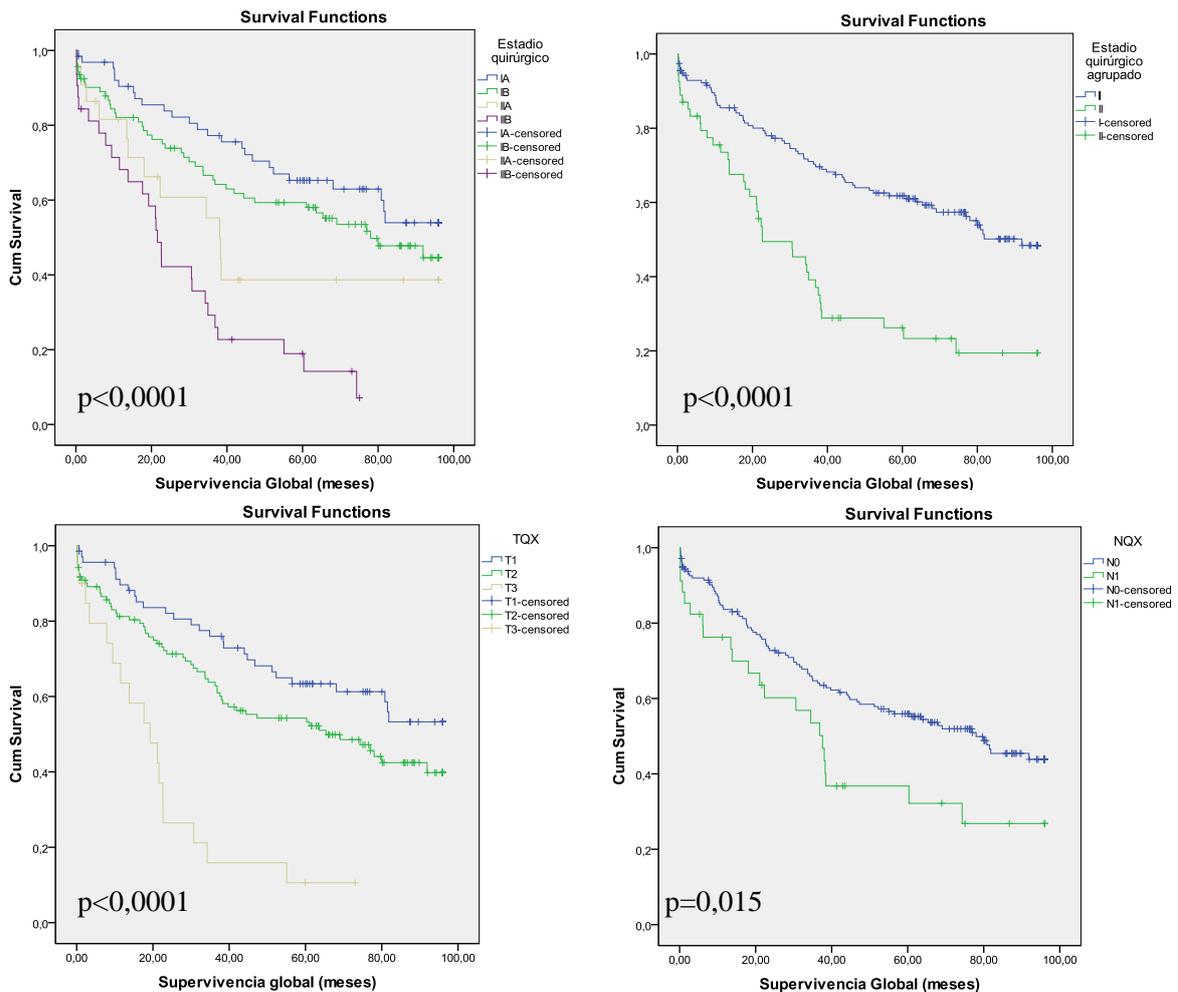
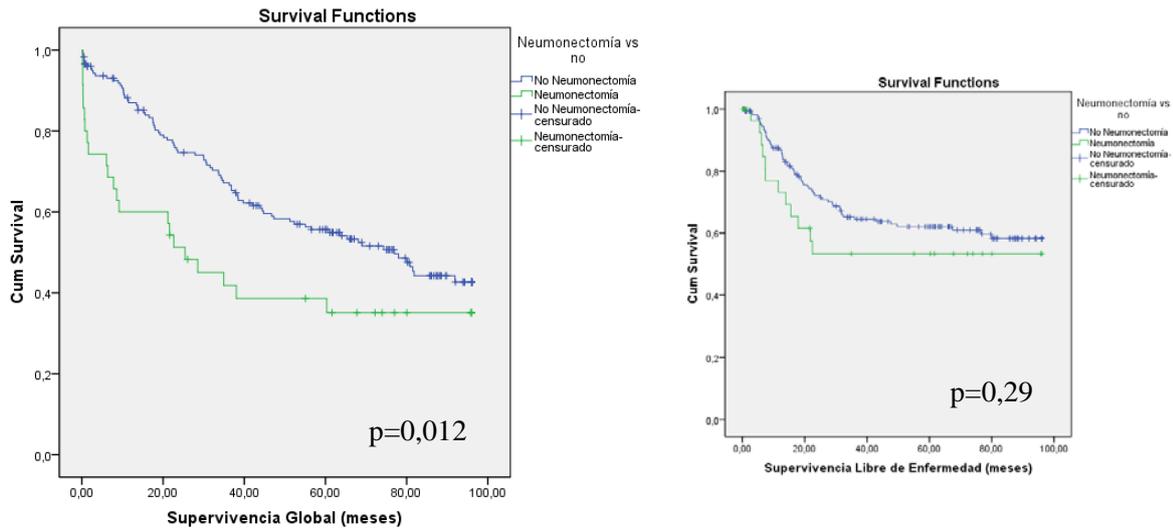


Fig. 14, 15, 16 y 17. Supervivencia Global en relación con los distintos aspectos del estadio tumoral. Estadio, Estadio agrupado, Tamaño tumoral T, Afectación ganglionar N.

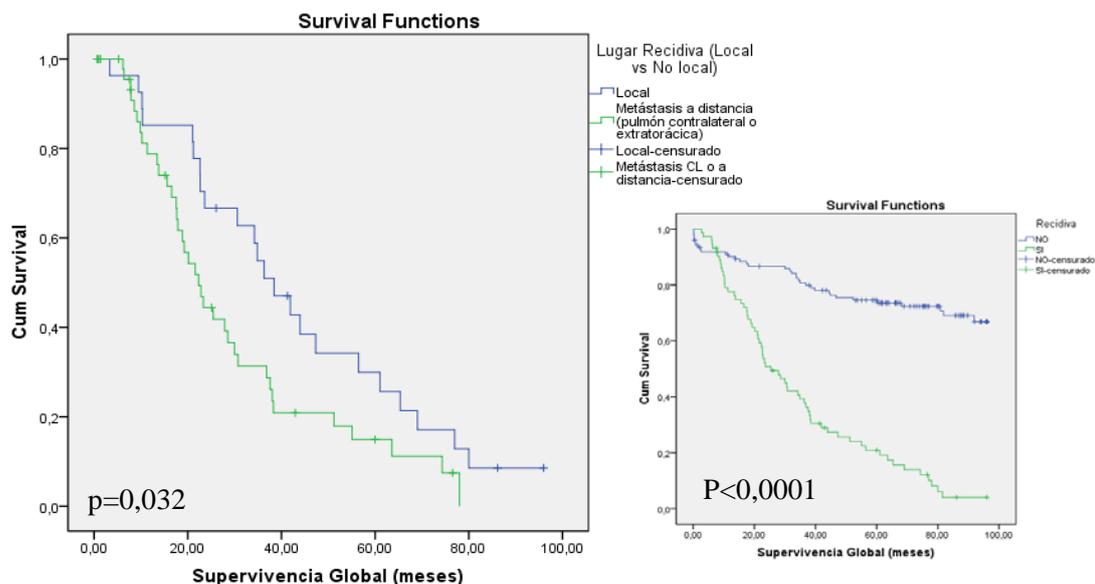
## Resultados



**Fig. 18 y 19. Curvas de supervivencia global y libre de enfermedad en relación con la cirugía, neumonectomía vs resección pulmonar subtotal.**

La neumonectomía influyó en el pronóstico de modo que los pacientes con neumonectomía tenían peor SG que los que fueron sometidos a una resección pulmonar subtotal ( $p=0,012$ ). Esta diferencia se diluyó en relación con la SLE ( $p=0,286$ ).

La presencia de recidiva y el tipo de la misma, influyó significativamente en la SG (en la SLE va implícito y no se analizó), con una esperable mayor supervivencia entre aquellos pacientes sin progresión ( $p<0,0001$ ). Además, dentro de los pacientes que presentaron progresión, la supervivencia era mayor cuando la recurrencia era local o por el contrario se producía a distancia, bien en el pulmón contralateral, bien en una localización extra-torácica ( $p=0,032$ ), con una mediana de 38 frente a 22 meses de SG.



**Fig. 20 y 21. Curva de supervivencia global en función del lugar de la recidiva. En la segunda se muestra la diferente supervivencia entre aquellos con y sin recurrencia.**

Tabla 11. Modelo univariante Cox para los principales factores clínico-patológicos en los pacientes con estadio inicial. Los riesgos proporcionales (Hazard Ratio, HR) se han calculado para ver la influencia negativa del factor de riesgo en la SG y SLE.

	Supervivencia Global		Superviv. Libre Enfermedad	
	HR (intervalo)	p (Cox)	HR (intervalo)	p (Cox)
<b>Estadio II (vs I)</b>	2,62 (1,75-3,91)	<b>&lt;0,001</b>	2,86 (1,77-4,63)	<b>&lt;0,001</b>
<b>Neumonectomía</b>	1,81 (1,13-2,90)	<b>0,013</b>	1,40 (0,75-2,60)	0,288
<b>Grado: P-M difer.</b>	2,29 (1,01-5,24)	<b>0,048</b>	3,50 (1,10-11,1)	<b>0,034</b>
<b>Tabaquismo</b>	3,41 (0,84-13,9)	0,086	2,56 (0,63-10,53)	0,189
<b>Adenocarcinoma</b>	1,07 (0,74-1,58)	0,690	1,12 (0,70-1,77)	0,641
<b>Sexo masculino</b>	1,87 (0,87-4,02)	0,110	1,20 (0,55-2,62)	0,648
<b>Edad &gt;70</b>	1,33 (0,90-1,95)	0,151	1,29 (0,79-1,29)	0,315
<b>Recurrencia</b>	4,44 (2,98-6,67)	<b>&lt;0,001</b>		

#### 4.5.2. Supervivencia y p38 en estadios III:

##### 4.5.2.1 p38 en biopsias diagnósticas:

En el análisis de la SG entre los 18 pacientes analizables, los pacientes p38 3+ en núcleo presentaron una mediana de 11,6 meses, frente a los 26 meses del resto de la muestra ( $p=0,046$ ). A pesar de resultar significativa, el escaso número de casos (tres), hace que esta diferencia desaparece si la muestra es agrupada entre positivos o negativos ( $p=0,6$ ). La diferencia fue mayor si se analizaba la SET ( $p=0,018$ ). Esta diferencia fue semejante para SLE pero no significativa. La p38 citoplásmica no mostró diferencias en supervivencia ( $p=0,5$ ).

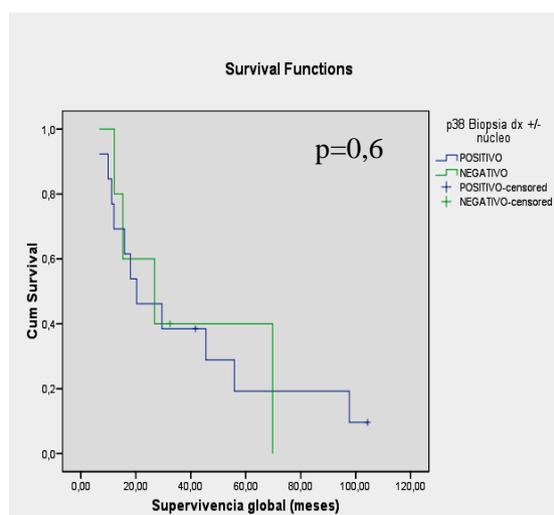
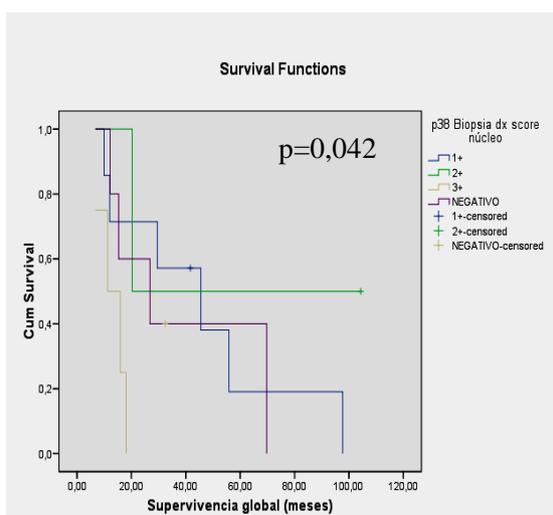


Fig. 22 y 23. Curva de supervivencia global en relación con p38 nuclear en biopsias diagnósticas. La primera en base al score y la segunda en base a la positividad.

#### 4.5.2.2. p38 en biopsias quirúrgicas:

En los 48 pacientes analizables para SG en núcleo y citoplasma, no hubo diferencias en SG (leve tendencia a mayor SG en positivos en núcleo y negativos en citoplasma) ( $p=0,8$  y  $p=0,35$ ). Adicionalmente, al valorar las curvas actuariales se observó una separación más llamativa realizando el análisis los 3 años. No hubo diferencia en SLE ni en relación con la proteína nuclear ni citoplásmica ( $p=0,9$  y  $p=0,9$ ).

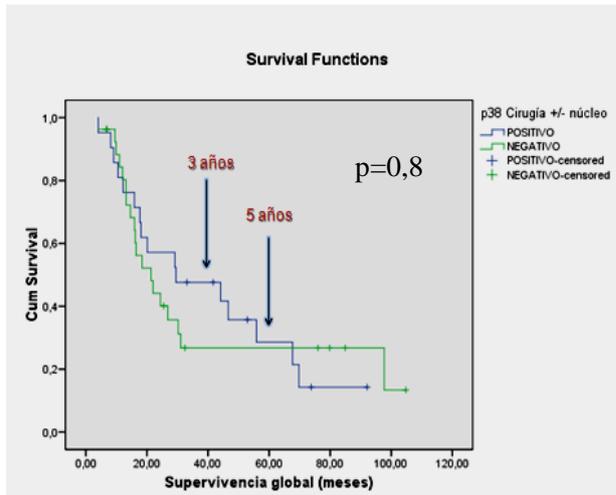


Fig. 24. SG en relación con P-p38 quirúrgica. Analiza la tinción nuclear, mostrando la progresiva aproximación de las curvas.

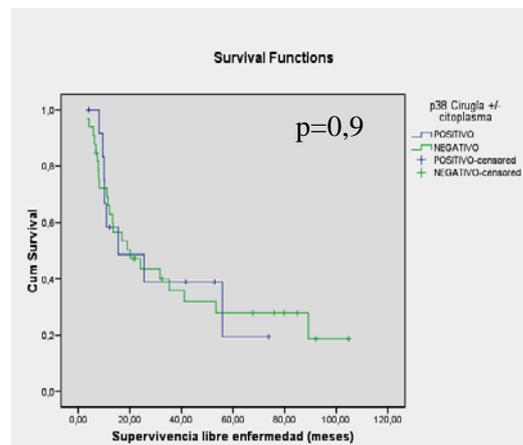
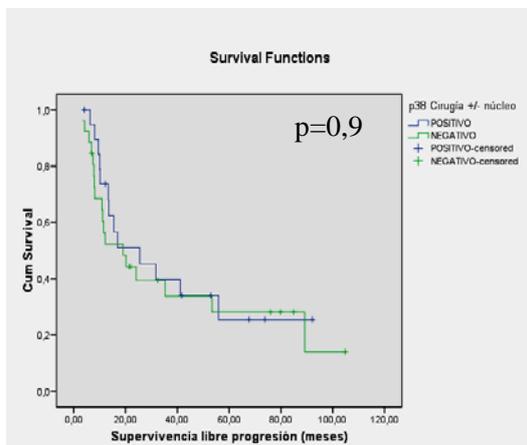


Fig. 25 y 26. SLE en base a P-p38 nuclear y citoplásmica en cirugía. No muestra diferencias.

Adicionalmente se analizó la diferencia entre los pacientes intervenidos sin quimioterapia (no utilizados en el análisis de la supervivencia) frente a los intervenidos tras quimioterapia. Los primeros (seis pacientes) fueron 100% negativos en núcleo y citoplasma para p38, mientras que hubo un 44% y 30% de positividad nuclear y citoplásmica entre los 48 tratados ( $p=0,027$ ;  $p=0,025$ ). Si analizamos los 12 pacientes con ambos tipos de biopsia con datos válidos para el estudio de SG, se observó que en los siete pacientes en los que no hubo cambio en p38, ya fuera positiva o negativa, la mediana de supervivencia fue de 55 meses, el negativo que se positivizó fue de 69 meses, y en los cuatro que se negativizaron, fue de tan sólo 12 meses.

### 4.5.3. Supervivencia y marcadores moleculares en estadios I

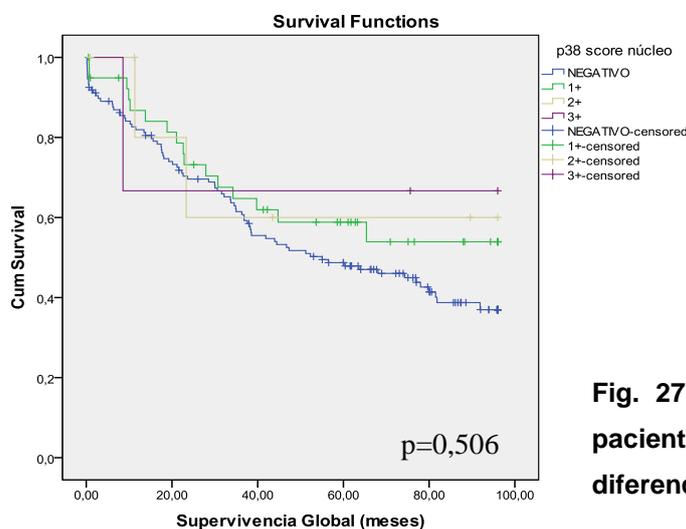
y II:

Antes de comenzar a describir la supervivencia global y libre de enfermedad, se decidió analizar los pacientes que tenían un fallecimiento en el postoperatorio agudo (en los días-semanas siguientes a la cirugía, por insuficiencia respiratoria aguda que les impedía la recuperación post-operatoria), para valorar si se asociaba con alguna de las variables moleculares. Se encontraron 8 pacientes con esta característica, de los cuales 7 fueron negativos para JNK, con un 50,5% vs 87,5% de casos negativos entre los pacientes sin y con fallecimiento postoperatorio ( $p=0,067$ ). Asimismo 5 de dichos pacientes eran negativos para las 3 MAPK (p38, JNK, ERK) y 7 positivos para EGFR ( $p=0,128$  y  $0,141$ , respectivamente).

Por otro lado, en una tabla final se describirán los porcentajes de pacientes supervivientes (SG) o sin progresión (SLE) al final del seguimiento para cada uno de los marcadores moleculares, los meses de supervivencia en los casos que se puedan calcular y el nivel de significación log rango con el hazard ratio correspondiente, HR.

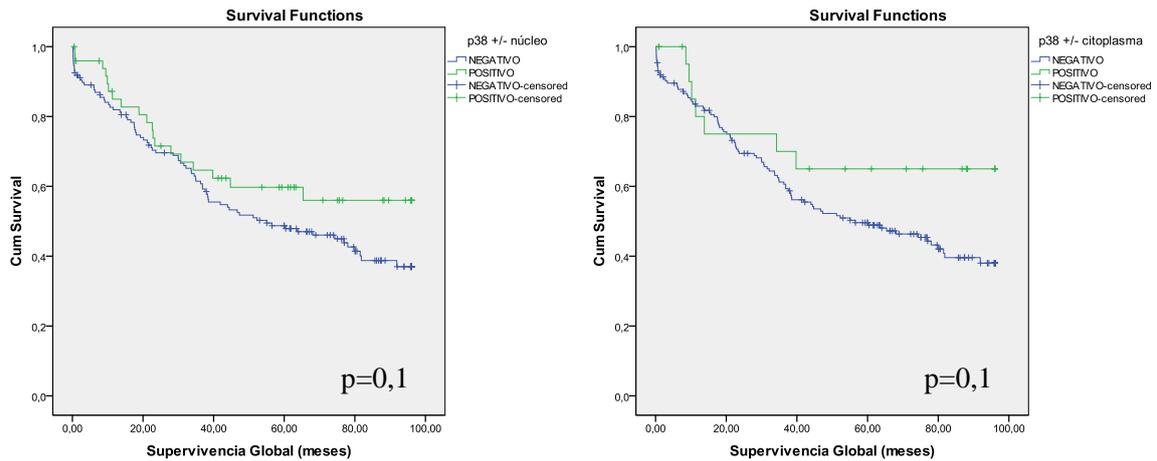
#### 4.5.3.1. p38 y supervivencia:

No hubo diferencias significativas en el análisis por score, siendo la supervivencia de los 3+ nuclear similar al resto, aunque se trataba de pocos casos como se comentó previamente ( $p=0,506$ ). Agrupando entre positivos y negativos, tanto en núcleo como en citoplasma, se encontró una tendencia en ambos casos a mejor SG en los positivos, ( $p=0,1$  y  $p=0,1$ ), que no fue tan consistente en la SLE, siendo las curvas prácticamente superponibles en ambos casos ( $p=0,6$  y  $0,6$ ).

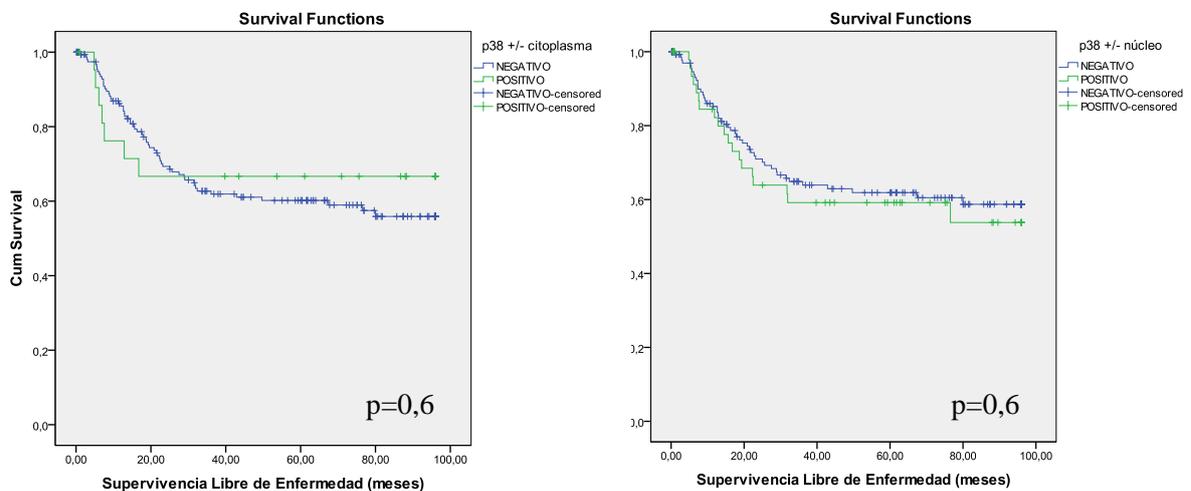


**Fig. 27. SG en base a p38 nuclear en pacientes con estadio I y II. No muestra diferencias.**

## Resultados



**Fig. 28 y 29. SG en base a P-p38 nuclear y citoplásmica en pacientes con estadio I y II. Muestra tendencia no significativa a mejor supervivencia entre casos positivos.**

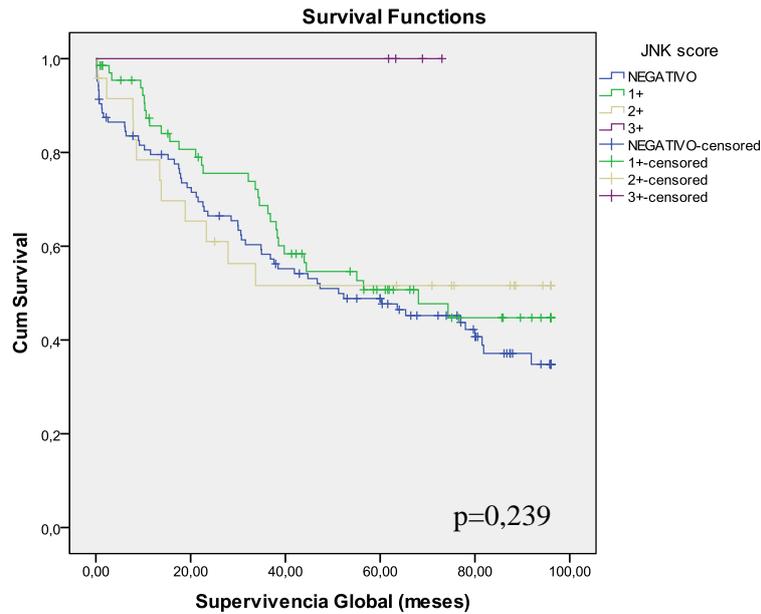


**Fig. 30 y 31. SLE en base a P-p38 nuclear y citoplásmica en pacientes con estadio I y II. No se aprecian diferencias, existiendo una superposición en las curvas.**

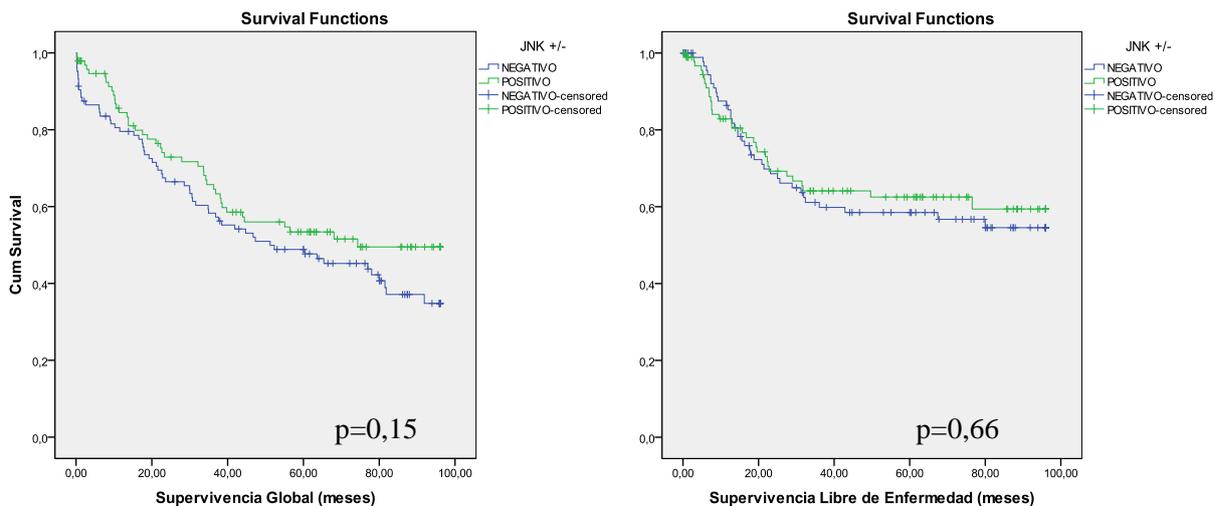
Se investigó el posible papel de la positividad o negatividad combinando núcleo y citoplasma, no encontrando diferencias significativas, con superposición de las curvas de supervivencia global y libre de enfermedad.

### 4.5.3.2. JNK y supervivencia:

Como se comentó previamente, sólo hubo tinción nuclear. El análisis por el score no mostró diferencias importantes, pudiendo comentarse que los 3+ (4 casos) fueron todos censurados para supervivencia global y libre de enfermedad ( $p=0,239$ ). Agrupando los casos por positividad, las diferencias no fueron significativas, pero de nuevo existió una tendencia a la mejor SG en los casos positivos (0,15). Para SLE las diferencias fueron mucho menores ( $p=0,66$ ).



**Fig. 32. SG en base a P-JNK nuclear en pacientes con estadio inicial. No muestra diferencias salvo en los 3+, pero escaso número de pacientes.**

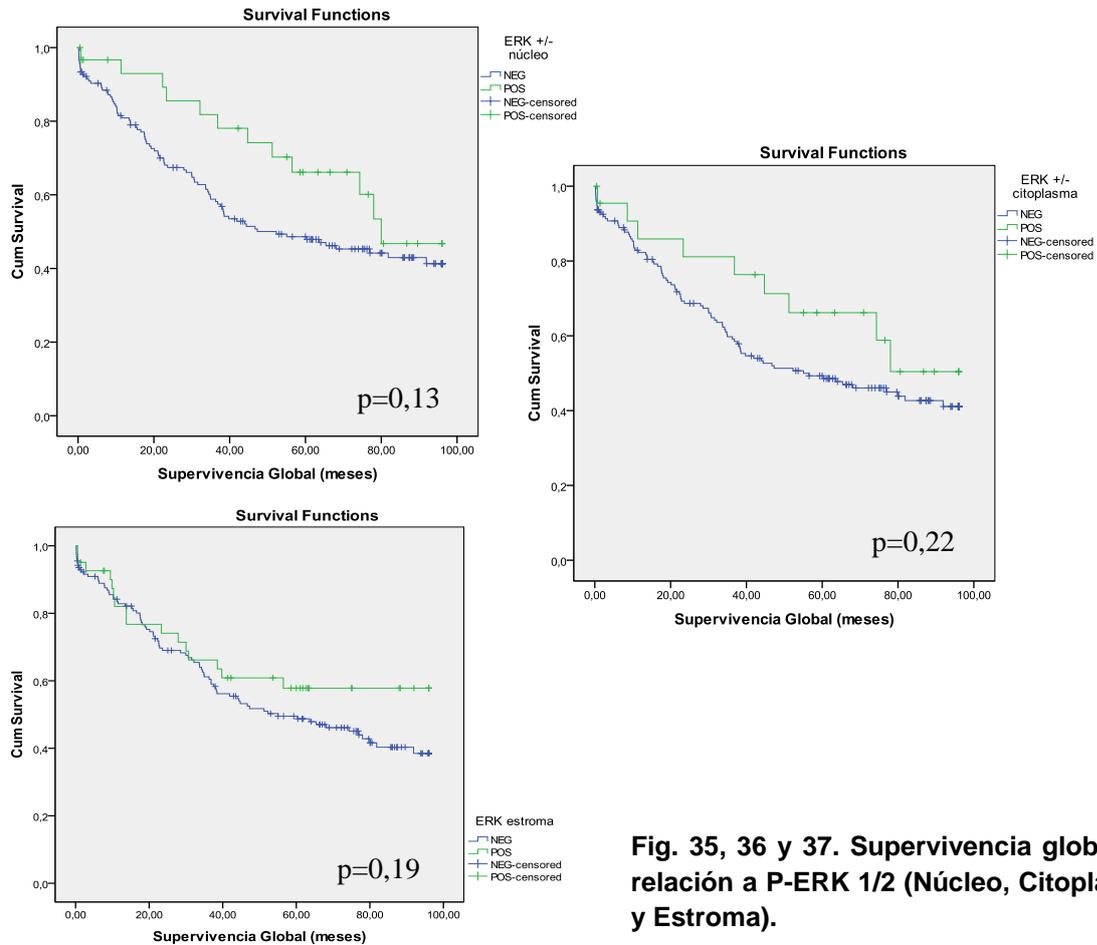


**Fig. 33 y 34. SG y SLE en base a P-JNK nuclear y citoplásmica en pacientes con estadio inicial. Muestra tendencia a mayor supervivencia en los positivos**

**4.5.3.3. ERK y supervivencia:**

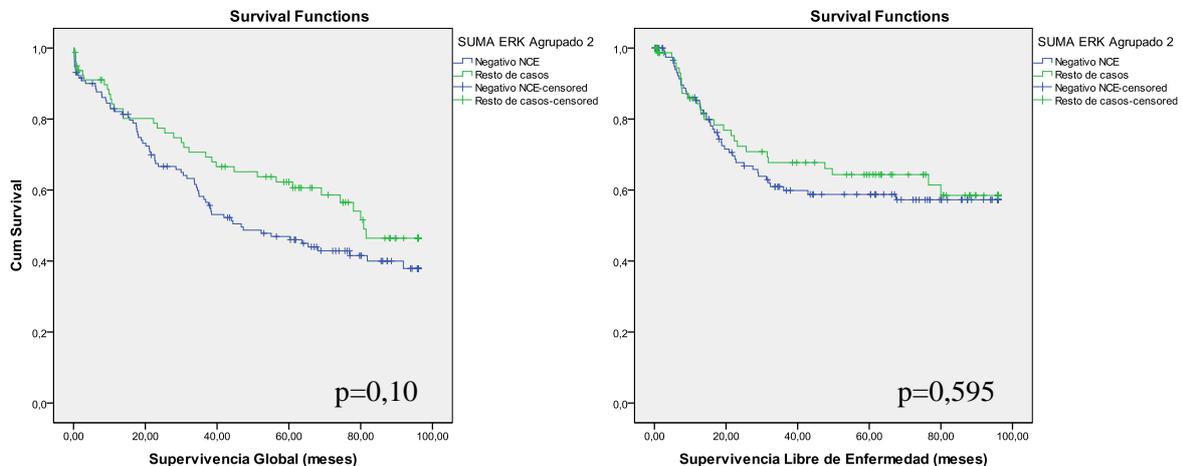
En cuanto a la activación nuclear, esta mostró una clara tendencia a mejor SG en los pacientes positivos (p=0,13). La tendencia fue similar para la positividad en citoplasma y estroma (p=0,22 y p=0,19). La SLE fue similar en las tres localizaciones para positivos y negativos (p=0,9, p=0,9, p=0,5).

## Resultados

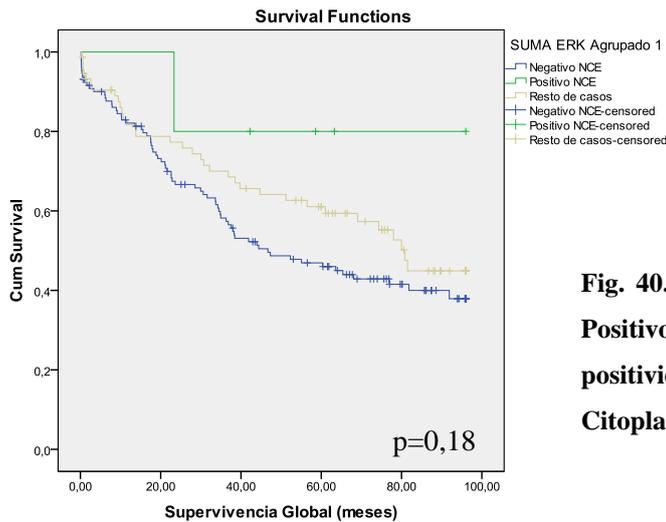


**Fig. 35, 36 y 37. Supervivencia global en relación a P-ERK 1/2 (Núcleo, Citoplasma y Estroma).**

Se investigó el valor de la presencia o ausencia en conjunto de la proteína nuclear, citoplásmica y en estroma. Sin obtener resultados significativos, sí se observó una tendencia a peor supervivencia global cuando las tres localizaciones eran negativas ( $p=0,10$ ). Para SLE la tendencia es similar, pero las diferencias son menos relevantes ( $p=0,595$ ). De forma adicional, cuando las tres localizaciones eran positivas, existió una tendencia a mejor supervivencia, aunque de nuevo el escaso número de casos no permite obtener conclusiones ( $p=0,18$  y  $p=0,635$ , SG y SLE).



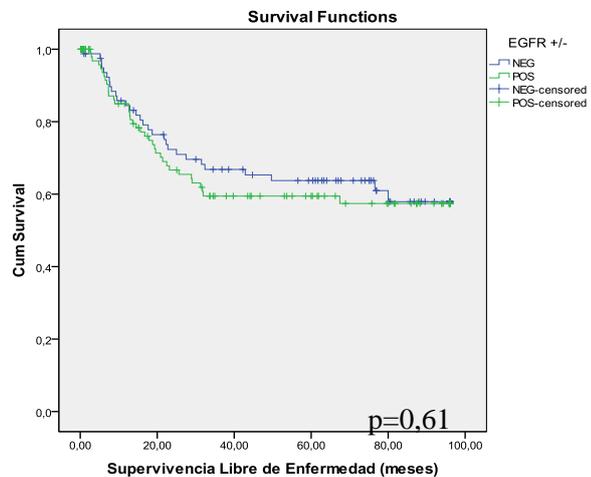
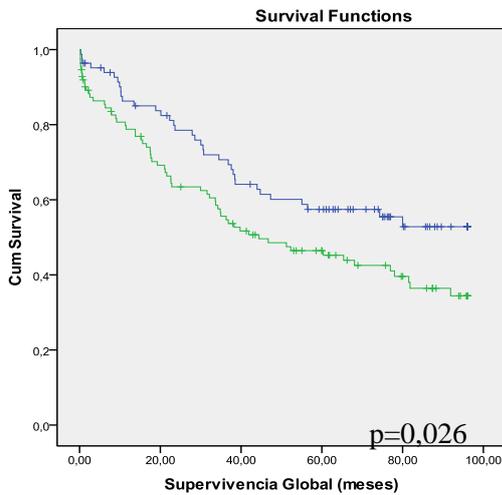
**Fig. 38 y 39. SG y SLE en relación a negatividad ERK. NCE: Núcleo, Citoplasma, Estroma.**



**Fig. 40.** SG en relación a ERK. Negativo y Positivo NCE se refieren a negatividad o positividad en las tres localizaciones, Núcleo, Citoplasma, Estroma.

**4.5.3.4. EGFR y supervivencia:**

Para este marcador, la positividad del mismo en la membrana significó peor pronóstico para SG ( $p=0,026$ ), aspecto que no se mantuvo consistente para la SLE ( $p=0,61$ ).



**Fig. 41 y 42.** SG y SLE en relación a EGFR. En el primer caso las diferencias fueron significativas.

**4.5.3.5. p53 y supervivencia:**

En este caso, la positividad para p53 fue significativamente mejor que la negatividad en cuanto a SG ( $p=0,041$ ), perdiéndose la significación en SLE ( $p=0,44$ ).

## Resultados

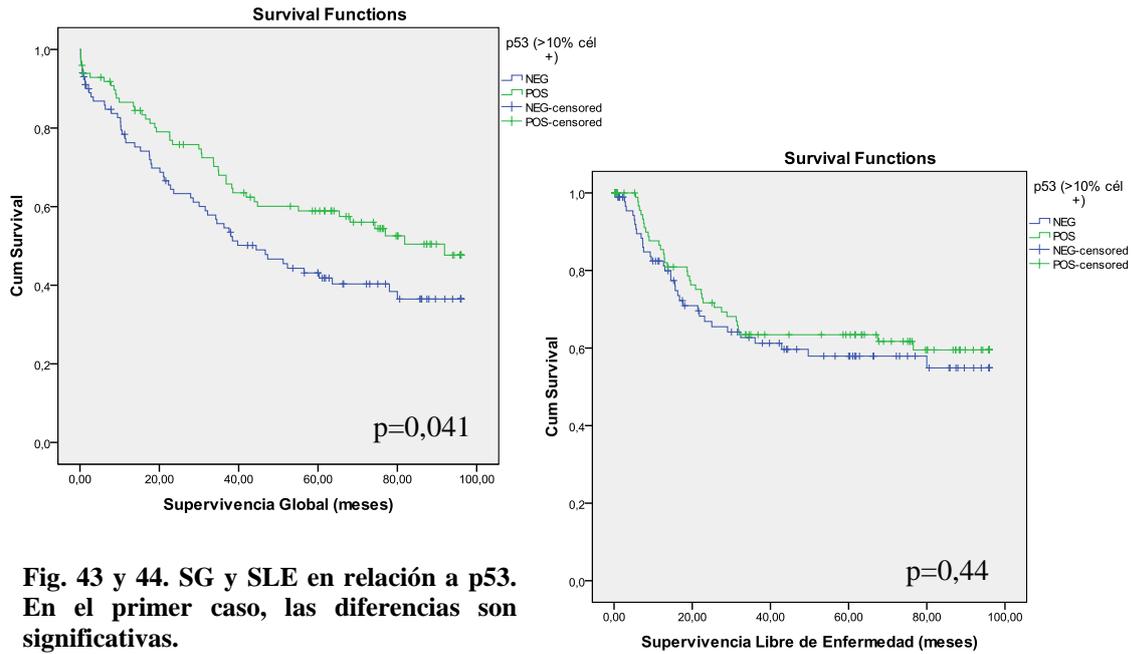


Fig. 43 y 44. SG y SLE en relación a p53. En el primer caso, las diferencias son significativas.

### 4.5.3.6. HER-2 y supervivencia:

Simplemente mostramos a continuación las curvas de supervivencia en relación con la presencia de algún tipo de expresión de HER-2. Parece haber peor evolución entre los 5 pacientes positivos, tanto para SG como para SLE ( $p=0,139$  y  $p=0,039$ ) pero consideramos que el escaso número de pacientes hace difícil la interpretación de estos resultados.

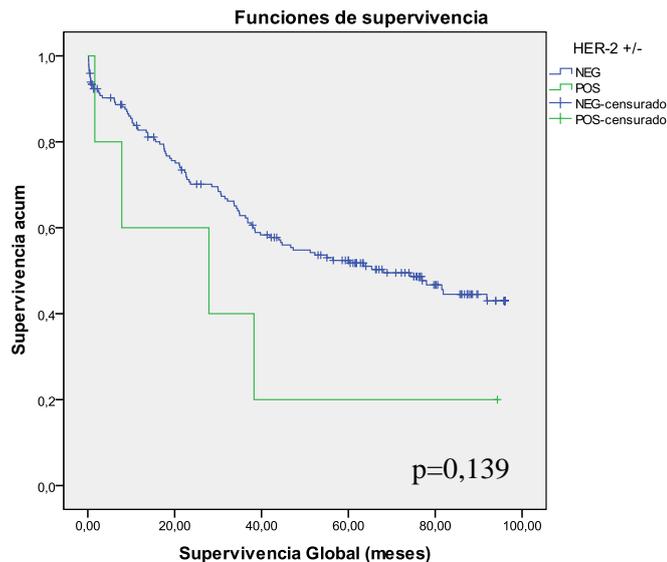


Fig. 45. Supervivencia global en relación con HER-2.

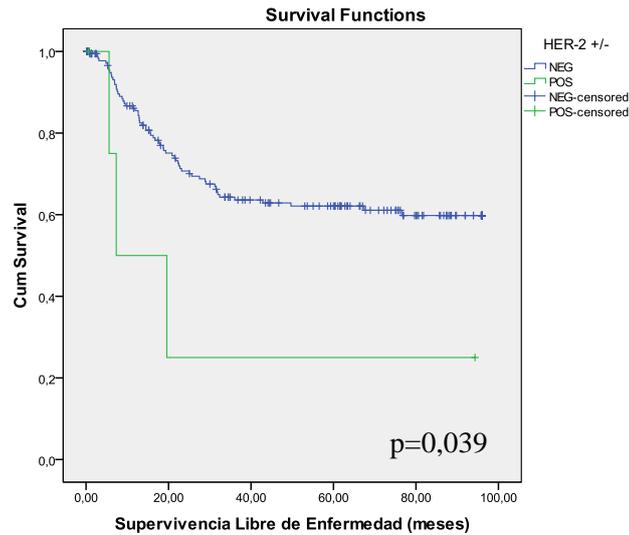


Fig. 46. SLE en relación con HER-2.

**4.5.3.7. MAPK agrupadas y supervivencia:**

Dado que las tres MAPK mostraron, en la expresión nuclear y fundamentalmente en relación con la supervivencia global, una tendencia no significativa a presentar diferencias entre los pacientes positivos (mejor supervivencia) y negativos (peor supervivencia), se decidió estudiar la evolución de los pacientes que eran positivos para las tres MAPK, a los que se llamará “Triple Positivos” (MTP) en este trabajo. También se analizó el valor de la ausencia de los tres, a lo que se llamó “Triple Negativos”.

El análisis de los pacientes Triple Positivos, mostró una mejoría en la supervivencia global, comparados con el resto de las posibilidades combinatorias, habiendo en total un número de 15 casos MTP ( $p=0,013$ ).

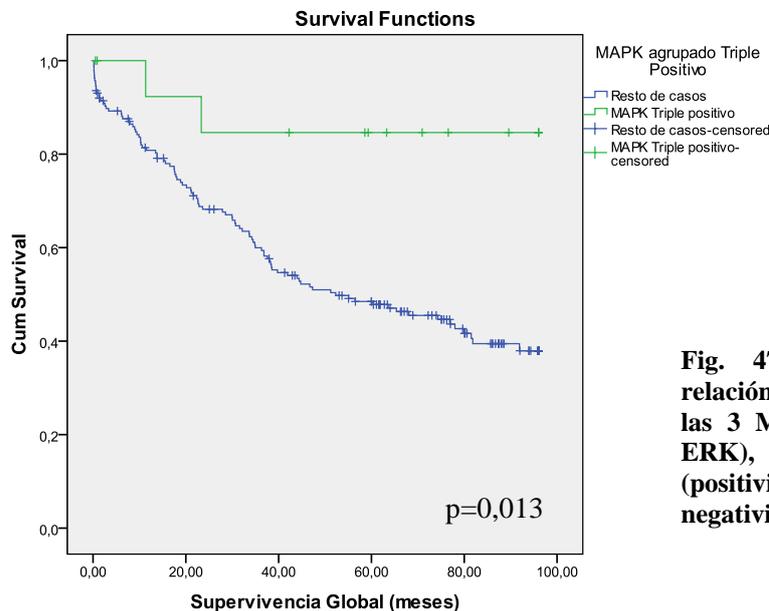
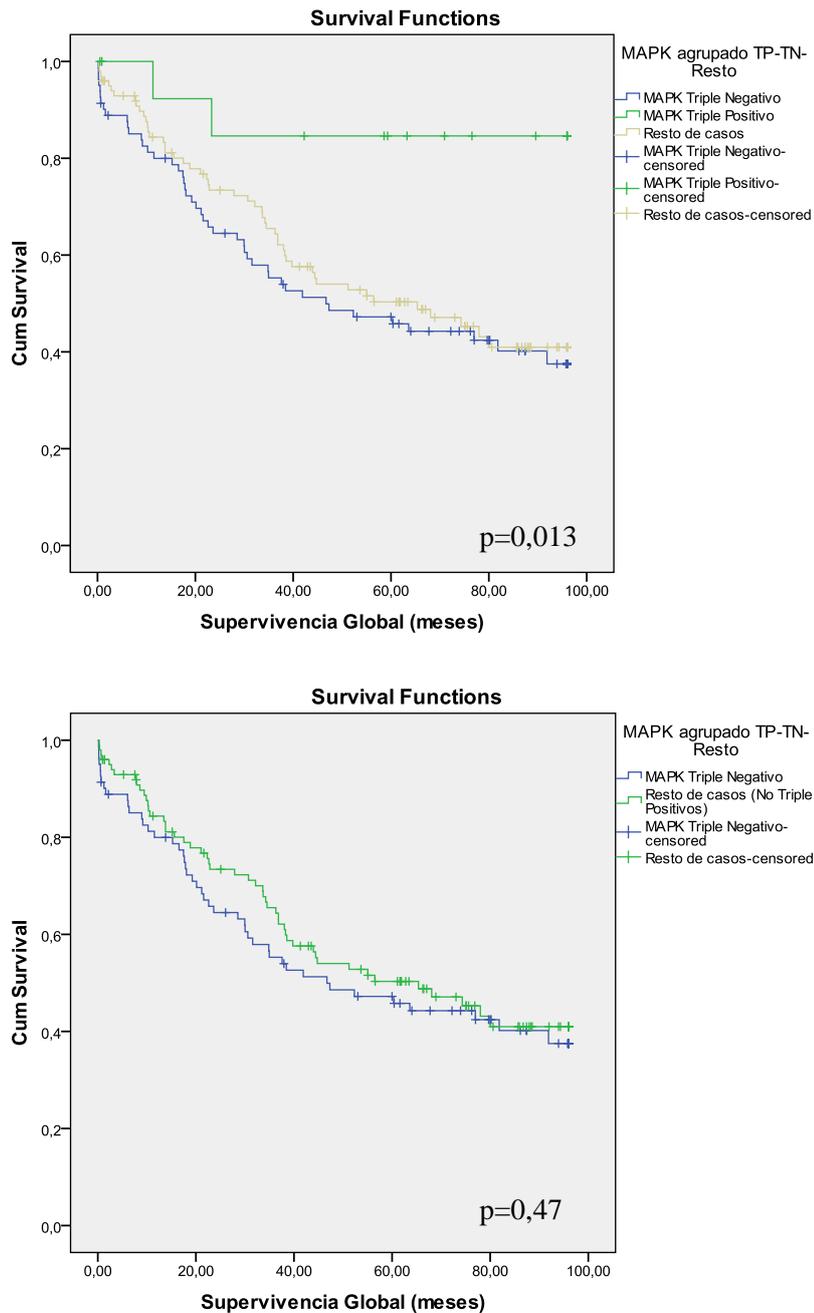


Fig. 47. Supervivencia Global en relación a la presencia de positividad en las 3 MAPK en núcleo (p38, JNK y ERK), frente al resto de casos (positividades en alguno de ellos o negatividad en todos).

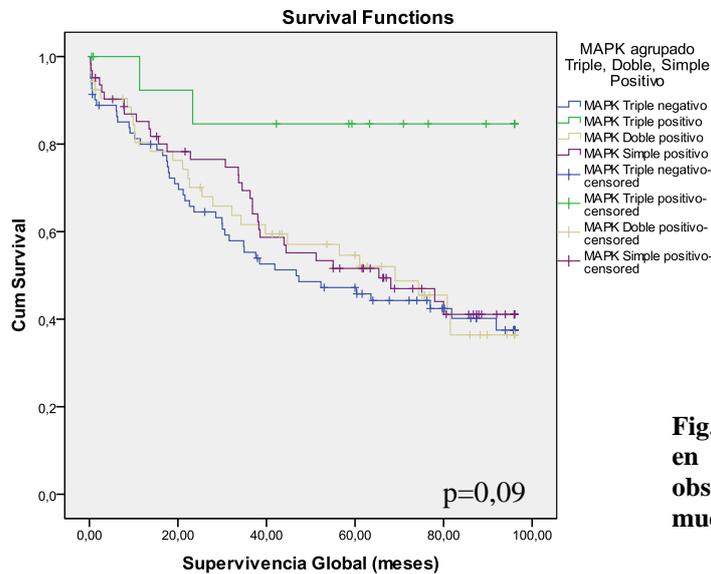
## Resultados

Esta diferencia se mantenía cuando sólo se comparaban Triple Positivos y Triple Negativos ( $p=0,013$ ) y cuando se analizaban todos los pacientes, pero diferenciando entre Triple Positivos, Triple Negativos y resto de casos (que incluían doble o simple positivos), aunque la significación era menor ( $p=0,041$ ). Analizando sólo los pacientes que no eran Triple Positivos (Triple Negativos y resto de casos no Triple Positivos), hubo tendencia a peor supervivencia entre los primeros ( $p=0,47$ ).



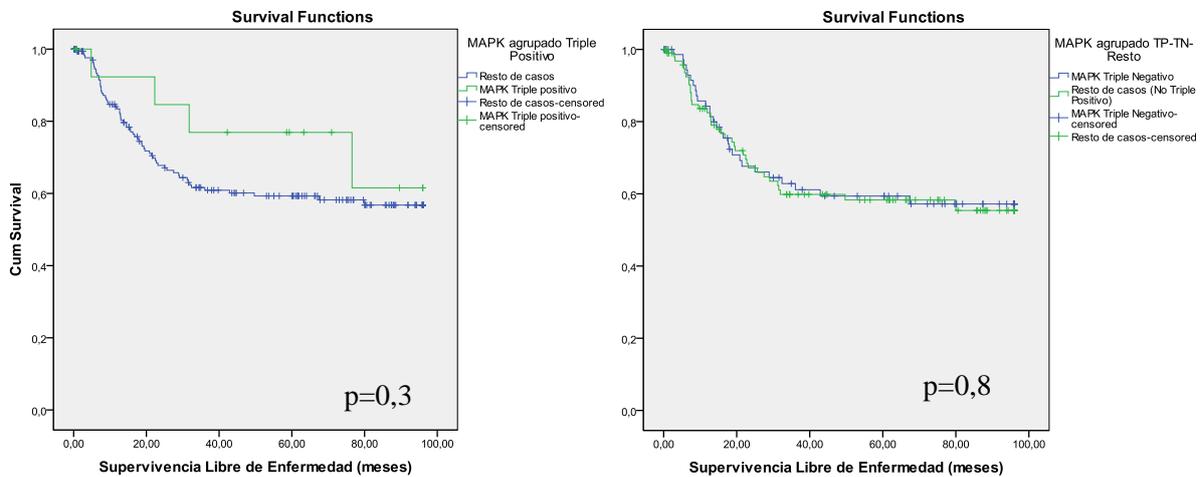
**Fig. 48 y 49.** La primera muestra las diferencias entre los pacientes Triple Positivos, Negativos y el resto de casos, mientras que en la segunda se exploran las diferencias sólo entre pacientes Triple Negativos y resto No Triple Positivos.

Al analizar aún más detalladamente y estudiar los pacientes con positividad en dos de los marcadores, las diferencias se pierden, sólo conservándose diferentes los Triple Positivos ( $p=0,09$ ).



**Fig. 50.** Se muestra en este caso la SG en relación a todos los subgrupos. Se observa que salvo los TP, el resto no muestran diferencias reseñables.

Hubo tendencia a mejor SLE entre los pacientes Triple Positivos con respecto al resto de casos ( $p=0,3$ ), habiendo una práctica superposición entre los Triple Negativos y el resto de pacientes ( $p=0,8$ ).



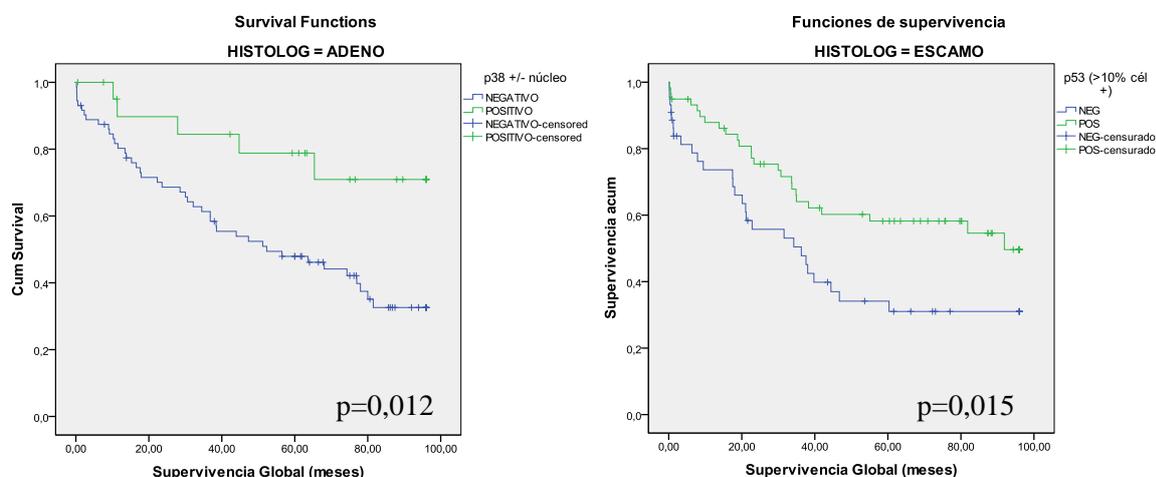
**Fig. 51 y 52.** SLE en Triple Positivos. Se observa que los Triple Positivos se comportan mejor que el resto globalmente. Entre los Triple Negativos y el resto de casos no hay diferencias.

Comentar que los MAPK Triple positivos ocurrieron todos en pacientes con estadio I ( $p=0,013$ ), con tendencia a asociarse con p53 positivo ( $p=0,08$ ), sin asociación con grado, histología, sexo, o tabaquismo ( $p>0,1$  en todos), ni con sobreexpresión de EGFR ( $p=0,182$ ), siendo más frecuente en el grupo de edad  $> 70$  años ( $p=0,051$ ).

#### 4.5.3.8. Análisis de subgrupos:

Con las limitaciones que supone en cuanto a potencia estadística, se decidió estudiar por medio de un análisis por subgrupos la influencia en la supervivencia de la presencia o no de las distintas variables clínicas o moleculares en relación con el papel pronóstico de cada una de las variables moleculares individualmente en la cohorte de pacientes estadio I y II. Se realizó para p38, JNK, ERK, EGFR y p53, con las variables sexo, histología, tabaquismo, neumonectomía, estadio y edad, así como con el resto de variables moleculares para intentar conocer si el pronóstico podría ser modificado con cada una de ellas. Se observaron muy pocas diferencias y se hará referencia sólo a aquellas porque exponer todos los resultados sería además de superfluo, inabarcable.

La histología fue un factor diferenciador para p38 y para p53. En cuanto a p38 nuclear, se obtuvo diferencia para SG en los adenocarcinomas ( $p=0,012$ ), no observada en los escamosos ( $p=0,757$ ). Con p53, la influencia en el pronóstico sólo se mantenía en los carcinomas escamosos ( $p=0,015$ ), perdiéndose en los adenocarcinomas ( $p=0,604$ ). El resto de variables no se vieron influidas por la histología



**Fig. 53 y 54. Kaplan-Meier para SG en función de la histología. Para p38 la histología adenocarcinoma y para p53 la histología escamosa muestran diferencias significativas. En las histologías alternativas las curvas se superponen y por ello no se muestran.**

En cuanto a la influencia de las variables moleculares entre sí, se observó que cuando p38 es positivo en núcleo, EGFR no interfiere en el pronóstico ( $p=0,983$ ), pero sí cuando es negativo ( $p=0,013$ ). Al contrario, cuando ERK es positivo en el estroma, EGFR se comporta al revés, tendiendo los positivos a tener mejor pronóstico ( $p=0,106$ ), permaneciendo peor en los ERK negativos ( $p=0,003$ ).

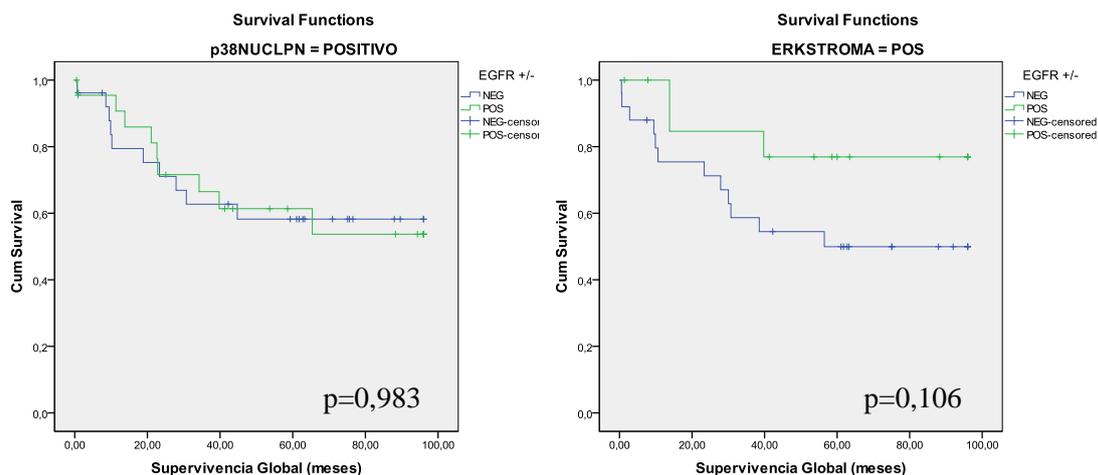


Fig. 55 y 56. Kaplan-Meier para SG en función la positividad o negatividad de EGFR y la influencia en su papel pronóstico de p38 y ERK en estroma. En el primer caso se muestra la superposición de las curvas si p38 es positivo y en el segundo la inversión del papel pronóstico de EGFR si hay expresión de ERK en estroma.

#### 4.5.3.9. Resumen variables moleculares y supervivencia:

En las siguientes dos tablas se resumen las asociaciones con la supervivencia global y libre de enfermedad según los distintos marcadores moleculares analizados.

Tabla 12. Características de supervivencia global según las variables moleculares en pacientes con estadio I y II. Se comparan pacientes positivos con negativos, salvo en dos casos: el análisis de ERK NCE (agrupando los Triple Negativos en Núcleo, Citoplasma y Estroma, donde se agrupan entre Triple negativos (TN) y no triple negativos), y el análisis agrupado de MAPK (p38, JNK, ERK nucleares), entre Triple Positivos (Triple +) y el resto. % vivos/cens. se refiere al % de pacientes vivos o censurados en el momento del análisis de supervivencia (seguimiento de 96 meses). Meses: mediana supervivencia. N/A ocurre cuando alguna de las dos medianas no puede ser calculada por no tener el número de censuras suficientes. HR: Hazard Ratio. El cálculo del HR se refiere al estado del marcador referido para cada caso, que siempre es el estado considerado “protector” según el análisis Kaplan-Meier.

Variable	Estado	Kaplan-Meier y Log Rank			Modelo Cox univariante	
		% vivos/cens	Mediana SV	p (L-R)	HR	p (Cx)
p38 Núcleo	Positivo	62,0 vs 44,9	N/A vs 55,0	0,135	0,68 (0,42-1,13)	0,137
p38 Citopl.	Positivo	69,6 vs 46,6	N/A vs 56,4	0,101	0,53 (0,25-1,14)	0,106
JNK Núcleo	Positivo	56,3 vs 42,3	74,3* vs 51,2	0,156	0,75 (0,51-1,12)	0,158
ERK Núcleo	Positivo	61,3 vs 47,6	80,0* vs 52,3	0,139	0,64 (0,35-1,16)	0,143
ERK Citopl.	Positivo	60,9 vs 48,3	N/A vs 55,0	0,220	0,65 (0,33-1,30)	0,224
ERK Estrom.	Positivo	61,0 vs 46,8	N/A vs 55,0	0,193	0,70 (0,41-1,20)	0,196
ERK NCE	No TN	45,0 vs 56,3	46,7 vs 80*	0,103	0,72 (0,48-1,07)	0,104
p53 >10%	Positivo	55,6 vs 43,6	91,8* vs 44,1	<b>0,041</b>	<b>0,67 (0,45-0,99)</b>	<b>0,043</b>
EGFR mb.	Negativ.	57,8 vs 42,9	N/A vs 44,4	<b>0,026</b>	<b>0,63 (0,42-0,95)</b>	<b>0,027</b>
HER2 mb	Negativ.	20,0 vs 50,8	67,0 vs 27,8	0,139	0,48 (0,18-1,30)	0,149
MAPK Agp.	Triple +	86,7 vs 46,0	N/A vs 52,3	<b>0,013</b>	<b>0,20 (0,05-0,82)</b>	<b>0,026</b>

Tabla 13. Características de *supervivencia libre de enfermedad* según las variables moleculares en pacientes con estadio I y II. Se comparan pacientes positivos con negativos, salvo en dos casos: el análisis de ERK NCE (agrupando los Triple Negativos en Núcleo, Citoplasma y Estroma, donde se agrupan entre Triple negativos (TN) y no triple negativos), y el análisis agrupado de MAPK (p38, JNK, ERK nucleares), entre Triple Positivos (Triple +) y el resto. El resto de abreviaturas son las mismas que las utilizadas en la tabla previa.

Variable	Estado	Kaplan-Meier y Log Rank			Modelo Cox univariante	
		% no rec./cens	Meses	p (L-R)	HR	p (Cx)
p38 Núcleo	Positivo	62,0 vs 67,3	N/A	0,605	1,15 (0,68-1,96)	0,606
p38 Citopl.	Positivo	69,6 vs 65,5	N/A	0,672	0,84 (0,39-1,84)	0,673
JNK Núcleo	Positivo	66,7 vs 64,4	N/A	0,666	0,90 (0,56-1,45)	0,666
ERK Núcleo	Positivo	61,3 vs 65,7	80 vs N/A	0,928	1,03 (0,55-1,92)	0,928
ERK Citopl.	Positivo	60,9 vs 65,5	76,5 vs N/A	0,915	1,04 (0,52-2,10)	0,915
ERK Estrom.	Positivo	68,3 vs 64,1	N/A	0,563	0,83 (0,45-1,53)	0,564
ERK NCE	No TN	67,5 vs 64,9	N/A	0,595	0,88 (0,54-1,42)	0,595
p53 >10%	Positivo	65,7 vs 66,3	N/A	0,477	0,84 (0,52-1,36)	0,477
EGFR mb.	Negativ.	67,0 vs 65,1	N/A	0,615	0,88 (0,54-1,44)	0,615
<b>HER2 mb</b>	<b>Negativ.</b>	67,5 vs 40,0	7,3 vs N/A	<b>0,039</b>	<b>0,32 (0,09-1,01)</b>	<b>0,051</b>
MAPK Agp..	Triple +	73,3 vs 65,2	N/A	0,379	0,64 (0,23-1,75)	0,383

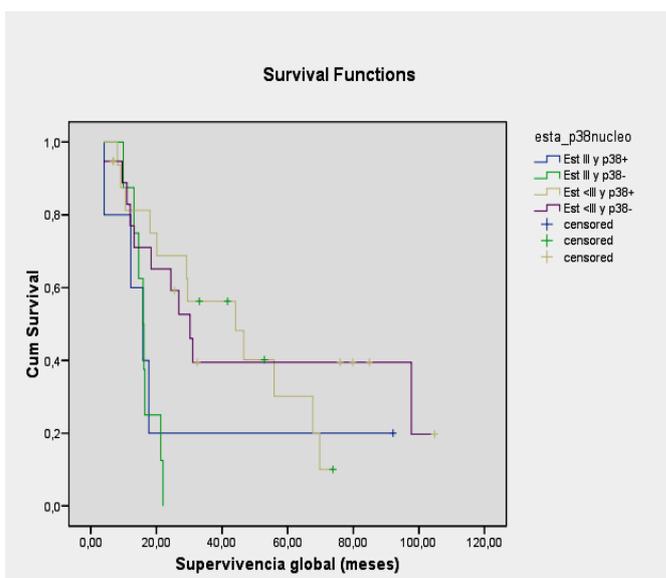
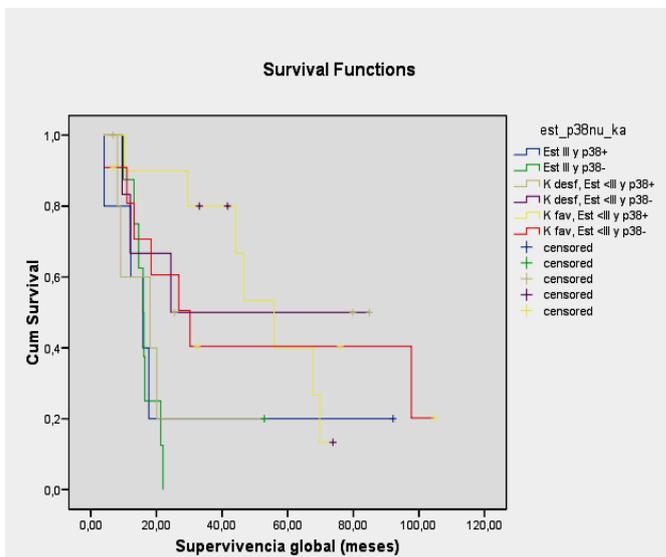
#### 4.5.4. Modelo multivariante en estadios III:

Se decidió realizar un análisis exploratorio de la regresión de Cox, incluyendo el tabaquismo, el estado general, el estadio clínico y el quirúrgico, la respuesta con infraestadificación, la histología y la tinción nuclear de p38 quirúrgica. Se encontró que las dos variables más relevantes fueron el estadio quirúrgico y el estado general, aunque dado el escaso número de pacientes no hubo resultados con significación estadística. Posteriormente se realizó un modelo combinando estas dos variables (estadio quirúrgico y estado general por índice Karnofsky) con p38 nuclear, en principio de forma aislada y luego cruzada asegurando siempre unir un número mínimo de pacientes en cada brazo.

El modelo fue aplicado en los 48 pacientes analizables para supervivencia global. Se agruparon de forma dicotómica, en estadio III (A y B) versus <III en el caso del estadio quirúrgico, p38+ ó - e índice de Karnofsky 90-100 (favorable) versus 60-80 (desfavorable). Inicialmente se combinaron las variables estadio quirúrgico y p38, analizando la supervivencia global en cuatro grupos obtenidos (con al menos cinco pacientes cada uno), resultando peor supervivencia en los 13 pacientes agrupados en estadio III, independiente de p38 (mediana de supervivencia de 15,9 meses), frente a los de estadio <III, en los cuales la mediana en los p38+ (16 pacientes) fue de 44,1 meses frente a 30,2 meses en p38- (19 pacientes) (p=0,023).

Continuando este modelo se crearon otros cuatro grupos al combinar estadio <III, p38 e índice Karnofsky. La supervivencia en estadios III continuó igual (15 meses) y el resto estadio <III, entre los pacientes con Karnofsky favorable, la supervivencia fue prácticamente el doble (55,9 vs 30,2 meses) (10 y 11 pacientes) en los p38+ (p=0,05).

Adicionalmente se analizaron el resto de factores clínicos para ver su influencia en el modelo y la distribución de los pacientes fue bastante homogénea, sin diferencias significativas. Se encontró un mayor número de pacientes con neumonectomía entre los de buen pronóstico que eran p38- frente a los p38+ (13 frente a 8, p=0,4), aunque la neumonectomía no mostró peor supervivencia que lobectomía. Realizando el análisis para SG a los 5 años, se obtuvieron resultados semejantes. Si el análisis se realizaba para SET, persistía la tendencia aunque se perdía la significación.



**Fig. 57 y 58. Supervivencia global en el modelo combinado. En la primera se aprecia la primera parte de la combinación, y en la segunda el modelo incluyendo el estado general.**

#### 4.5.5. Modelo multivariante en estadios I y II:

Para integrar todos los aspectos estudiados en esta cohorte de pacientes y de modo adicional al análisis estadístico realizado de forma univariante, se decidió realizar un análisis multivariante exploratorio y comprobar qué variables tenían más fuerza en el modelo global. Se realizó un modelo de Cox, analizándose en conjunto las variables clínico-patológicas y clínicas que habían obtenido significación estadística en el modelo univariante.

En el caso de la SG, se incluyeron: Grado (agrupado en bien diferenciado vs moderado o poco diferenciado), Estadio (I vs II) y realización o no de Neumonectomía, así como las tres MAPK agrupadas (Triple Positivo vs resto de casos), p53 y EGFR. En el caso de SLE se incluyeron únicamente el Grado, el Estadio y HER2.

##### 4.5.5.1. Modelo para Supervivencia Global:

En este caso, el modelo global encontró que las variables con mayor independencia eran el estadio quirúrgico, grado tumoral y la presencia o no de neumonectomía, aunque la única que mantuvo significación independiente fue el estadio. Dentro de las variables moleculares, ninguna mantuvo independencia significativa, con EGFR cercano a conservarla. (Ver Tabla 14).

**Tabla 14. Modelo de Cox multivariante para SG en los estadios I y II. Se han introducido las variables con significación estadística en el modelo univariante.**

Variable	p	Estado	HR	IC HR
<b>Estadio</b>	<b>0,001</b>	<b>I</b>	<b>0,48</b>	<b>0,31-0,73</b>
Grado	<b>0,057</b>	Bien diferenciado	0,41	0,17-1,02
Tipo Cirugía	<b>0,052</b>	No neumonectomía	0,60	0,36-1,00
EGFR mb.	<b>0,052</b>	Negativo	0,66	0,43-1,00
p53 >10%	0,147	Positivo	0,74	0,49-1,11
MAPK Agp.	0,114	Triple +	0,32	0,08-1,31

#### 4.5.5.2. Modelo para Supervivencia Libre de Enfermedad:

Como para SLE sólo había tres variables con significación en el modelo univariante, el análisis en este caso sólo se limitó a ellas tres, encontrándose que tanto el estadio como el grado conservaron su fuerte independencia en el modelo, perdiéndola la variable molecular HER2. (Ver Tabla 15).

**Tabla 15. Modelo de Cox multivariante para SLE en los estadios I y II. Se han introducido las variables con significación estadística en el modelo univariante.**

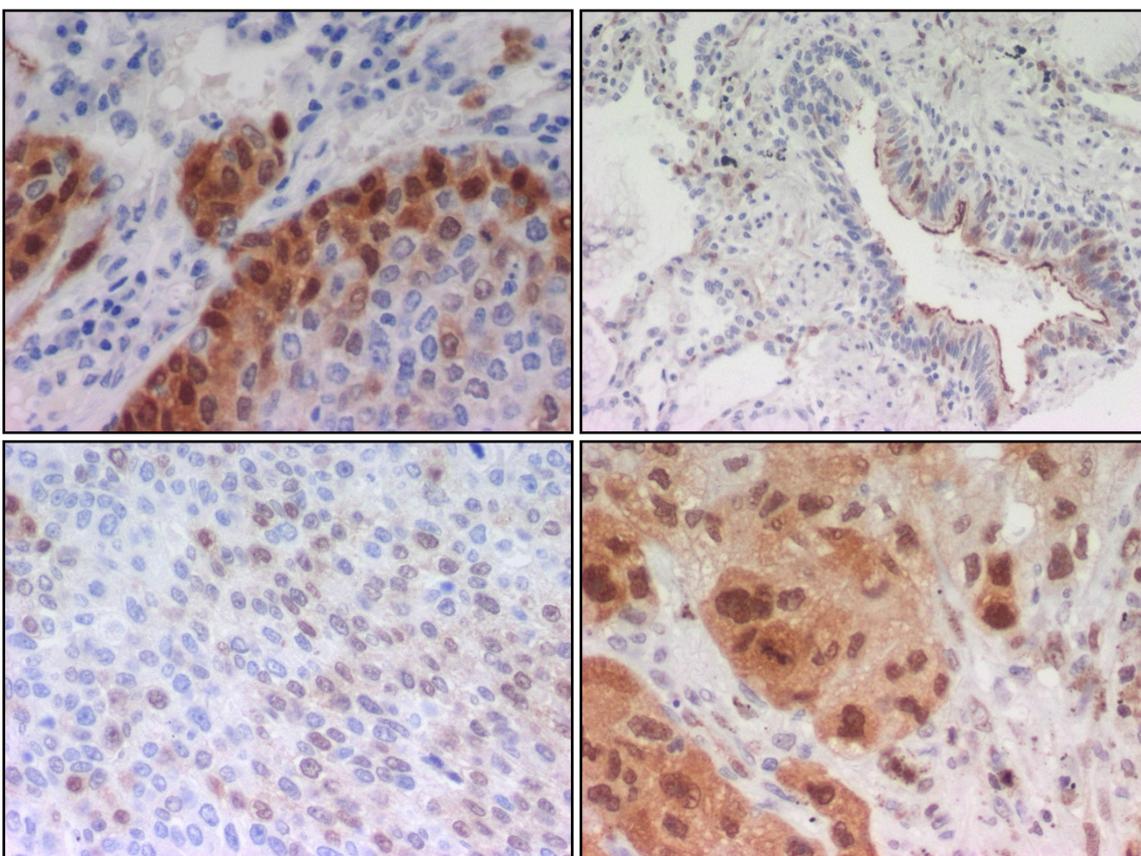
Variable	p	Estado	HR	IC HR
<b>Estadio</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>I</b>	<b>0,35</b>	<b>0,21-0,57</b>
<b>Grado</b>	<b>0,028</b>	<b>Bien diferenciado</b>	<b>0,11</b>	<b>0,02-0,79</b>
HER2	0,12	Negativo	0,40	0,13-1,28

## 4.6. Imágenes representativas de la IHQ:

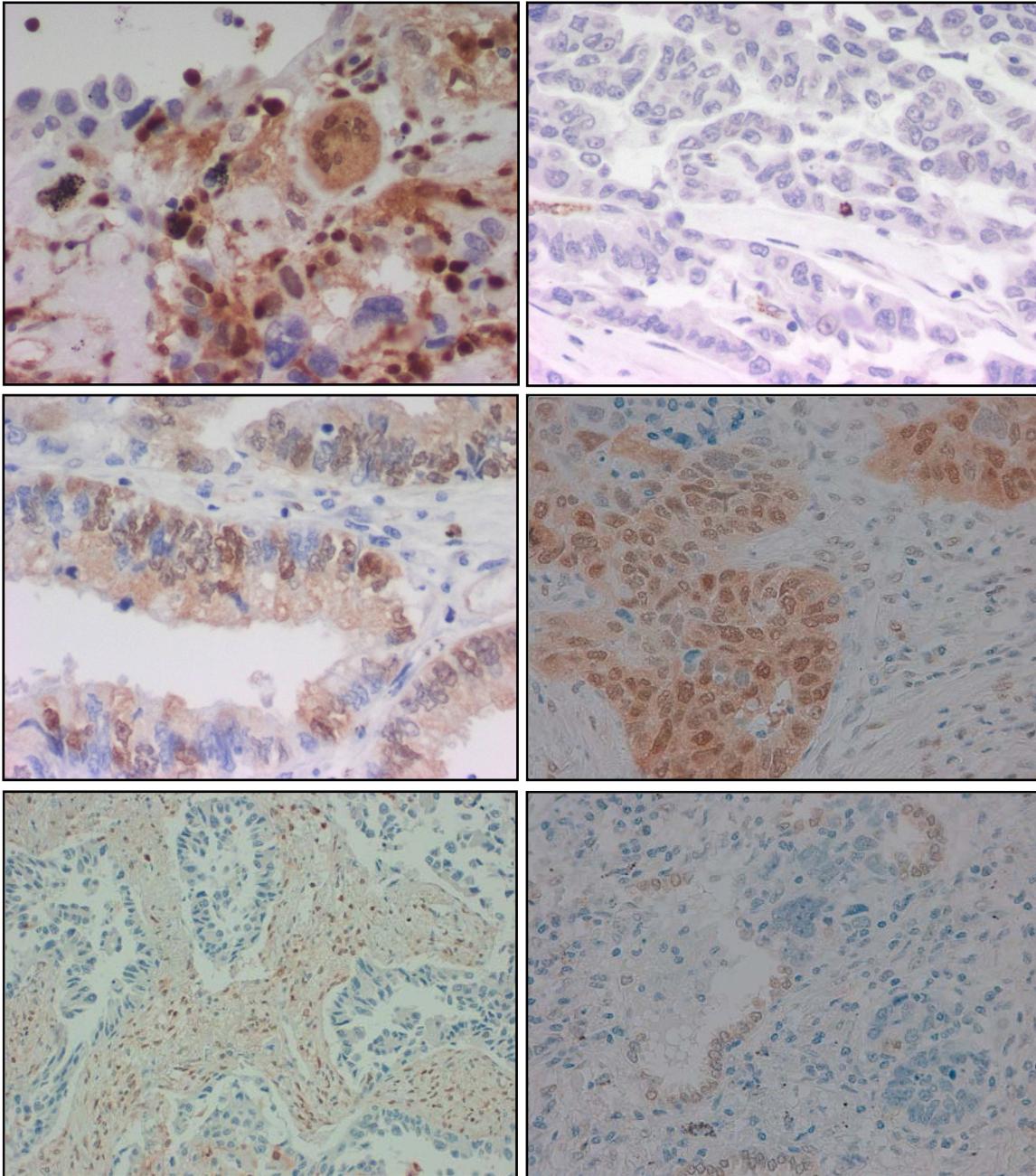
A continuación mostramos las imágenes resultantes de la tinción con cada uno de los anticuerpos utilizados.

### 4.6.1. Imágenes p38MAPK:

Cabe destacar que la inmunotinción con P-p38 $\alpha$  se mostró positiva frecuentemente en el frente tumoral, existiendo tinción ocasionalmente en el epitelio bronquial reactivo y/o en el estroma reactivo tumoral, con intensa positividad en macrófagos y globalmente asociada a inflamación. También presentó positividad en los vasos sanguíneos. A continuación mostramos alguno de los ejemplos más representativos, tanto de las muestras procedentes de la cohorte de pacientes con estadio localmente avanzado, como la de los estadios I y II, numerados de izquierda a derecha:



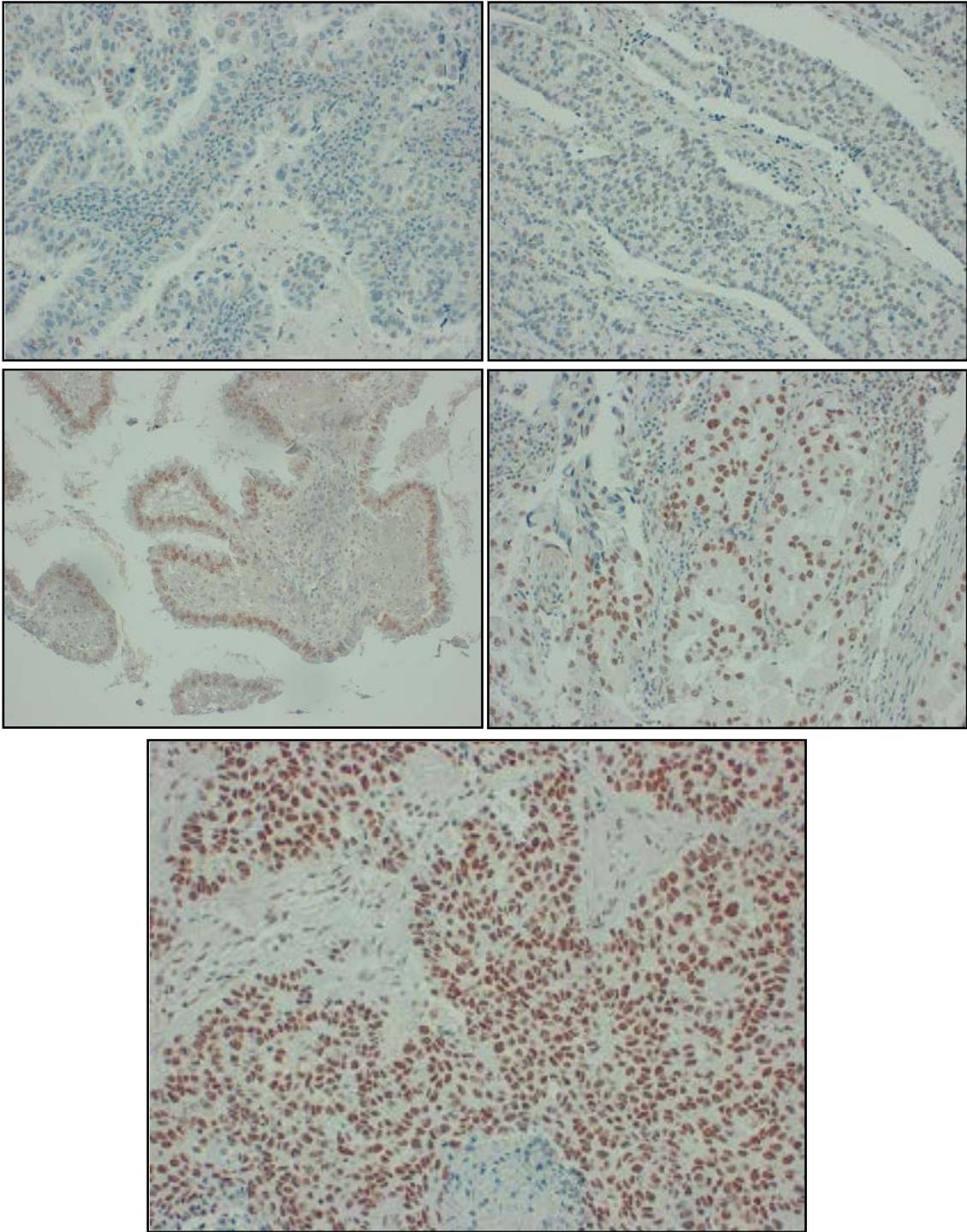
1. TMA22 i3 frente invasivo tumoral muy positivo (x40).
2. TMA22 i6 bronquio reactivo positivo (derecha de la imagen), y adenocarcinoma negativo (izquierda de la imagen) (x20).
3. TMA23 c6 positividad nuclear muy débil (1+) (x40).
4. TMA23 c7 núcleos 3+, citoplasma 2+ con mitosis muy positivas (x40).



5. TMA23 e9 macrófago intensamente positivo (x40).
6. TMA24 g7 mitosis y vasos positivos, con adenocarcinoma negativo (x40).
7. TMA24 c2 adenocarcinoma con fuerte componente glandular con núcleo 2+ y citoplasma prácticamente negativo. (x40).
8. 12TA07, b1 (biopsia01B892), tumor altamente positivo 100% N3C2 (x40).
9. 12TA04, c8 (biopsia 04B1636), 20x, componente en estroma +, tumor - (x20).
10. 12TA07, e7 (biopsia 01B2499), positivo en neumocitos tipo II reactivos. El tumor era negativo. (x40).

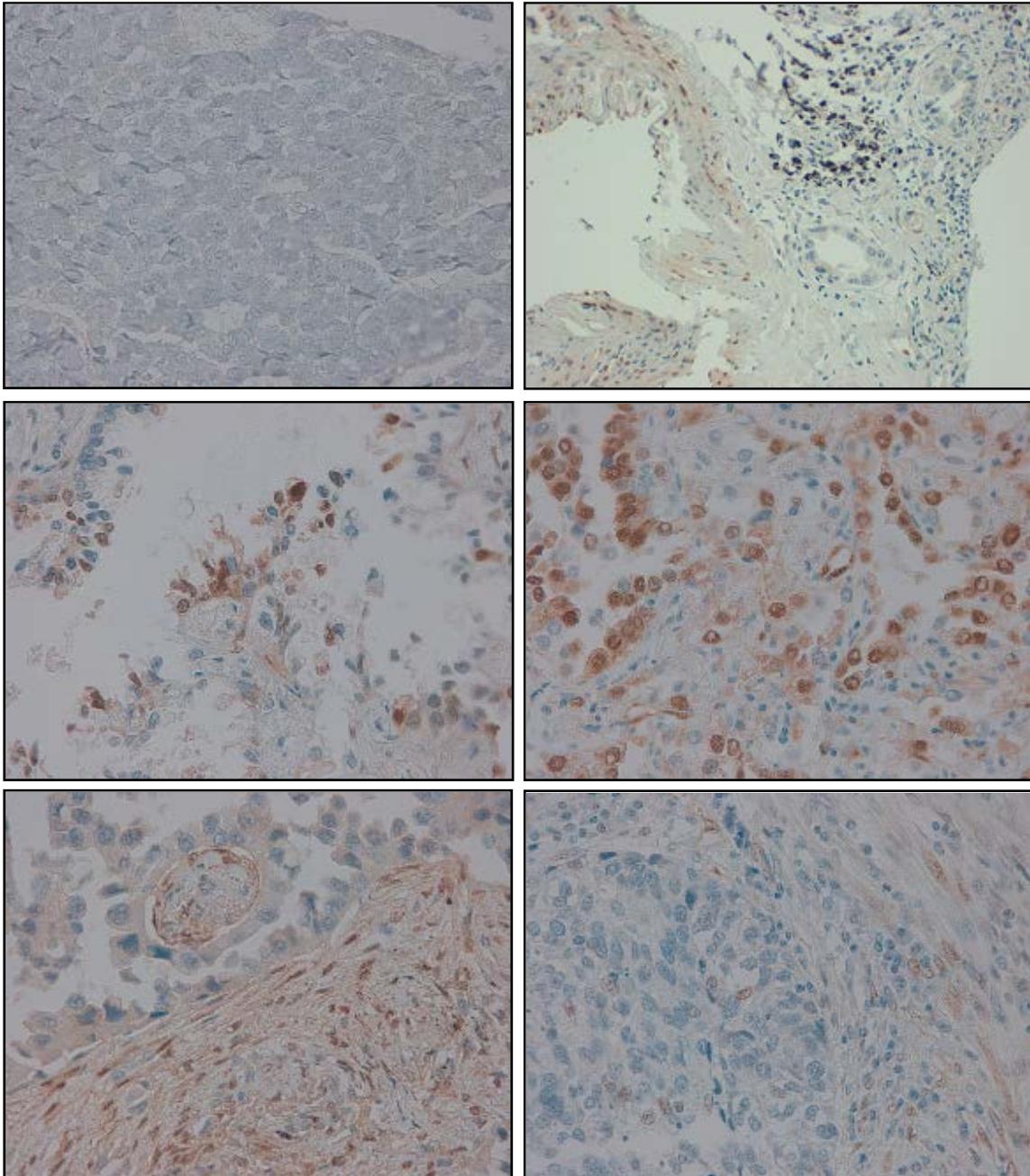
En este caso, las 7 primeras muestras pertenecen a pacientes con estadio localmente avanzado, el resto a pacientes de la cohorte con estadio inicial.

#### 4.6.2. Imágenes JNK:



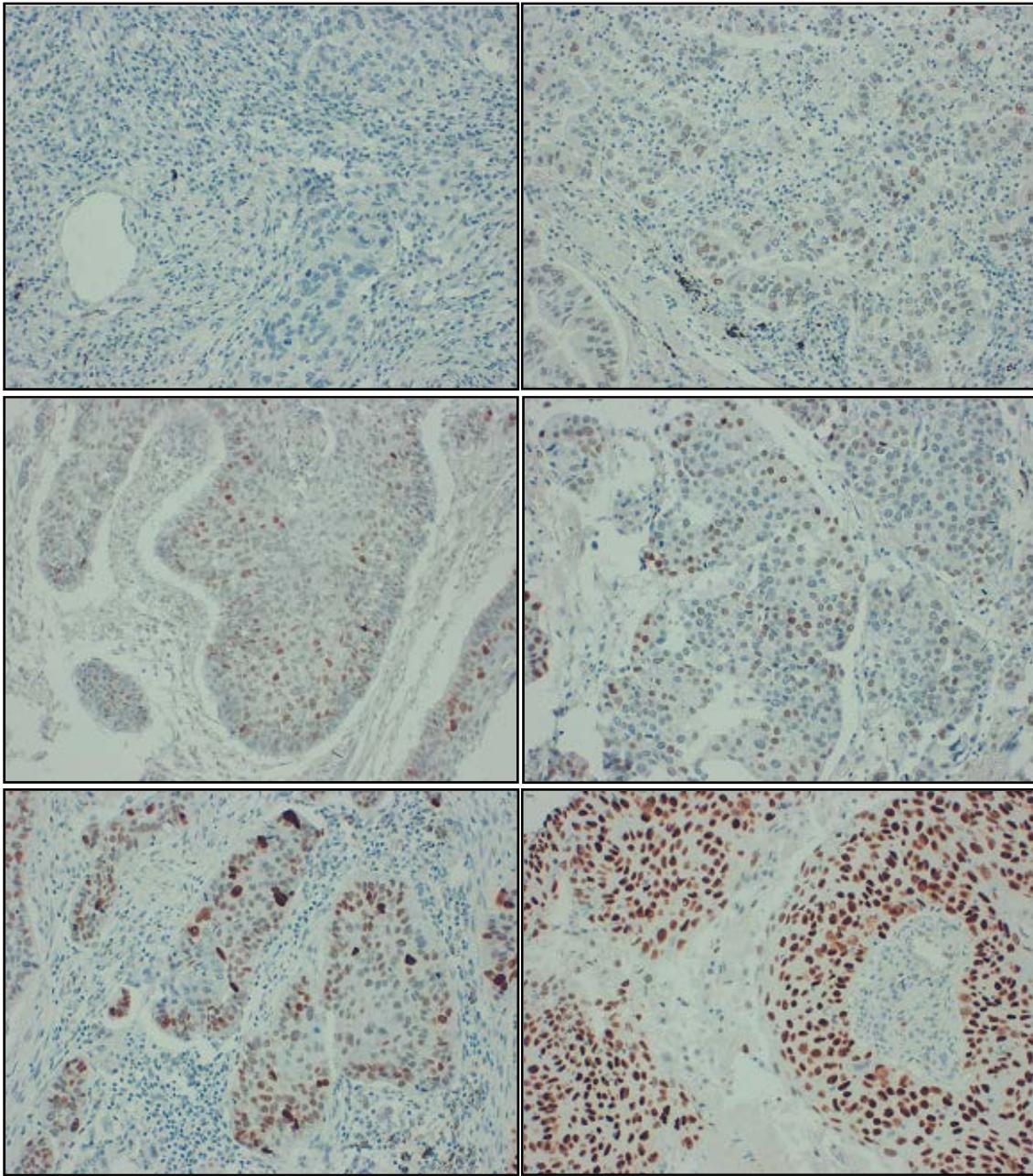
1. 12TA03, h1 (biopsia 03B2330), tumor negativo en núcleo y citoplasma (x20).
2. 12TA03, f1 (biopsia 03B1455), tinción suave y parcheada, 10% N1 (x20).
3. 12TA01, c9 (biopsia 99B3521), 100% N1 (x20).
4. 12TA04, c4 (biopsia 04B1453), 90-100% N2 (x20).
5. 12TA09, f7 (biopsia 04B3137), 100% N3 (x20).

## 4.6.3. Imágenes ERK 1/2:



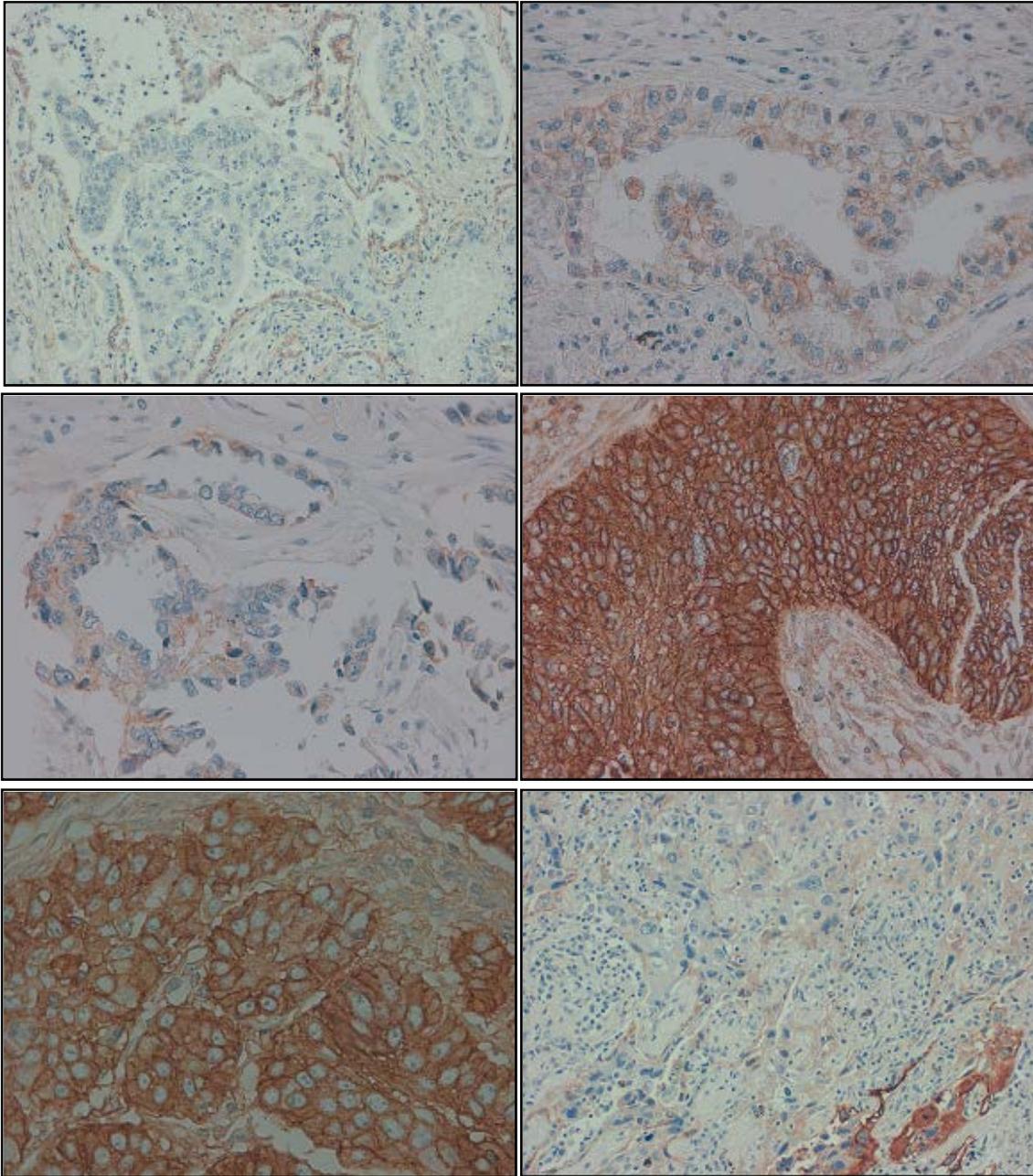
1. 12TA04, casilla c3, (biopsia 04B1387), totalmente negativa (40x).
2. 12TA01, d9, (biopsia 99B4515), el tumor (derecha) es negativo, pero se aprecia la positividad en la media de la arteria (izquierda), como control positivo (20x).
3. 12TA02, d4, (biopsia 01B3432), 50% N2, C1 (20x).
4. 12TA04, casilla b3, (biopsia 04B393), N3C1 70% (40x).
5. 12TA04, casilla c8, (biopsia 04B1636), estroma muy positivo, resto negativo (40x).
6. 12TA07, casilla g3, (biopsia 01B3095), N210%, con estroma positivo (40x).

#### 4.6.4. Imágenes p53:



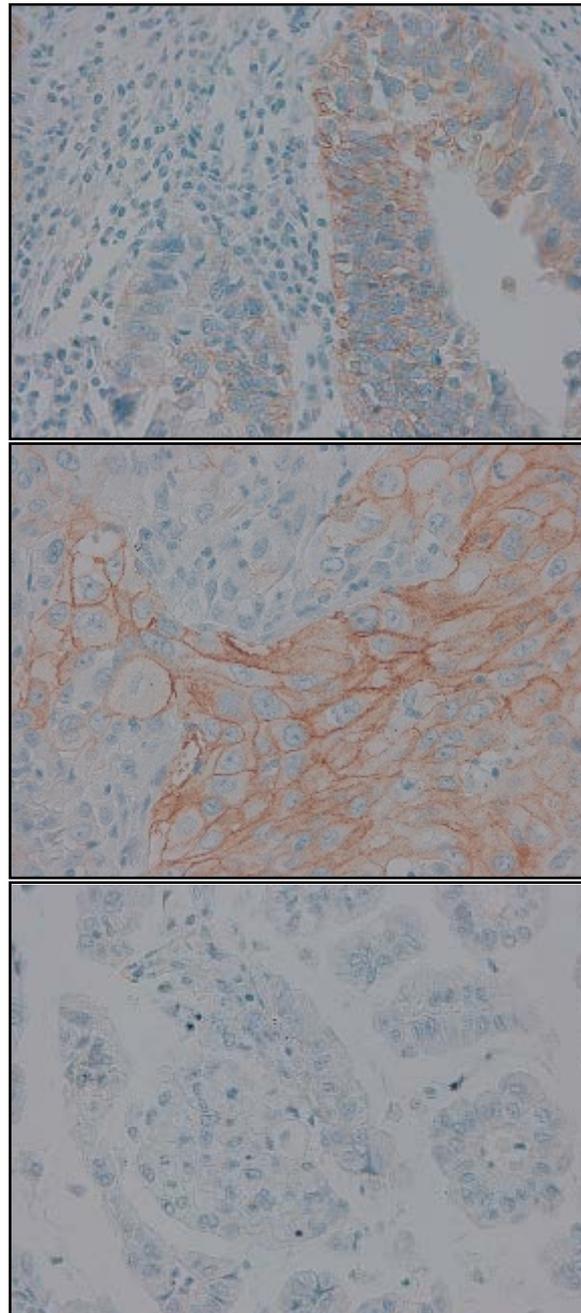
1. 12TA07, e9, (biopsia 01B2499), carcinoma escamoso, completamente negativo (20x).
2. 12TA03, b4, (biopsia 02B3409), adenocarcinoma con tinción muy débil (N1 en 5%), considerado globalmente como negativo (20x).
3. 12TA07, a8, (biopsia 01B307), carcinoma escamoso, tinción N2 en 30% células (20x).
4. 12TA03, h7, (biopsia 03B2572), adenocarcinoma, tinción N2 en 50% células (20x).
5. 12TA09, d5, (biopsia 04B812), carcinoma escamoso, tinción N2 en 80% células (20x).
6. 12TA 09, g5, (biopsia 04B3379), carcinoma escamoso, tinción N3 en 100% células (20x).

## 4.6.5. Imágenes EGFR:



1. 12TA02, a3 (biopsia 01B80), muestra negativa en tumor y positiva en la basal epitelial benigna (20x).
2. 12TA02, j1 (biopsia 02B2629), adenocarcinoma, tinción membrana 1+ en el 80% de las células (40x).
3. 12TA02, a5 (biopsia 01B0111), adenocarcinoma, tinción membrana 2+ en el 50% de las células (40x).
4. 12TA06, a1 (biopsia 99B5157), carcinoma escamoso, tinción membrana 3+ en 100% células (40x).
5. 12TA06, j5 (biopsia 01B428), carcinoma escamoso con núcleo y citoplasma muy positivos (40x).
6. 12TA07, f4 (biopsia 01B2875), se refleja la heterogeneidad intramuestral de este tumor, con áreas intensamente positivas, que coexisten con áreas prácticamente negativas (20x).

#### 4.6.6. Imágenes HER-2:



1. 12TA04, d7 (biopsia 04B2908), adenocarcinoma 1+ (40x).
2. 12TA07, h1, (biopsia 01B3233), carcinoma escamoso, 2+ (el único 2+ entre los positivos) (40x).
3. 12TA02, c7, (biopsia 01B2720), adenocarcinoma micropapilar, con tinción negativa (40x).

## 5. **Discusión**

---



El carcinoma pulmonar es la neoplasia que más fallecimientos causa en varones y su frecuencia aumenta en mujeres en los países desarrollados en las últimas décadas (1, 4). En su pronóstico participan aspectos clínicos fundamentales como el estadio tumoral y el estado general, a los que se puede añadir el sexo, sin haber sido confirmados el grado tumoral y la edad. La búsqueda de nuevos factores pronósticos se basa en encontrar diferencias en aspectos moleculares que permitan estratificar en nuevos grupos pronósticos a pacientes similares desde el punto de vista clínico. La mayoría de estos estudios se realizan en cohortes de casos con enfermedad resecable, que son aquellos con mejor material histológico para el análisis y los que obtendrían un mayor beneficio de una estratificación pronóstica adicional.

En esa línea, en este trabajo se decidió investigar una de las rutas implicadas en la tumorigénesis como es la vía de las MAPK, particularmente p38 y su subunidad más estudiada alpha, dado que *a priori* cumplía una serie de criterios que la hacían atractiva, como su implicación dual en el desarrollo tumoral, su papel en la terapia de tumores humanos al regular la respuesta a la quimioterapia basada en platino, así como su implicación en *dormancy*, su reconocido papel como factor de respuesta al estrés y su participación en la progresión tumoral y la metástasis (142, 170). Para dicho análisis de p38 y su vía de señalización se consideró la IHQ como el mejor método dado que su regulación post-traducciona (fosforilación) no encontraría diferencias en su expresión al realizar técnicas de ARN (RT-PCR o microarrays de expresión) o en su secuencia al realizar un análisis mutacional (108, 109, 111).

Inicialmente se intentó comprobar la posibilidad real de estudiar a p38 $\alpha$  en un entorno clínico y valorar su implicación pronóstica, utilizando una cohorte de pacientes intervenidos tras recibir quimioterapia previa por presentar un estadio localizado pero irresecable de entrada. Al comprobarse que dicho análisis era factible, esto motivó el estudio de una segunda cohorte más amplia y homogénea en pacientes con estadio también localizado, pero no precisando tratamiento previo, siendo la cirugía su único tratamiento, realizando un estudio más amplio de la vía de señalización. Se analizaron por separado los datos procedentes de ambas cohortes, puesto que el distinto estadio y la influencia de la quimioterapia sólo en una de ellas podrían modificar los niveles de la proteína e introducir un sesgo de selección, al ser sólo los pacientes con buena respuesta los sometidos a cirugía, como ocurre en la primera cohorte.

## Discusión

El análisis epidemiológico de ambas cohortes puso de manifiesto que los factores clínicos coincidieron con lo previamente descrito en la literatura para supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE), fundamentalmente en referencia al estadio patológico, con influencia tanto del tamaño tumoral como de la afectación ganglionar (20-21, 217). Esta diferencia fue mantenida tanto en la cohorte de estadios I y II, como en la de estadios III para el estadio patológico.

Sin embargo se observó que el estadio clínico (sólo utilizado en estadios III) ofrecía resultados contradictorios, existiendo en este trabajo una tendencia a mayor SG entre los pacientes con estadio clínico IIIB frente a los IIIA, algo que no es compatible con la literatura analizada (20-21). Esta inversión observada para la SG podría ser debida a un incorrecto método de estudio clínico con los métodos radiológicos convencionales (probablemente por infraestadificación mediastínica), siendo más preciso el estadio patológico por razones obvias obtenido por la cirugía, motivo por el cual se utilizó fundamentalmente este último a lo largo de este trabajo.

La menor edad, el buen estado general y la ausencia de neumonecrosis como procedimiento quirúrgico, fueron otros de los factores de buen pronóstico para los cuales en este trabajo los resultados coinciden con la literatura previa (22, 36, 217-218). El tabaquismo fue otro de los factores cuyo peor pronóstico coincidió con la literatura, aunque sólo se pudo demostrar en los estadios I y II (219). De modo similar, el sexo femenino mostró tendencia a comportar buen pronóstico, aunque sólo en la cohorte de estadios I y II, de nuevo coincidente con lo ya referido por otros autores (217, 219).

En cuanto a la histología, el presente trabajo no mostró diferencias pronósticas entre los adenocarcinomas y los carcinomas escamosos y el grado tumoral fue un factor decisivo en los estadios más iniciales, donde el peor grado de diferenciación (tumores poco o moderadamente diferenciados) conllevó peor pronóstico que el mejor (tumores bien diferenciados), algo coincidente con la literatura al respecto (217, 220).

Todo lo anteriormente expuesto sirve para destacar que esta serie, fundamentalmente la cohorte de pacientes estadio I y II, reproduce y confirma lo ya descrito en la literatura para las variables pronósticas clásicas y por tanto consideramos que no cuenta con sesgos que pudieran seleccionar o desviar los resultados observados en las variables moleculares.

Uno de los objetivos del trabajo fue analizar la expresión de p38 y el resto de proteínas y su relación con los aspectos clínico-patológicos. En este punto es necesario tener en cuenta la posible influencia de la heterogeneidad intratumoral introduciendo un error en el análisis de las muestras, algo inherente a cualquier estudio de biología molecular, del cual el presente trabajo no está exento.

En relación con la expresión de las MAPK en estadios I y II, se observó positividad de p38 en núcleo fundamentalmente y con menor frecuencia en citoplasma al igual que en trabajos previos (182, 187, 221). Para JNK sólo se apreció tinción nuclear, mientras que en ERK además hubo tinción citoplásmica y estromal, esto último no referido previamente (185, 187, 192). Esto sugiere que las funciones de las MAPK no se limitan a la regulación de procesos nucleares, algo que se ha apuntado en trabajos preclínicos y cuya trascendencia clínica es aún desconocida (131, 142, 150).

Comparando la expresión nuclear de las tres proteínas, la más expresada fue JNK (50%), seguida de p38 (25%) y por último ERK (15%), siendo esta última más frecuentemente positiva en el estroma peritumoral. Es difícil comparar la activación de estas proteínas con trabajos previos, no sólo por su escasez sino por la variabilidad en los criterios de positividad. Cuando se hace referencia a estas tres proteínas como positivas, será siempre la positividad nuclear salvo que se especifique lo contrario, puesto que para p38 y ERK hay asociación entre expresión citoplásmica y nuclear, con resultados de supervivencia similares.

En cuanto al resto de proteínas, se encontró más del 50% de casos positivos IHQ para EGFR, similar a lo referido en la literatura que varía entre el 40 y el 70% (96, 222-223), aunque existen distintos criterios de positividad, considerado en algunos trabajos positivo cuando está presente al menos en un 5% de las células y en otros se exige hasta un 50% (101), utilizando este trabajo el corte habitual del 10%. Algo similar ocurrió con p53, con un 50% de casos positivos por IHQ, variando en la literatura entre 45-60% (109-110). Para HER-2 el porcentaje de positividad real fue del 0,5% considerando estrictamente los casos 2 ó 3+ (1/202) (IC 95%: 0,32-0,67) lo cual está fuera de los límites marcados en la literatura, en la que se reporta 10-20% de positividades por IHQ, que no se debe confundir con la presencia de mutaciones, entorno al 2%. Un trabajo con mayor número de pacientes probablemente permitiría encontrar datos más aproximados a la literatura, aunque la trascendencia pronóstica está poco definida para esta técnica (113, 116). Es necesario tener en cuenta que en el análisis de supervivencia se utilizaron los 5 casos que tuvieron algún tipo de tinción IHQ, siendo 4 de ellos 1+.

## Discusión

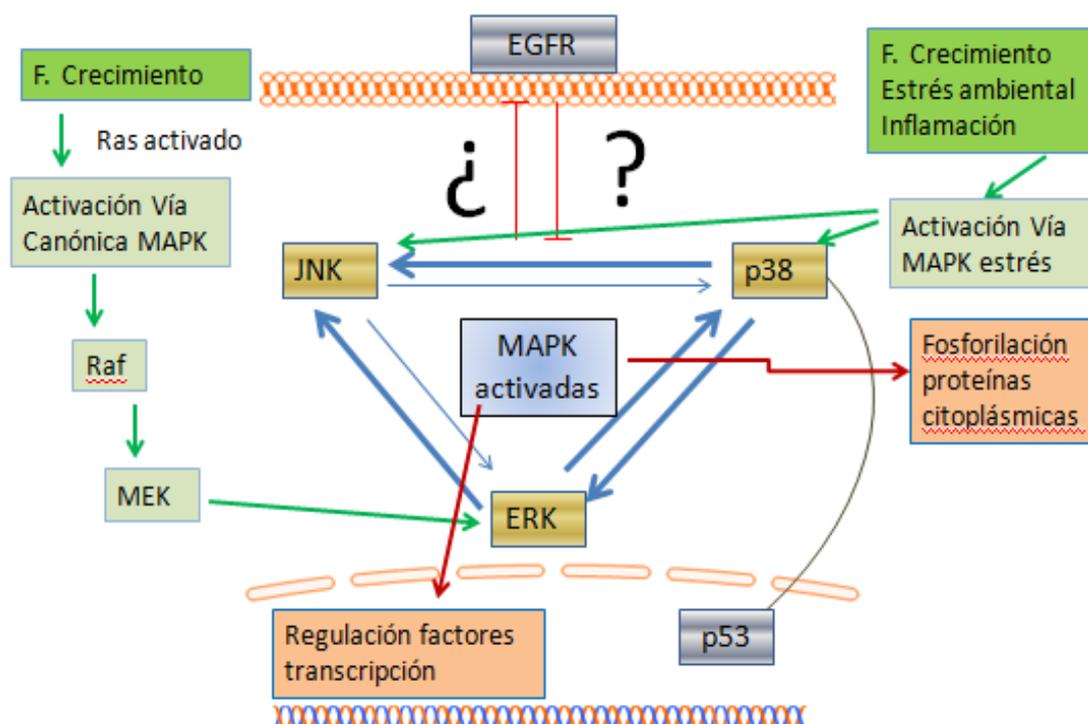
Otro de los objetivos fue analizar la asociación de las distintas proteínas de la vía de las MAPK entre sí, lo que ofreció la posibilidad de resaltar las dificultades para obtener conclusiones al analizar variables moleculares en un trabajo clínico transversal como es el caso, dado que el análisis de la vía se hace en un momento puntual del tiempo sin poder introducir modificadores de su actividad que permitan observar cambios en el comportamiento del resto de moléculas, a diferencia de trabajos de investigación básicos, pero que por otro lado nos da la fortaleza de contar con una mucho mayor muestra poblacional.

Básicamente se encontró que para las dos MAPK con expresión activada en núcleo y citoplasma, ERK y p38, en ambos casos existió asociación entre la expresión en los dos compartimentos celulares para cada una de ellas. No ocurrió lo mismo para la tinción estromal y tumoral de ERK, sin asociación entre la positividad en el estroma con la positividad nuclear ni citoplásmica, lo que pondría de manifiesto dos formas distintas de activar la vía dando de nuevo importancia al estroma tumoral en la regulación de los procesos celulares.

Por otro lado existió asociación de la positividad nuclear entre las tres MAPK, de modo que su expresión activada no ocurría de forma aislada y cuando una de ellas era negativa lo más probable es que las otras dos también lo fueran, algo descrito en la literatura previa (185, 187-188, 221). Sin embargo la influencia que ejercen unas sobre otras probablemente sea distinta, puesto que al analizar las tres proteínas a la vez, se observó que la positividad de p38 nuclear influía más en la positividad de JNK y ERK, ocurriendo lo mismo con ERK para JNK y p38, mientras que la positividad de JNK era diferente, no conllevando un aumento en la positividad de las otras. Estos hallazgos obtenidos para las tres MAPK sugieren que las vías p38 y JNK no son compartimentos estanco ni entre sí ni con respecto a ERK, pudiendo existir interrelación entre los mecanismos de activación y sus efectores, que por otro lado deben ser distintos dado que la activación de unas u otras se traducirían en distintos efectos celulares.

Existió asociación negativa entre la expresión de EGFR y las tres MAPK, que sólo fue significativa para JNK. Pese a que la vía canónica de activación de las MAPK comienza con la activación de los receptores de factores de crecimiento como EGFR, la positividad en las mismas no siempre traduce una activación efectiva, sino que podría ser el reflejo de un feedback regulador negativo de la función de EGFR que ha sido descrito tras la activación de las mismas, hecho probablemente observado en este trabajo con probable implicación pronóstica (131, 140, 224-225). Por otro lado, se

encontró una leve tendencia a asociación entre la positividad nuclear de p53 y p38, lo que podría indicar que la presencia de p53 “alterado” no se podría utilizar como marcador de la activación de p38, siendo necesario utilizar bien un marcador de proteína normal o bien otros efectores.



**Fig. 59.** Esquema que intenta integrar las interacciones entre la vía de MAPK observadas en este estudio con la literatura previa.

En relación con la vía de MAPK y su comportamiento con el resto de variables clínico-patológicas, en cuanto al estadio destaca haber encontrado distinto grado de expresión de p38 en ambas cohortes y además diferencia entre las muestras pre y post-quirúrgicas en los estadios III, con mayor positividad nuclear en estadios III pre-quimioterapia (65%) que post-quimioterapia (41%), en ambos superior a los estadios I y II (25%), estos últimos no presentando diferencias significativas entre ambos (I vs II). Las diferencias encontradas probablemente sean irreales y estén influidas por la heterogeneidad de la cohorte estadio III, el distinto significado del estadio clínico y quirúrgico así como la influencia del tratamiento citotóxico, aunque no hubo diferencias en p38 entre los pacientes con menor estadio tras la inducción con respecto a los que mantenían estadio III.

Teniendo en cuenta los datos de la cohorte de estadios I y II, aún sin obtener conclusiones válidas, un mayor estadio tiende a relacionarse con menor positividad en

## Discusión

p38, algo que no ha sido demostrado por la mayoría de trabajos de otros grupos, que incluso en un caso encuentran una relación inversa (182, 190, 194). El mayor número de pacientes de esta cohorte limitada a estadios I y II, sugiere que lo observado en dicho subgrupo de pacientes se ajusta más a la realidad que lo observado para los estadios III.

En referencia al resto de variables clínico-patológicas, en los pacientes estadio III que recibieron quimioterapia, la histología mostró diferencias existiendo mayor número de positivos para p38 postquirúrgica en núcleo y citoplasma entre los carcinomas escamosos, hecho no observado en las muestras previas al tratamiento ni en los pacientes que no recibieron quimioterapia (pacientes estadio I y II). Esto podría indicar que la histología escamosa es más sensible o susceptible de cambiar a una situación de positividad tras la inducción, aspecto no demostrable puesto que la mayoría de muestras quirúrgicas no tenían previas con las que poder verificar el cambio. La activación de p38 tras la quimioterapia es algo referido en la literatura, pero no la relación con histología, algo singular de este trabajo (113, 114). Del resto de proteínas, ERK (citoplásmica y nuclear), EGFR y p53 se asociaron significativamente con la histología escamosa, ya descrito en la literatura para EGFR (96, 223, 226) y también para p53 (109-110), aunque no referido para ERK.

En cuanto al tabaquismo, se observó cinco veces mayor frecuencia de positivos para p53 entre los fumadores, algo descrito previamente en la literatura para la positividad en IHQ y la presencia de mutaciones (9-10, 109-110). En relación con p38, se encontró mayor positividad nuclear y citoplásmica tras quimioterapia entre los fumadores en los pacientes estadio III, lo cual contradice estudios previos que sugieren que los no fumadores presentan más positividad de p38, pero en dichos estudios no se trataba de pacientes con quimioterapia y en este trabajo el subgrupo de pacientes sin quimioterapia no hubo diferencias de positividad en función del tabaquismo (109). La mayor positividad observada entre los fumadores en el primer caso podría constituir una muestra indirecta de la activación de p38 por quimioterapia. Siendo una proteína de estrés que participa en la regulación de la inflamación y respuesta a quimioterapia, el estado pro-inflamatorio del pulmón del fumador crearía el caldo de cultivo necesario para su activación y esta ocurriría con mayor dificultad en no fumadores, aunque su significado y trascendencia son inciertos (150, 170).

Para otros factores como estado general, edad, sexo y grado tumoral, se encontró que p38 nuclear fue más frecuente en sexo femenino y ERK en pacientes jóvenes, ambos hallazgos significativos. En relación con el grado tumoral existió una tendencia a

mayor positividad para p38 y JNK en tumores mejor diferenciados, algo no referido en la literatura, con un trabajo que incluso los asocia con mayor grado tumoral, mientras que EGFR tendió a asociarse con tumores de mayor grado, algo no tenido en cuenta en la literatura previa (187).

Esta tendencia a asociación con estadio así como en algún caso con la edad, el sexo y el grado tumoral sugiere la dependencia de las proteínas analizadas en este trabajo con respecto a variables clínicas, particularmente las MAPK, en concordancia con trabajos previos ya mencionados (182, 190). Este hecho podría interpretarse como algo en contra del uso de estos marcadores, pero sin embargo se debería pensar en ellos como elementos adicionales que ayudarían a estratificar a los factores clásicos.

Se investigó la relación de las características patológico-moleculares con el desarrollo de metástasis a lo largo del seguimiento de los pacientes, existiendo asociación entre histología adenocarcinoma y metástasis cerebrales, algo clásicamente descrito (227). Para p38 exclusivamente, se encontró intensa positividad nuclear en las metástasis cerebrales desarrolladas por pacientes de la cohorte de estadios III de inicio y tendencia al desarrollo de mayor número de metástasis óseas en el grupo de pacientes estadio I y II con positividad nuclear para p38. La confirmación en un futuro trabajo con más pacientes de estos hallazgos, establecería la importancia de p38 en el desarrollo de metástasis, algo descrito ya en la literatura bajo determinadas condiciones (94-96). También se observó asociación entre la positividad de ERK estromal y el desarrollo de metástasis óseas, algo que pondría de manifiesto la importancia del microambiente tumoral en el desarrollo de las mismas, pudiendo ser una muestra indirecta del fenómeno de cancerización de campo aunque en este caso la expresión es en estroma, no en célula epitelial y dicha expresión no se asocia en núcleo y estroma (228).

Para estudiar la posible activación de p38 en respuesta a quimioterapia basada en platino, se debería poder demostrar diferencia entre los niveles de positividad en muestras pre-quirúrgicas de forma pareada con sus correlativas post-quirúrgicas, debiendo ser mayor en estas últimas. Esto se estudió en doce pacientes y no pudo ser comprobado al no contar con el número suficiente de casos para obtener significación estadística. Sin embargo en esos doce pacientes con ambos tipos de muestra (pre y post-quimioterapia), hubo cambio en algo menos de la mitad de los casos, y pareció ser más frecuente la positivización que la negativización (3 de 4 negativos se positivizaron), lo cual podría ser una muestra indirecta de la activación de p38 tras el estrés del tratamiento, aunque menos de la mitad de los operados tras inducción fueron positivos.

## Discusión

De forma indirecta, se podría demostrar activación de p38 en respuesta a quimioterapia si se contara con muestras post-quirúrgicas de pacientes tratados y no tratados con inducción y se encontrara que en los primeros hubiera mayor porcentaje de positividad que en los segundos. En este trabajo la mayoría de pacientes analizables habían sido intervenidos quirúrgicamente, impidiendo tener controles adecuados con los que compararlos, por lo que no se pudo demostrar tampoco de este modo.

Quizás la activación de p38 por CDDP pueda ser demostrada en un contexto clínico y no sólo en condiciones de laboratorio, pero los resultados de este trabajo no permiten demostrar su activación ni predecir respuesta a dicho tratamiento y quizás estas mismas dificultades no han permitido que ningún grupo haya podido hacerlo en un contexto puramente clínico, al menos para nuestro conocimiento (170-171).

El valor predictivo de respuesta a quimioterapia para p38 se estudió analizando las respuestas clínicas y patológicas en función de los niveles de p38 en 18 muestras diagnósticas, sin poderse encontrar asociación entre la positividad de p38 y la respuesta a quimioterapia, con un número semejante de respuestas tanto en los positivos como en los negativos en núcleo y citoplasma. En las muestras quirúrgicas, con capacidad pronóstica pero no predictiva de respuesta al ser su análisis post-tratamiento, tampoco hubo asociación de la positividad de p38 con respuesta y/o infraestadificación, observándose una tasa de RC/RP del 90% tanto en positivos como negativos en núcleo y citoplasma y tampoco hubo diferencias al analizar T y N de forma aislada, salvo tendencia a mayor disminución en la T cuando p38 citoplásmica era positiva. El hecho de haber presentado un alto porcentaje de respuesta todos los pacientes, refleja de nuevo el sesgo en el método de selección de los casos, al proceder nuestra cohorte de casos intervenidos, siendo operados los respondedores/estables tras el tratamiento.

El objetivo principal de este trabajo fue el análisis pronóstico de supervivencia en relación con los marcadores moleculares con p38 como elemento central. Es destacable que en dicho análisis, en general el estudio de la SLE aportó resultados menos concluyentes con respecto a la SG, como también refieren estudios recientes sobre CPNM con estadio localizado en los que los factores clínico-patológicos influyen con mayor fuerza sobre SG que sobre SLE (217). Los motivos por los que esto ocurre en esta cohorte podrían estar relacionados con que en los pacientes con estadios localizados existe un menor número de recurrencias que hacen que se pierda potencia estadística al tener menos eventos que comparar. En muchos casos, aunque la

significación sólo se obtiene para la SG, las curvas son similares también para SLE, lo que permite considerar la SG como un adecuado indicador del valor pronóstico en nuestro trabajo y el mejor para estas variables moleculares.

En relación con EGFR, estudiada en estadios I y II, se encontró asociación significativa entre su expresión y peor SG (no SLE), coincidente con la mayoría de trabajos publicados con anterioridad (96, 222). En este trabajo la positividad nuclear de p38 pareció equilibrar el pronóstico en relación con los casos EGFR positivos, que no presentaron peor SG cuando p38 nuclear era positiva (Figura 55). En esa misma línea, la positividad estromal de ERK incluso llegó a mostrar tendencia a inversión de dicho papel pronóstico de EGFR. (Figura 56). El caso de p38 sugiere una función supresora tumoral, frenando la actividad proliferativa inducida por EGFR, lo que coincide con literatura previa aunque en algunos casos también se describe lo contrario (139, 160, 164). Estos dos aspectos, que indican la interacción de la vía de MAPK con la señalización por EGFR, no han sido descritos previamente.

La independencia de la expresión de EGFR con respecto a otros factores clínicos como estadio o edad refuerza su papel pronóstico independiente. Su expresión en pulmón y su relación con el pronóstico se han estudiado fundamentalmente en estadios avanzados y existe gran controversia sobre su utilidad, dado que son múltiples los trabajos con distinta metodología tanto en el tipo de análisis (IHQ, FISH, análisis mutacional), como en los criterios utilizados en su interpretación (46, 91-92, 95-96). Probablemente el análisis mutacional tenga un valor predictivo y la IHQ y el FISH un valor más bien pronóstico, por lo que los resultados del presente trabajo, basado en IHQ, reproducen el papel pronóstico de la expresión de EGFR en los tumores pulmonares resecaados.

Sobre HER-2 este trabajo permite obtener pocas conclusiones al haber observado pocos casos positivos como se ha comentado. Sin embargo los resultados han mostrado ser similares a lo referido en la literatura, al haber encontrado que su expresión comportaba peor SLE y tendencia a peor SG (113-114).

El análisis de p53, llevado a cabo en estadios I y II, lo relacionó con una mejor SG, aunque el sub-análisis por histología reveló que dicho hallazgo sólo fue significativo en los carcinomas escamosos (Figura 54). Esta mayor SG asociada a la positividad de p53 por IHQ va en contra de lo descrito previamente por otros autores, que lo consideran un factor de mal pronóstico en CPNM y otros tumores (104, 109-110), aunque en algunos trabajos los resultados son contradictorios (229-231).

## Discusión

Entre los motivos que podrían explicar esta discrepancia con la literatura hay que tener en cuenta la imperfecta correlación entre expresión por IHQ de p53 y su mutación, descrita por otros autores en torno al 50-60% (106), así como que muchos de los estudios sobre p53 se basan en pacientes que reciben quimioterapia y/o radioterapia adyuvante, como un trabajo en el que pacientes tratados con quimioterapia, la positividad para p53 tenía asociación significativa con peor pronóstico (232). Algo similar parece ocurrir en pacientes tratados con radioterapia adyuvante en tumores de cabeza y cuello (233). En nuestro trabajo los pacientes de la cohorte de estadios I y II no habían recibido quimioterapia complementaria y sólo siete radioterapia postquirúrgica, lo cual explicaría la diferencia pensando que con p53 dañado y acumulado en el núcleo los efectos celulares de la quimio y de la radioterapia se ven alterados, hecho que no ocurriría en estos pacientes.

Centrado ya el tema en el análisis de la supervivencia en relación con las MAPK, p38 pareció comportarse como un factor de buen pronóstico, aunque con diversos matices a tener en cuenta. Por un lado, analizando solamente las muestras sin quimioterapia, en los estadios III no se pudieron obtener grandes conclusiones al no existir diferencias importantes entre positivos y negativos tanto en núcleo como en citoplasma. En los pacientes estadio I y II, los positivos en núcleo o citoplasma presentaron tendencia a mejor SG y no diferencia en cuanto a SLE, superponiéndose las curvas en este último caso (Figuras 29 y 31). En los estadios III se observó que los p38 3+ nucleares presentaban una importante y significativa reducción tanto en SG como SLE, pero se trataba sólo de tres casos y tal hecho no se reprodujo en otros tres de la cohorte de estadios I y II, que presentaron similar evolución al resto de positivos, sin poderse confirmar por tanto dicha peor supervivencia en ese subgrupo, algo no descrito en la literatura con anterioridad.

Aunque tratándose de un análisis por subgrupos, se encontró que en los pacientes de la cohorte de estadios I y II, la positividad nuclear de p38 en los adenocarcinomas se relacionó de forma significativa con mejor pronóstico, algo no observado en los carcinomas escamosos ni para ninguna de las otras MAPK. Dicho hallazgo permitiría considerar a p38 como un factor importante en el pronóstico de la histología adenocarcinoma en pacientes libres de quimioterapia, sin existir en la literatura referencias a tal hecho, aunque la histología como factor diferenciador es un tema recurrente respecto a otras alteraciones moleculares o respuesta a tratamiento (53).

Analizando las muestras tras quimioterapia de la cohorte de pacientes estadio III, p38 positiva se mostró globalmente también como factor de mejor pronóstico, relacionándose los positivos en el núcleo con mejor SG, mientras que los negativos en citoplasma tenían tendencia a mejor pronóstico. Esta diferencia en el pronóstico en función de la localización subcelular, que no se observó en la cohorte de estadios I y II, reflejaría el papel del tratamiento en la localización de los distintos pool de p38 y su influencia en el pronóstico es un hecho sin confirmar clínicamente (140).

Al haber observado que en los pacientes estadio III tanto el estado general como la infra-estadificación patológica tras la inducción influían en el pronóstico con mayor significación que p38, se decidió averiguar el papel diferenciador de dicha proteína teniendo en cuenta ambas variables construyendo un modelo de combinación por subgrupos. La SG fue independiente de p38 en los pacientes que permanecían estadio patológico III tras la inducción, pero en los que presentaban respuesta (estadio patológico inferior a III), p38 positiva supondría aún mejor pronóstico de forma significativa. Si además se subdividía a los pacientes con buena respuesta entre aquellos con buen o mal estado general, se volvía a comprobar que entre los que tenían buen Karnofsky con estadio favorable, la SG era casi el doble si p38 era positiva.

Según todo lo anterior, analizando en conjunto el papel de p38 en el pronóstico, se pueden establecer varias interpretaciones: en pacientes libres de quimioterapia los positivos en núcleo tienden a presentar mejor pronóstico que los negativos, con la posibilidad de que en los estadios III exclusivamente, la tinción nuclear fuerte (3+) confiera peor pronóstico. En pacientes que recibieron quimioterapia, los p38 positivos en núcleo en la pieza tras quimioterapia tendieron a presentar mejor pronóstico, sobre todo si habían obtenido buena respuesta y presentaban buen estado general. Existe incertidumbre con respecto al significado de la expresión citoplásmica, pues parece que en los pacientes estadio III que han recibido tratamiento citotóxico previo, su positividad podría conferir un pronóstico adverso, algo que debería estudiarse en un mayor número de pacientes.

Al comparar los hallazgos del trabajo presente con p38 y lo descrito en la literatura, esta ofrece versiones contradictorias respecto al papel de p38 como marcador pronóstico, en unos casos descrito como favorable y otros como lo contrario (181, 185, 187-188, 192, 194, 221). Aunque la mayoría de aspectos analizados no han mostrado resultados significativos, este trabajo pone de manifiesto que dichas contradicciones expresarían el distinto efecto de p38 en función de las circunstancias proliferativas o el

## Discusión

grado de estrés al que esté sometida la célula tumoral, en consonancia con trabajos que lo describen como supresor tumoral, contradichos por otros que demostraron múltiples funciones oncogénicas, incluso en un contexto clínico (131, 139, 142, 187).

Con respecto a las otras dos MAPK (JNK y ERK) los resultados de supervivencia no fueron significativos de forma individual en cualquier localización subcelular. Sin embargo, al igual que para p38, existió tendencia a ser mejor en los positivos, en el núcleo para JNK y en núcleo, citoplasma y estroma para ERK. Existieron cuatro casos con fuerte positividad (3+) para JNK y en los cuatro hubo censura tardía para SG y SLE, lo que podría expresar una relación de dicha expresión intensa con mejor supervivencia en ese subgrupo de pacientes. ERK positiva, sobre todo nuclear y citoplásmica, presentó mejor pronóstico de forma cercana a la significación por lo que se decidió ver qué sucedía cuando todas sus localizaciones eran negativas o positivas, encontrándose que la negatividad absoluta para ERK se relacionaba una mayor tendencia a peor pronóstico, pero de nuevo sin significación.

Los datos vuelven a ser contradictorios al relacionar los resultados del estudio presente en relación con JNK y ERK y lo descrito en la literatura. Para JNK en general otros autores relacionan su positividad con un valor pronóstico adverso, salvo un caso en que ocurre lo contrario (185, 187, 191). Algo similar ocurre con ERK (185, 188, 192, 196). En base a ello nuestro trabajo pone de manifiesto que en una población exclusiva de pacientes estadios I y II la positividad nuclear en la vía MAPK podría constituir un pronóstico favorable.

Al analizar un grupo de ocho pacientes que fallecieron postoperatoriamente, se encontró que siete de ellos fueron negativos para JNK, lo que podría sugerir que la activación de JNK por el sujeto y en menor medida las otras dos MAPK, serían necesarias para superar una situación de estrés celular como puede ser la recuperación quirúrgica, proceso dificultado en los casos que dicha vía no pueda ser activada. Sin embargo a este hallazgo hay que concederle una trascendencia relativa, pues pese a que dicha asociación fue significativa estadísticamente, existieron muchos más pacientes JNK y MAPK negativos que no fallecieron en el postoperatorio que aquellos que sí lo hicieron y probablemente esta relación tenga que ver con aspectos clínicos más fácilmente identificables que estas proteínas, hecho no comprobado en este trabajo.

Al haber observado para las tres MAPK tendencia a mejor SG cuando su expresión nuclear era positiva, incluso significativa con p38 en los adenocarcinomas, se estudió lo que ocurría cuando las tres eran positivas frente al resto de casos,

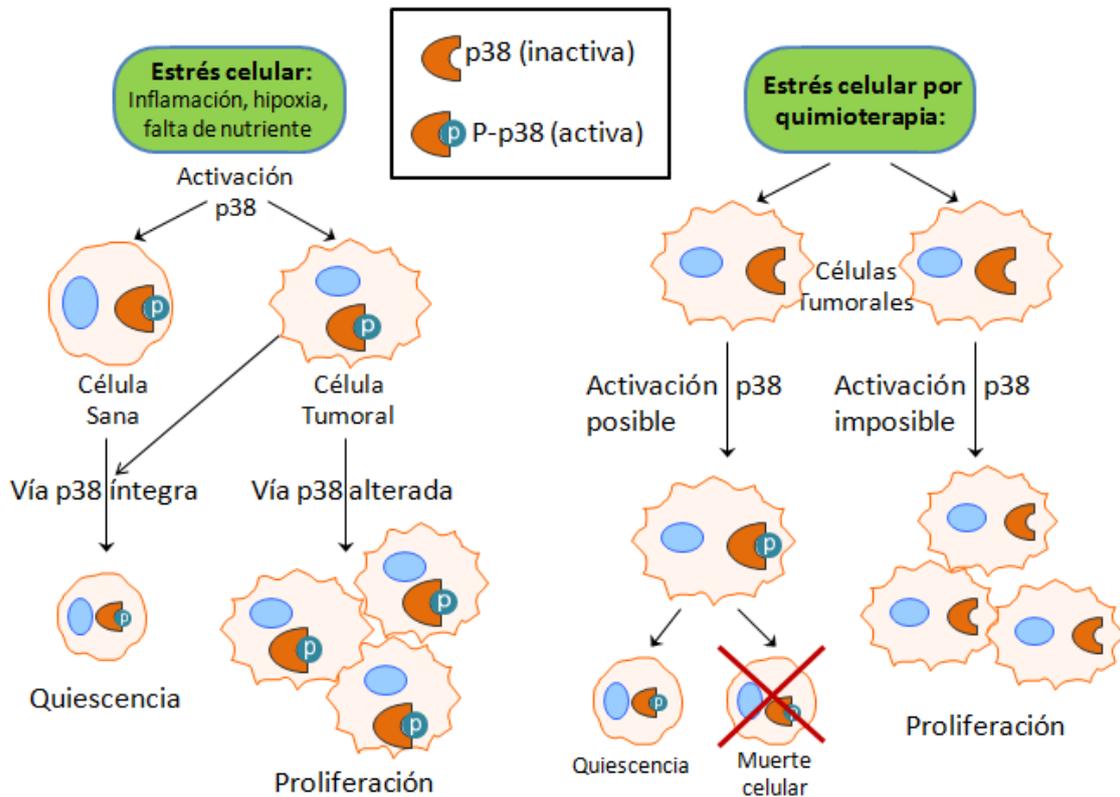
encontrándose que los casos con las tres MAPK activadas a la vez (MAPK Triple Positivos, MTP), presentaban mejores datos de supervivencia que el resto de casos ya fueran doble positivos, simple positivos o triple negativos (TN), de forma significativa para SG y con tendencia en cuanto a SLE. Esta característica pronóstica no ha sido descrita previamente en la literatura y por tanto es un hallazgo singular del presente trabajo.

El último de los objetivos del trabajo presente ha sido llevar a cabo un análisis multivariante, el cual se realizó exclusivamente en la cohorte de pacientes estadio I y II, encontrándose que para la SG la única variable que mantuvo la significación fue el estadio patológico de la enfermedad ( $p=0,001$ ). El grado ( $p=0,57$ ), la neumonectomía ( $p=0,52$ ) y la expresión de EGFR ( $p=0,52$ ) demostraron una tendencia a ser variables independientes, perdiendo p53 ( $p=0,147$ ) y las MAPK agrupadas ( $p=0,114$ ) la significación. Para la SLE permanecieron como independientes el estadio ( $p<0,001$ ) y el grado ( $p=0,028$ ), mientras que HER-2 ( $p=0,12$ ), no se mantuvo en el modelo.

Pensando en el papel pronóstico de la vía de las MAPK, una reflexión que se puede extraer de este trabajo es que su papel individual o conjunto como factores de buen pronóstico no nos permite cuestionar sus funciones oncogénicas ni descartar las supresoras tumorales, pudiendo expresar unas u otras en función otros aspectos clínicos o moleculares, como ocurre con el gen supresor p53 o el oncogén FGFR3 (110, 234).

Con respecto a p38, tras el análisis de nuestros resultados y su comparación con lo descrito en la literatura, podríamos establecer la siguiente hipótesis con respecto a su función y papel en cáncer de pulmón. En una célula sana, p38 activada ante cualquier estrés funcionaría como supresor tumoral, activando mecanismos reguladores que dirigen a la célula a una situación de quiescencia o de inhibición celular. En una célula tumoral, p38 se seguiría activando ante las mismas señales de estrés, pero el ulterior destino celular podría variar en función de la integridad de la vía de señalización. En esa célula tumoral, cuando la vía de señalización de p38 permanezca estable (que podría ser el caso del adenocarcinoma y/o no fumadores) p38 seguiría ejerciendo dichas funciones anti-proliferativas al igual que las células sanas y cuando la vía esté alterada (quizás en el caso de los carcinomas escamosos en fumadores) se activarían rutas alternativas de proliferación celular en vez de inhibición, de ahí que p38 con expresión 3+ nuclear en estadios III pueda constituir un factor de mal pronóstico, hecho contradictorio en estadios I y II.

Por último, aún a pesar de tratarse de células tumorales y presentar una alteración global en la señalización celular, probablemente el estrés celular inducido por la quimioterapia sea capaz en algunos casos (los que son capaces de activar p38) de restaurar las vías activadas por p38 hacia la inhibición de la proliferación o muerte celular, bien por el propio funcionamiento de una vía p38MAPK “sana” o bien por los distintos efectos sobre la muerte celular que aporta la quimioterapia participados por p38. Dichos efectos serían no sólo locales (probablemente por ello no se observó mayor número de respuestas en los p38 positivos), sino a distancia haciendo desaparecer las micrometástasis responsables de la recaída futura. Los tumores p38 negativos en núcleo tras la quimioterapia presentarían tal grado de aberración en la señalización celular que ni la quimioterapia sería capaz de revertir.



**Fig. 60. Hipótesis sobre la función de p38 en función del tipo celular, integridad de su vía de señalización o la capacidad de ser activada.**

Lo observado en este trabajo demuestra que las variables clínicas siguen manteniendo una importancia fundamental en el pronóstico de los pacientes y no deben perder aún su protagonismo en relación con los hallazgos que relacionan como variables pronósticas a características biológicas del tumor. En una época en que la secuenciación

y los análisis genómicos están adquiriendo una importancia cada vez mayor, estudios como el presente siguen siendo imprescindibles para conectar y relacionar la dependencia o independencia entre ambos tipos de factores con relevancia pronóstica.

El tratamiento oncológico se dirige en la actualidad con mayor frecuencia contra alteraciones específicas. Las observaciones de este trabajo permiten establecer que la vía de p38MAPK, que puede estar activada en CPNM, podría ser valorada como diana terapéutica por medio de inhibidores específicos de p38, como de hecho ya se ha comunicado recientemente (198). Sin embargo creemos que un aspecto fundamental es desarrollar criterios que permitan seleccionar molecularmente a los pacientes que se vayan a beneficiar de los mismos, con la utilidad que en este caso proporcionaría la IHQ.

La muestra de pacientes analizada en este trabajo, con sus limitaciones en cuanto a tamaño y su análisis de forma no prospectiva, tiene la fortaleza de haber confirmado unas características epidemiológicas y resultados terapéuticos similares a lo descrito en la literatura y por tanto refuerza los hallazgos obtenidos con las variables biológicas estudiadas. La relativa dependencia de las variables biológicas con respecto a las clínicas no significa que la vía p38MAPK no deba seguir explorándose y más porque podría jugar un papel en otros aspectos como la inflamación, el microambiente tumoral, la distinta localización subcelular de la proteína, así como su influencia sobre otros factores de crecimiento más asentados como EGFR.

Por último, este trabajo pone de manifiesto la necesidad de utilizar criterios REMARK al realizar un proyecto de investigación (235). También se debe destacar la experiencia adquirida en el desarrollo del mismo, las dificultades que entraña realizar un estudio con interés translacional en un ámbito hospitalario, con gran heterogeneidad en el manejo de los pacientes, la recogida y procesamiento de las muestras, con numerosas pérdidas de seguimiento, pero a su vez lo interesante y enriquecedor que resulta en cuanto a formación clínica el análisis de un gran número de pacientes, así como básica al diseñar y desarrollar el proyecto.



## **6. Conclusiones**

---



1. Esta serie reproduce los datos epidemiológicos y terapéuticos en CPNM estadio localizado, siendo el estadio quirúrgico el mejor predictor de supervivencia.
2. El estudio de la vía de MAPK por medio de IHQ es factible en CPNM.
3. En el análisis de supervivencia las mejores diferencias se obtuvieron al estudiar SG, con la tinción nuclear como mejor indicador de positividad para las MAPK, no siendo concluyente el estudio de citoplasma o estroma en p38 y ERK.
4. En estadios III la positividad nuclear de p38 no tuvo valor predictivo de respuesta al tratamiento previo a cirugía con una combinación de platino, pero podría tener valor pronóstico para SG en pacientes con buen estado general y respuesta patológica a dicha quimioterapia.
5. En estadios I-II, la positividad nuclear individual de las MAPK tendió a conllevar mejor pronóstico, significativo para p38 en la histología adenocarcinoma.
6. Existió una relación con mejoría en la SG cuando las tres MAPK eran positivas en núcleo simultáneamente, observándose también tendencia a una mejor SLE.
7. La expresión positiva por IHQ de EGFR se confirma como factor de mal pronóstico en CPNM, salvo en los casos en que p38 es positivo en núcleo.
8. La positividad en IHQ de p53 se comportó en el presente trabajo como un factor de buen pronóstico.
9. En el análisis multi-variante, el estadio clínico fue el único factor independiente para SG. Para SLE, lo fueron el estadio clínico y el grado tumoral.
10. p38 y su vía de señalización guardan una potencial aplicabilidad pronóstica en CPNM estadio localizado, siendo necesario confirmar su utilidad en un estudio prospectivo con un mayor número de pacientes.



## **7. Acrónimos**

---



Se describen algunos de los acrónimos más repetidos y que podrían tener importancia a lo largo de la lectura del texto, sin incluir todos los nombres de los genes o factores proteicos descritos y sin repetir o traducir los explicados a lo largo del texto.

- 3'-UTR: untranslated regions (regiones no traducidas del extremo 3' del ARN)
- AJCC: American joint committee on cancer
- Akt: familia de genes humanos homóloga al gen viral Akt
- ALK: anaplastic lymphoma kinase (kinasa del linfoma anaplásico)
- AP-1: activator protein 1 (proteína activadora 1)
- ARE: AU-rich element (regiones ricas en adenina y uracilo en el ARN)
- ATF2: Activating transcription factor 2 (Factor activador de transcripción)
- Bcl-2: B-cell lymphoma (linfoma de células B)
- BPDE: benzopireno dihidrodiol epóxido
- CDC25A-B: cell division cycle 25 homolog A-B (familia de fosfatasas CDC25)
- CDK: cyclin dependent kinases (quinasas dependientes de ciclinas)
- CHRNA3-5: cholinergic receptor, nicotinic, alpha 3-5 (receptor colinérgico nicotínico)
- c-KIT: cytokine receptor (receptor de citocinas, también llamado KIT)
- COL1A1: colágeno tipo 1 alfa 1
- COX-2: ciclo-oxigenasa 2
- CYP1A1: citocromo P450, familia 1, subfamilia A, polipéptido 1
- E-Cadherina: epithelial-calcium dependent adhesion molecule (molécula de adhesión dependiente de calcio, subtipo epitelial)
- EML4: echinoderm microtubule -associated protein like 4
- EGFR: epidermal growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
- EORTC: european organisation for research and treatment of cancer
- Gadd45: growth arrest and DNA damage induced 45 (gen de parada de crecimiento inducido por daño)
- ESTS: european society of thoracic surgeons
- GGT: gamma-glutamyl transferasa
- GSTM1: glutathione S-transferasa mu 1
- FGFR1 y FGFR3: fibroblast growth factor receptor 1 y 3
- HER2: human epidermal growth factor receptor 2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano)
- HIF1( $\alpha$ ): hipoxia induced factor (factor inducido por hipoxia)

## Acrónimos

HPTH: hiperparatiroidismo por secreción de hormona paratiroidea

KHL: keyhole limpet hemocyanin (transportador en la conjugación de péptidos para la producción de anticuerpos)

KRAS: Kirsten rat sarcoma gene

KIF5B: kinesin 1 heavy chain 5 (cadena pesada 5 de la kinesina 1)

MEK: map-erk kinase (kinasa activada por mitogenos por medio de erk)

miRNA: microRNA

MEF2C: myocyte-specific enhancer factor 2 C (factor estimulador específico miocítico)

MTK1, MLK2, MLK3, DLK, TAK1, MAP3K7IP/TAB1, MAPKAP-K2/MK2: grupo de MAPKK en relación con p38MAPK

mTOR: mammalian target of rapamicine (diana en mamíferos de la rapamicina)

NF- $\kappa$ B: nuclear factor kappa B (factor nuclear kappa B)

OMS: Organización mundial de la salud

PDGFRA: platelet derived growth factor A (factor de crecimiento plaquetario)

PET: Positron emission tomography (Tomografía por emisión de positrones)

PIK3CA: phospho inositol kinase 3, Catalitic subunit (subunidad catalítica de la fosfoinositol 3 kinasa)

RB1: Gen retinoblastoma 1

RET: rearranged during transfection (reordenado durante la transfección)

ROS1: c-ros oncogene 1, receptor tirosina quinasa

RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa asociada a transcripción reversa del ARN)

SIADH: Síndrome de secreción inadecuada de ADH (Hormona antidiurética)

SNP: single nucleotide polimorfisms (polimorfismos de un solo nucleótido)

TC: Tomografía computerizada

TCR: T cell receptor (receptor de la célula T)

TGF $\beta$ : transforming growth factor B (Factor de crecimiento transformante beta)

TNF: tumoral necrosis factor

uPAR: urokinase receptor (receptor de urokinasa)

UICC: union for international cancer control

VEGF ó VEGFR: vascular endothelial growth factor (receptor), (receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular)

VPN y VPP: Valor predictivo negativo y positivo

## **8. Anexo**

---



## 8.1. Escalas de evaluación del estado general

### Índice Karnofsky:

100%	Normal
90%	Actividad normal. Signos mínimos de evidencia de enfermedad
80%	Actividad normal con esfuerzo. Algunos signos de enfermedad
70%	Se cuida por sí mismo. No puede realizar actividad normal o trabajo
60%	Requiere asistencia ocasional. Capaz de cuidar de sus necesidades
50%	Precisa considerable asistencia y frecuente asistencia médica
40%	Incapacidad importante. Precisa cuidados especiales
30%	Incapacidad severa. Se precisa hospitalización
20%	Gravemente enfermo
10%	Moribundo, enfermedad en progresión
0%	Fallecido

### ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group):

0 El paciente se encuentra totalmente asintomático y es capaz de realizar un trabajo y actividades normales de la vida diaria

1 El paciente presenta síntomas que no le impiden realizar su trabajo, ni las actividades de la vida diaria. El paciente sólo permanece en la cama durante las horas de sueño nocturno

2 El paciente no es capaz de desempeñar su trabajo, se encuentra con síntomas que le obligan a permanecer en la cama durante varias horas al día, además de las de la noche, pero que no superan el 50% del día. El individuo satisface la mayoría de sus necesidades pero precisa de ayuda para alguna actividad que antes realizaba como por ejemplo la limpieza de la casa

3 El paciente necesita estar encamado más de la mitad del día por la presencia de síntomas. Necesita ayuda para la mayoría de las actividades de la vida diaria

4 Encamado el 100% del día y necesita ayuda para todas las actividades básicas

5 El paciente está moribundo o morirá en horas

## 8.2. Criterios de evaluación de respuesta de la OMS

Lesión medible: aquella en las que puede medirse tamaño en 2 dimensiones. Se emplea el producto del diámetro mayor y el diámetro perpendicular a él más largo.

*Tipos de respuesta*: se evalúan por el cambio de la suma de los productos de los diámetros especificados. No se especifica un número máximo de lesiones. Se distingue:

- Respuesta Completa (RC): desaparición de toda la enfermedad conocida, confirmado a las 4 o más semanas.
  
- Respuesta Parcial (RP): descenso mayor o igual al 50% desde la medición basal, confirmado a las 4 o más semanas.
  
- Progresión de la enfermedad (PE ó PD): incremento mayor o igual al 25% en el tamaño de una o más lesiones, o aparición de nuevas lesiones.
  
- No cambios (NC): no cumple criterios de respuesta parcial ni progresión.

### 8.3. Estadificación del carcinoma no microcítico pulmonar (previa):

#### Tumor Primario (T)

Tx - No se puede determinar la presencia de tumor primario, o el tumor se demuestra por la presencia de células malignas en el esputo o lavados bronquiales pero no visualizado por imagen o broncoscopia.
T0 - Sin evidencia de tumor primario
Tis - Carcinoma in situ
T1 - Tumor $\leq 3$ cm de diámetro sin invasión más proximal que el bronquio lobar
T2 - Tumor $>3$ cm de diámetro ó Tumor de cualquier tamaño con alguno de los siguientes: Invasión de pleura visceral Atelectasia no del pulmón completo Extensión proximal a más de dos cm de la carina
T3 - Tumor de cualquier tamaño con alguno de los siguientes: Invasión de la pared torácica Afectación del diafragma, pleura mediastínica o pericardio Atelectasia pulmón completo Extensión proximal a menos de 2 cm de la carina
T4 - Tumor de cualquier tamaño con alguno de los siguientes: Invasión del mediastino Invasión del corazón o grandes vasos Invasión de la tráquea o esófago Invasión del cuerpo vertebral o de la carina Presencia de derrame pleural o pericárdico maligno Nódulo(s) tumoral(es) satélite(s) en el mismo lóbulo que el tumor primario

#### Afectación Ganglionar (N)

N0 - No afectación ganglionar regional
N1 - Metástasis hiliar ipsilateral hilar y/o peribronquiales ipsilaterales
N2 - Metástasis mediastínica ipsilateral mediastinal y/o subcarinal nodes
N3 - Metástasis mediastínica o hiliar contralateral ó presencia de metástasis escalénica o supraclavicular ipsi o contralateral

#### Metástasis (M)

M0 - No metástasis a distancia
M1 - Sí metástasis a distancia (incluyendo nódulos tumorales metastáticos en lóbulos diferentes del tumor primario)

#### Agrupación por estadios:

Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
Estadio IIA	T1	N1	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T3	N1	M0
	T1-3	N2	M0
Estadio IIIB	T1-4	N3	M0
	T4	N1-3	M0
Estadio IV	T1-4	N1-3	M1

Adaptado de: AJCC Cancer Staging Manual, 6ª edición, Nueva York, 2002.

## 8.4. Estadificación del carcinoma no microcítico pulmonar (actual):

### Tumor primario (T)

- Tx No se puede determinar la presencia de tumor primario, o el tumor se demuestra por la presencia de células malignas en el esputo o lavados bronquiales pero no visualizado por imagen o broncoscopia.
- T0 Sin evidencia de tumor primario
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor de 3 cm o menos en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (p.ej. no en el bronquio principal) (si la extensión es sólo por la pared bronquial y más proximal que el bronquio principal, se sigue clasificando T1a)  
 T1a Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor  
 T1b Tumor de más de 2 cm pero menos de 3 cm en su diámetro mayor
- T2 Tumor de más de 3 cm pero no más de 7 cm; o tumor con alguna de las siguientes características:
  - Afecta al bronquio principal, 2 cm o más distal de la carina.
  - Invade la pleura visceral
  - Asociado con atelectasia o neumonitis post-obstructiva que se extiende a la región hilar pero no afecta a todo el pulmón
 T2a Tumor de más de 3 cm pero menos de 5 cm en su diámetro mayor  
 T2b Tumor de más de 5 cm pero menos de 7 cm en su diámetro mayor
- T3 Tumor mayor de 7 cm o que invade alguna de las siguientes estructuras: pared torácica (incluye tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumores en bronquio principal a <2 cm distancia de la carina sin afectarla; o asociados con atelectasia o neumonitis post-obstructiva de todo el pulmón; o nódulos diferentes en el mismo lóbulo que el primario
- T4 Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulos en distintos lóbulos ipsilaterales al primario.

### Ganglios linfáticos (N)

- Nx No se puede determinar la presencia de ganglios linfáticos
- N0 No hay metástasis en ganglios linfáticos
- N1 Metástasis en ganglios: peribronquiales y/o hiliares ipsilaterales y ganglios intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa
- N2 Metástasis en ganglios: mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
- N3 Metástasis en ganglios: mediastínicos y/o hiliares contralaterales, escalenos (ipsi o contralaterales), o supraclaviculares.

### Metástasis a distancia (M)

- M0 No hay metástasis a distancia
- M1 Metástasis a distancia  
 M1a Nódulos tumorales en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o con derrame maligno pleural o pericárdico (confirmado histológicamente)  
 M1b metástasis a distancia

Estadio IA	T1a,b	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
Estadio IIA	T1a,b T2a T2b	N1 N0	M0 M0
Estadio IIB	T2b T3	N1 N0	M0 M0
Estadio IIIA	T1a,bT2a,b T3 T4	N2 N1,2 N0,1	M0 M0 M0
Estadio IIIB	T1-4 T4	N3 N2	M0 M0
Estadio IV	T1-4	N1-3	M1a,b

Adaptado de: AJCC Cancer Staging Manual, 7ª edición, Nueva York, 2009.

## 8.5. Clasificación histológica del carcinoma pulmonar:

### **Carcinoma de células escamosas**

- Papilar
- Células claras
- Células pequeñas
- Basaloide

### **Adenocarcinoma**

- Subtipo mixto
- Acinar
- Papilar
- Bronquioloalveolar
  - No mucinoso
  - Mucinoso
  - Mezcla de no mucinoso y mucinoso o indeterminado
- Sólido con producción de mucina
  - Adenocarcinoma fetal
  - Carcinoma mucinoso “coloide”
  - Cistoadenocarcinoma mucinoso
  - Adenoca en anillo de sello
  - Adenoca de células claras

### **Carcinoma de células grandes**

- Carcinoma neuroendocrino de células grandes
  - Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado
- Carcinoma basaloide
- Carcinoma tipo linfoepitelioma
- Carcinoma de células claras
- Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide

### **Carcinoma adenoescamoso**

### **Carcinoma de células pequeñas**

**Otros subtipos:**      **Carcinoma sarcomatoide**

**Tumor carcinoide**

**Tumores de glándula salivar**

**Lesiones preinvasivas**

**Tumores mesenquimales**

## Anexo

A continuación se muestra la reciente propuesta para el cambio en la clasificación histológica del adenocarcinoma de pulmón.

<b>Clasificación OMS 2004</b>	<b>Propuesta IASCL/ATS/ERS</b>
<b>ADENOCARCINOMA</b> Subtipo mixto Acinar Papilar Sólido	<i>Adenocarcinoma con patrones morfológicos claros:</i> Adenocarcinoma, describir los patrones identificados (incluido el micropapilar, no incluido en 2004) Comentario: si crecimiento lepidico puro – la mención de un componente invasivo no puede ser excluido
Carcinoma Bronquioloalveolar (no mucinoso)	Adenocarcinoma con patrón lepidico
Carcinoma Bronquioloalveolar (mucinoso)	Adenocarcinoma mucinoso con patrón específico
Fetal	Adenocarcinoma con patrón fetal
Mucinoso (coloide)	Adenocarcinoma con patrón coloideo
Anillo de sello	Adenocarcinoma con (patrón específico) y en anillo de sello
Célula clara	Adenocarcinoma con (patrón específico) y características de célula clara
Sin equivalente en 2004 – la mayoría clasificados como adenocarcinomas sólidos	<i>Patrón de Adenocarcinoma no presente (pero sí IHQ que lo apoya):</i> Carcinoma pulmonar no célula pequeña, probable adenocarcinoma
<b>CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS</b> Papilar Célula clara Célula pequeña Basaloide	<i>Carcinoma escamoso con patrones claros:</i> Carcinoma de células escamosas
Sin equivalente en 2004	<i>Patrón de carcinoma escamoso no presente (pero sí IHQ que lo apoya):</i> Carcinoma pulmonar no célula pequeña, probable carcinoma escamoso
<b>CARCINOMA MICROCÍTICO</b>	Carcinoma microcítico
<b>CARCINOMA DE CÉLULA GRANDE</b>	Carcinoma no microcítico, sin otra especificación
Carcinoma neuroendocrino de célula grande	Carcinoma no microcítico con morfología neuroendocrina y marcadores NE positivos
Carcinoma de célula grande con morfología neuroendocrina	Carcinoma no microcítico con morfología neuroendocrina (marcadores NE negativos)
<b>CARCINOMA ADENOESCAMOSO</b>	<i>Patrones morfológicos de Ca escamoso y adenoCa:</i> Carcinoma no microcítico con patrón de adenocarcinoma y carcinoma escamoso. Podría representar el carcinoma adenoescamoso.
Sin equivalente en 2004	<i>Patrones morfológicos de Ca escamoso y Adenoca no presentes pero IHQ confusa:</i> Carcinoma no microcítico, sin otra especificación, especificando las tinciones realizadas.
<b>Carcinoma Sarcomatode</b>	Carcinoma pulmonar no microcítico pobremente diferenciado con células en huso o gigantes (mencionando si existe componente escamoso o adenoC)

Propuesta para el cambio de clasificación del Adenocarcinoma pulmonar. Tomado de: Travis, WD, *Journal of Thoracic Oncology* (19).

## **9. Bibliografía**

---



1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.
3. Zielinski SL. Diversity in cancer rates, control programs matches diversity of European Union. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Oct 5;97(19):1398-9.
4. López-Abente G, Ramis R, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Gómez-Barroso D, et al. ATLAS municipal de mortalidad por cáncer en España, 1989-1998. III IdSC, editor. Madrid 2006.
5. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*. 1950 Sep 30;2(4682):739-48.
6. Levin ML, Goldstein H, Gerhardt PR. Cancer and tobacco smoking; a preliminary report. *J Am Med Assoc*. 1950 May 27;143(4):336-8.
7. Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc*. 1950 May 27;143(4):329-36.
8. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol*. 2001 Jul;14(7):767-90.
9. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*. 1996 Oct 18;274(5286):430-2.
10. Hainaut P, Pfeifer GP. Patterns of p53 G-->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis*. 2001 Mar;22(3):367-74.
11. Kaufman EL, Jacobson JS, Hershman DL, Desai M, Neugut AI. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jan;26(3):392-8.
12. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008 Sep 25;359(13):1367-80.
13. Bell D, Gore I, Okimoto R, Godin-Heymann N, Sordella R, Mulloy R, et al. Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet*. 2005 Dec;37(12):1315-6.

## Bibliografia

14. Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*. 2008 Apr 3;452(7187):633-7.
15. McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V, Boffetta P, Chabrier A, Byrnes G, et al. Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1404-6.
16. Yu D, Zhang X, Liu J, Yuan P, Tan W, Guo Y, et al. Characterization of functional excision repair cross-complementation group 1 variants and their association with lung cancer risk and prognosis. *Clin Cancer Res*. 2008 May;14(9):2878-86.
17. Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2007 Mar;28(3):507-18.
18. Travis W, Brambilla E, Müller-Hermelink H, Harris C. World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics. Tumours of the lung, pleura, thymus and heart. World Health Organization Pathology and Genetics. Tumours of the lung, thymus and heart, editor. Lyon: IARC Press; 2004.
19. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2011 Feb;6(2):244-85.
20. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed. UICC, editor: Wiley-Blackwell; 2009.
21. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-small cell lung cancer. 2012.
22. Ferguson MK, Lehman AG. Sleeve lobectomy or pneumonectomy: optimal management strategy using decision analysis techniques. *Ann Thorac Surg*. 2003 Dec;76(6):1782-8.
23. Lardinois D, De Leyn P, Van Schil P, Porta RR, Waller D, Passlick B, et al. ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006 Nov;30(5):787-92.
24. Timmerman R, Paulus R, Galvin J, Michalski J, Straube W, Bradley J, et al. Stereotactic body radiation therapy for inoperable early stage lung cancer. *JAMA*. 2010 Mar;303(11):1070-6.
25. Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, Chevret S, Quoix E, Lebeau B, et al. Preoperative chemotherapy followed by surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):247-53.

26. Pisters K, Vallieres E, Bunn P. S9900: A phase III trial of surgery alone or surgery plus preoperative paclitaxel/carboplatin chemotherapy in early stage non-small cell lung cancer: Preliminary results. *J Clin Oncol* 2005; 23(suppl 16): S624.
27. Roth JA, Atkinson EN, Fossella F, Komaki R, Bernadette Ryan M, Putnam JB, Jr., et al. Long-term follow-up of patients enrolled in a randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 1998 Jul;21(1):1-6.
28. Rosell R, Gomez-Codina J, Camps C, Javier Sanchez J, Maestre J, Padilla J, et al. Preresectional chemotherapy in stage IIIA non-small-cell lung cancer: a 7-year assessment of a randomized controlled trial. *Lung Cancer*. 1999 Oct;26(1):7-14.
29. Andre F, Grunenwald D, Pignon JP, Dujon A, Pujol JL, Brichon PY, et al. Survival of patients with resected N2 non-small-cell lung cancer: evidence for a subclassification and implications. *J Clin Oncol*. 2000 Aug;18(16):2981-9.
30. Esteban E, de Sande J, Villanueva N, Corral N, Muñoz I, Vieitez J, et al. Cisplatin plus gemcitabine with or without vinorelbine as induction chemotherapy prior to radical locoregional treatment for patients with stage III non-small-cell lung cancer (NSCLC): results of a prospective randomized study. *Lung Cancer*. 2007 Feb;55(2):173-80.
31. Martini N, Flehinger BJ. The role of surgery in N2 lung cancer. *Surg Clin North Am*. 1987 Oct;67(5):1037-49.
32. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. *BMJ*. 1995 Oct 7;311(7010):899-909.
33. Marino P, Preatoni A, Cantoni A. Randomized trials of radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in stages IIIa and IIIb nonsmall cell lung cancer. A meta-analysis. *Cancer*. 1995 Aug 15;76(4):593-601.
34. Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E, Curran WJ, Furuse K, Fournel P, et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 May;28(13):2181-90.
35. Van Meerbeeck J, Kramer G, Van Schil P. A randomized trial of radical surgery versus thoracic radiotherapy in patients with stage IIIA-N2 non-small cell lung cancer after response to induction chemotherapy (EORTC 08941). Presented at the 41st annual meeting of the American Society of Clinical Oncology, Orlando, FL, 2005.
36. Albain KS, Swann RS, Rusch VW, Turrisi AT, Shepherd FA, Smith C, et al. Radiotherapy plus chemotherapy with or without surgical resection for stage III non-

## Bibliografia

small-cell lung cancer: a phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2009 Aug;374(9687):379-86.

37. Meacci E, Cesario A, Cusumano G, Lococo F, D'Angelillo R, Dall'armi V, et al. Surgery for patients with persistent pathological N2 IIIA stage in non-small-cell lung cancer after induction radio-chemotherapy: the microscopic seed of doubt. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011 Sep;40(3):656-63.

38. Bauman JE, Mulligan MS, Martins RG, Kurland BF, Eaton KD, Wood DE. Salvage lung resection after definitive radiation (>59 Gy) for non-small cell lung cancer: surgical and oncologic outcomes. *Ann Thorac Surg*. 2008 Nov;86(5):1632-8.

39. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzáles-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2006 Sep;7(9):719-27.

40. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 2008 Jul;26(21):3552-9.

41. Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2005 Jun;352(25):2589-97.

42. Arriagada R, Dunant A, Pignon JP, Bergman B, Chabowski M, Grunenwald D, et al. Long-term results of the international adjuvant lung cancer trial evaluating adjuvant Cisplatin-based chemotherapy in resected lung cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan;28(1):35-42.

43. Strauss GM, Herndon JE, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, et al. Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups. *J Clin Oncol*. 2008 Nov;26(31):5043-51.

44. Arriagada R, Auperin A, Burdett S, Higgins JP, Johnson DH, Le Chevalier T, et al. Adjuvant chemotherapy, with or without postoperative radiotherapy, in operable non-small-cell lung cancer: two meta-analyses of individual patient data. *Lancet*. 2010 Apr;375(9722):1267-77.

45. Decker RH, Langer CJ, Rosenzweig KE, Chang JY, Gewanter RM, Ginsburg ME, et al. ACR Appropriateness Criteria(R) Postoperative Adjuvant Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Clin Oncol*. United States 2011. p. 537-44.
46. Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
47. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*. 2007 Aug 2;448(7153):561-6.
48. Rodig SJ, Mino-Kenudson M, Dacic S, Yeap BY, Shaw A, Barletta JA, et al. Unique clinicopathologic features characterize ALK-rearranged lung adenocarcinoma in the western population. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug;15(16):5216-23.
49. Shaw AT, Yeap BY, Mino-Kenudson M, Digumarthy SR, Costa DB, Heist RS, et al. Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 10;27(26):4247-53.
50. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012 Mar;30(8):863-70.
51. Jänne PA, Meyerson M. ROS1 rearrangements in lung cancer: a new genomic subset of lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2012 Mar;30(8):878-9.
52. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18(3):378-81.
53. Pao W, Hutchinson KE. Chipping away at the lung cancer genome. *Nat Med*. 2012;18(3):349-51.
54. Lipson D, Capelletti M, Yelensky R, Otto G, Parker A, Jarosz M, et al. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. 2012;18(3):382-4.
55. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2012;18(3):375-7.
56. Weiss J, Sos ML, Seidel D, Peifer M, Zander T, Heuckmann JM, et al. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med*. 2010 Dec;2(62):62ra93.

## Bibliografia

57. Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman H, Bild A, Koontz J, et al. A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006 Aug;355(6):570-80.
58. Chen H, Yu S, Chen C, Chang G, Chen C, Yuan A, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2007 Jan;356(1):11-20.
59. Yu S, Chen H, Chang G, Chen C, Chen H, Singh S, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell.* 2008 Jan;13(1):48-57.
60. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2004 Dec;351(27):2817-26.
61. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* 2002 Dec;347(25):1999-2009.
62. Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, et al. Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jan;94(2):116-28.
63. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007 Nov;25(33):5287-312.
64. Ludovini V, Pistola L, Gregorc V, Floriani I, Rulli E, Piattoni S, et al. Plasma DNA, microsatellite alterations, and p53 tumor mutations are associated with disease-free survival in radically resected non-small cell lung cancer patients: a study of the perugia multidisciplinary team for thoracic oncology. *J Thorac Oncol.* 2008 Apr;3(4):365-73.
65. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S, Ulkus L, Brannigan B, Collura CV, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med.* 2008 Jul 24;359(4):366-77.
66. Yildiz P, Shyr Y, Rahman J, Wardwell N, Zimmerman L, Shakhtour B, et al. Diagnostic accuracy of MALDI mass spectrometric analysis of unfractionated serum in lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007 Oct;2(10):893-901.
67. Yanagisawa K, Tomida S, Shimada Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. A 25-signal proteomic signature and outcome for patients with resected non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Jun;99(11):858-67.

68. Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*. 2002 Sep;122(3):1037-57.
69. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet*. 2011 Nov;378(9804):1727-40.
70. Garrido P, Fernández Abad M, Olmedo ME. Molecular Selection Treatment on Lung Cancer. *Cancer & Chemotherapy Reviews*. [Review]. 2009;4(1):44-51.
71. Lord R, Brabender J, Gandara D, Alberola V, Camps C, Domine M, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Jul;8(7):2286-91.
72. Taron M, Rosell R, Felip E, Mendez P, Souglakos J, Ronco MS, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet*. 2004 Oct;13(20):2443-9.
73. Rosell R, Danenberg K, Alberola V, Bepler G, Sanchez J, Camps C, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004 Feb;10(4):1318-25.
74. Scagliotti G, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Jul;26(21):3543-51.
75. Fukuoka M, Wu YL, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong SS, Sriuranpong V, et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol*. 2011 Jul 20;29(21):2866-74.
76. Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 20;27(9):1394-400.
77. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010 Jun 24;362(25):2380-8.
78. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer

## Bibliografia

harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010 Feb;11(2):121-8.

79. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009 Sep 3;361(10):947-57.

80. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2012 Mar;13(3):239-46.

81. Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2011 Aug;12(8):735-42.

82. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2005 Jul;353(2):123-32.

83. Bezjak A, Tu D, Seymour L, Clark G, Trajkovic A, Zukin M, et al. Symptom improvement in lung cancer patients treated with erlotinib: quality of life analysis of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol.* 2006 Aug;24(24):3831-7.

84. Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicenias S, Miliauskas S, Grigorescu AC, Hillenbach C, et al. Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced, non-small-cell lung cancer with poor prognosis (TITAN): a randomised multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2012 Mar;13(3):300-8.

85. Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, von Pawel J, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet.* 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1527-37.

86. Douillard JY, Shepherd FA, Hirsh V, Mok T, Socinski MA, Gervais R, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib and docetaxel in previously treated non-

small-cell lung cancer: data from the randomized phase III INTEREST trial. *J Clin Oncol.* 2010 Feb;28(5):744-52.

87. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicens S, Szczésna A, Juhász E, et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2010 Jun;11(6):521-9.

88. Kwak E. The role of irreversible HER family inhibition in the treatment of patients with non-small cell lung cancer. *Oncologist.* 2011;16(11):1498-507.

89. Yang J, Schuler M, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. LUX-Lung 3: A randomized, open label, phase III study of afatinib versus pemetrexed and cisplatin as first-line treatment for patients with advanced adenocarcinoma of the lung harboring EGFR-activating mutations. En: 2012 ASCO Annual Meeting. Chicago: *J Clin Oncol* 30, 2012 (suppl; abstr LBA7500).

90. Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen YM, Park K, Kim SW, et al. Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2012 May;13(5):528-38.

91. Hirsch FR, Herbst RS, Olsen C, Chansky K, Crowley J, Kelly K, et al. Increased EGFR gene copy number detected by fluorescent in situ hybridization predicts outcome in non-small-cell lung cancer patients treated with cetuximab and chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2008 Jul;26(20):3351-7.

92. O'Byrne KJ, Gatzemeier U, Bondarenko I, Barrios C, Eschbach C, Martens UM, et al. Molecular biomarkers in non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol.* 2011 Aug;12(8):795-805.

93. Pirker R, Pereira JR, Szczésna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Prognostic factors in patients with advanced non-small cell lung cancer: Data from the phase III FLEX study. *Lung Cancer.* 2012 Aug;77(2):376-82.

94. Helfrich BA, Raben D, Varella-Garcia M, Gustafson D, Chan DC, Bemis L, et al. Antitumor activity of the epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839, Iressa) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with gene copy number and EGFR mutations but not EGFR protein levels. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec;12(23):7117-25.

## Bibliografia

95. El-Zammar OA, Zhang S, Katzenstein AL. Comparison of FISH, PCR, and immunohistochemistry in assessing EGFR status in lung adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic features. *Diagn Mol Pathol*. 2009 Sep;18(3):133-7.
96. Ludovini V, Bellezza G, Pistola L, Bianconi F, Di Carlo L, Sidoni A, et al. High coexpression of both insulin-like growth factor receptor-1 (IGFR-1) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is associated with shorter disease-free survival in resected non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol*. 2009 May;20(5):842-9.
97. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):1850-5.
98. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G, et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol*. 1997 Aug;15(8):2858-65.
99. Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M, Silvestri V, et al. Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin Cancer Res*. 1998 Jan;4(1):241-9.
100. Ohsaki Y, Tanno S, Fujita Y, Toyoshima E, Fujiuchi S, Nishigaki Y, et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients with p53 overexpression. *Oncology reports*. 2000 May-Jun;7(3):603-7.
101. Meert AP, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Lafitte JJ, Mascaux C, et al. The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J*. 2002 Oct;20(4):975-81.
102. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul;358(6381):15-6.
103. Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stasková Z, Lukás J, Rejthar A, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene*. 1991 Sep;6(9):1699-703.
104. Esrig D, Elmajian D, Groshen S, Freeman JA, Stein JP, Chen SC, et al. Accumulation of nuclear p53 and tumor progression in bladder cancer. *N Engl J Med*. 1994 Nov;331(19):1259-64.

105. Marchetti A, Buttitta F, Merlo G, Diella F, Pellegrini S, Pepe S, et al. p53 alterations in non-small cell lung cancers correlate with metastatic involvement of hilar and mediastinal lymph nodes. *Cancer Res.* 1993 Jun;53(12):2846-51.
106. Mitsudomi T, Oyama T, Nishida K, Ogami A, Osaki T, Nakanishi R, et al. p53 nuclear immunostaining and gene mutations in non-small-cell lung cancer and their effects on patient survival. *Ann Oncol.* 1995;6 Suppl 3:S9-13.
107. Hall PA, McKee PH, Menage HD, Dover R, Lane DP. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene.* 1993 Jan;8(1):203-7.
108. Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY. Wild-type p53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Jan;23(1):154-64.
109. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):4055-63.
110. Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J.* 2001 Oct;18(4):705-19.
111. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 1991;27(11):1372-5.
112. Koo JS, Kim SH. EGFR and HER-2 status of non-small cell lung cancer brain metastasis and corresponding primary tumor. *Neoplasma.* 2011;58(1):27-34.
113. Harpole DH, Jr., Herndon JE, 2nd, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. *Cancer Res.* 1995 Jan 1;55(1):51-6.
114. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE, Weiner DB, Greene MI, Torney L, et al. p185neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res.* 1990 Aug 15;50(16):5184-7.
115. Han H, Landreneau RJ, Santucci TS, Tung MY, Macherey RS, Shackney SE, et al. Prognostic value of immunohistochemical expressions of p53, HER-2/neu, and bcl-2 in stage I non-small-cell lung cancer. *Hum Pathol.* 2002 Jan;33(1):105-10.

## Bibliografia

116. Heinmöller P, Gross C, Beyser K, Schmidtgen C, Maass G, Pedrocchi M, et al. HER2 status in non-small cell lung cancer: results from patient screening for enrollment to a phase II study of herceptin. *Clin Cancer Res.* 2003 Nov;9(14):5238-43.
117. Sun Y, Ren Y, Fang Z, Li C, Fang R, Gao B, et al. Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic mutant kinases. *J Clin Oncol.* 2010 Oct;28(30):4616-20.
118. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010 Oct 28;363(18):1693-703.
119. Choi YL, Soda M, Yamashita Y, Ueno T, Takashima J, Nakajima T, et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *N Engl J Med.* 2010 Oct 28;363(18):1734-9.
120. Wells SA, Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol.* 2012 Jan;30(2):134-41.
121. Natale RB, Thongprasert S, Greco FA, Thomas M, Tsai CM, Sunpaweravong P, et al. Phase III trial of vandetanib compared with erlotinib in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011 Mar;29(8):1059-66.
122. Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature.* 2010 Apr;464(7291):993-8.
123. Dancey JE, Bedard PL, Onetto N, Hudson TJ. The genetic basis for cancer treatment decisions. *Cell.* 2012 Feb;148(3):409-20.
124. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar;144(5):646-74.
125. Dhillon A, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007 May;26(22):3279-90.
126. Giancotti F, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999 Aug;285(5430):1028-32.
127. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer.* 2012 Aug;12(8):553-63.
128. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011 Jun;364(26):2507-16.

129. Simon MP, Pedeutour F, Sirvent N, Grosgeorge J, Minoletti F, Coindre JM, et al. Deregulation of the platelet-derived growth factor B-chain gene via fusion with collagen gene COL1A1 in dermatofibrosarcoma protuberans and giant-cell fibroblastoma. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):95-8.
130. Brozovic A, Osmak M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett.* 2007 Jun;251(1):1-16.
131. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009 Aug;9(8):537-49.
132. Bubici C, Papa S, Pham CG, Zazzeroni F, Franzoso G. NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle.* 2004 Dec;3(12):1524-9.
133. Kennedy NJ, Davis RJ. Role of JNK in tumor development. *Cell Cycle.* 2003 May-Jun;2(3):199-201.
134. Chen F. JNK-induced apoptosis, compensatory growth, and cancer stem cells. *Cancer Res.* 2012 Jan;72(2):379-86.
135. Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1773(8):1358-75.
136. Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science.* 1993 Mar 19;259(5102):1760-3.
137. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.* 1994 Aug 5;265(5173):808-11.
138. Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, et al. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell.* 1994 Sep 23;78(6):1027-37.
139. Bulavin D, Fornace AJ. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res.* 2004;92:95-118.
140. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *The Biochemical journal.* 2010 Aug 1;429(3):403-17.
141. Ferreiro I, Joaquin M, Islam A, Gomez-Lopez G, Barragan M, Lombardía L, et al. Whole genome analysis of p38 SAPK-mediated gene expression upon stress. *BMC Genomics.* 2010;11:144.
142. Nebreda A, Dolado I. Regulation of tumorigenesis by p38 $\alpha$  MAP kinase. In: Heidelberg SB, editor. *Stress-Activated Protein Kinases* 2008. p. 99-128.

## Bibliografia

143. Wagner E, Nebreda A. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug;9(8):537-49.
144. Suzanne M, Irie K, Glise B, Agnès F, Mori E, Matsumoto K, et al. The Drosophila p38 MAPK pathway is required during oogenesis for egg asymmetric development. *Genes Dev*. 1999 Jun;13(11):1464-74.
145. Adams R, Porras A, Alonso G, Jones M, Vintersten K, Panelli S, et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell*. 2000 Jul;6(1):109-16.
146. Kojima I, Umezawa K. Conophylline: a novel differentiation inducer for pancreatic beta cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(5-6):923-30.
147. Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2006 Apr;12(4):446-51.
148. Liu Y, Martinez L, Ebine K, Abe MK. Role for mitogen-activated protein kinase p38 alpha in lung epithelial branching morphogenesis. *Dev Biol*. 2008 Feb 1;314(1):224-35.
149. Ventura JJ, Tenbaum S, Perdiguero E, Huth M, Guerra C, Barbacid M, et al. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2007 Jun;39(6):750-8.
150. Nebreda A, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*. 2000 Jun;25(6):257-60.
151. Neininger A, Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Winzen R, Eckert R, Volk H, et al. MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem*. 2002 Feb;277(5):3065-8.
152. Cohen SB, Cheng TT, Chindalore V, Damjanov N, Burgos-Vargas R, Delora P, et al. Evaluation of the efficacy and safety of pamapimod, a p38 MAP kinase inhibitor, in a double-blind, methotrexate-controlled study of patients with active rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009 Feb;60(2):335-44.
153. Ji RR, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*. 2009 Apr;60(1):135-48.
154. Liu Y, Wang D, Rhaleb N, Yang X, Xu J, Sankey S, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase protects the heart against cardiac remodeling in mice

with heart failure resulting from myocardial infarction. *J Card Fail.* 2005 Feb;11(1):74-81.

155. Mehan S, Meena H, Sharma D, Sankhla R. JNK: a stress-activated protein kinase therapeutic strategies and involvement in Alzheimer's and various neurodegenerative abnormalities. *J Mol Neurosci.* 2011 Mar;43(3):376-90.

156. Atzori C, Ghetti B, Piva R, Srinivasan A, Zolo P, Delisle M, et al. Activation of the JNK/p38 pathway occurs in diseases characterized by tau protein pathology and is related to tau phosphorylation but not to apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Dec;60(12):1190-7.

157. Reinhardt H, Aslanian A, Lees J, Yaffe M. p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell.* 2007 Feb;11(2):175-89.

158. Halawani D, Mondeh R, Stanton L, Beier F. p38 MAP kinase signaling is necessary for rat chondrosarcoma cell proliferation. *Oncogene.* 2004 Apr;23(20):3726-31.

159. Dolado I, Swat A, Ajenjo N, De Vita G, Cuadrado A, Nebreda AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2007 Feb;11(2):191-205.

160. Zwang Y, Yarden Y. p38 MAP kinase mediates stress-induced internalization of EGFR: implications for cancer chemotherapy. *EMBO J.* 2006 Sep 20;25(18):4195-206.

161. Cruz-Morcillo MA, Sánchez-Prieto R. Autop38-phagy and apop38-tosis in genotoxic stress: a strange duo. *Autophagy.* 2012 Jan;8(1):135-7.

162. Cosaceanu D, Budiu R, Carapancea M, Castro J, Lewensohn R, Dricu A. Ionizing radiation activates IGF-1R triggering a cytoprotective signaling by interfering with Ku-DNA binding and by modulating Ku86 expression via a p38 kinase-dependent mechanism. *Oncogene.* 2007 Apr;26(17):2423-34.

163. Wang W, Chen J, Liao R, Deng Q, Zhou J, Huang S, et al. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol.* 2002 May;22(10):3389-403.

164. Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer.* 2007 Nov;7(11):834-46.

## Bibliografia

165. Simon C, Simon M, Vucelic G, Hicks M, Plinkert P, Koitschev A, et al. The p38 SAPK pathway regulates the expression of the MMP-9 collagenase via AP-1-dependent promoter activation. *Exp Cell Res*. 2001 Dec;271(2):344-55.
166. Matsuo Y, Amano S, Furuya M, Namiki K, Sakurai K, Nishiyama M, et al. Involvement of p38alpha mitogen-activated protein kinase in lung metastasis of tumor cells. *J Biol Chem*. 2006 Dec 1;281(48):36767-75.
167. del Barco Barrantes I, Nebreda AR. Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis. *Biochemical Society transactions*. 2012 Feb;40(1):79-84.
168. Fuertes M, Alonso C, Pérez J. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem Rev*. 2003 Mar;103(3):645-62.
169. Brozovic A, Osmak M. Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance. *Cancer Lett*. 2007 Jun 18;251(1):1-16.
170. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, Michels J, Martins I, Kepp O, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012 Apr;31(15):1869-83.
171. Galan-Moya EM, de la Cruz-Morcillo MA, Llanos Valero M, Callejas-Valera JL, Melgar-Rojas P, Hernandez Losa J, et al. Balance between MKK6 and MKK3 mediates p38 MAPK associated resistance to cisplatin in NSCLC. *PLoS One*. 2011;6(12):e28406.
172. Jeong H, Cho H, Chang I, Yoon S, Jeon Y, Chung M, et al. Rac1 prevents cisplatin-induced apoptosis through down-regulation of p38 activation in NIH3T3 cells. *FEBS Lett*. 2002 May;518(1-3):129-34.
173. Elsea C, Roberts D, Druker B, Wood L. Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *PLoS ONE*. 2008;3(6):e2355.
174. Ramesh G, Reeves WB. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005 Jul;289(1):F166-74.
175. Francescato H, Costa R, da Silva C, Coimbra T. Treatment with a p38 MAPK inhibitor attenuates cisplatin nephrotoxicity starting after the beginning of renal damage. *Life Sci*. 2009 Apr;84(17-18):590-7.
176. Whitmarsh A, Davis R. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. *Oncogene*. 2007 May;26(22):3172-84.
177. Li J, Yang Y, Peng Y, Austin R, van Eyndhoven W, Nguyen K, et al. Oncogenic properties of PPM1D located within a breast cancer amplification epicenter at 17q23. *Nat Genet*. 2002 Jun;31(2):133-4.

178. Yu W, Imoto I, Inoue J, Onda M, Emi M, Inazawa J. A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. *Oncogene*. 2007 Feb;26(8):1178-87.
179. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh G, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007 Mar;446(7132):153-8.
180. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) [database on the Internet]2009.
181. Liao Y, Hung MC. Regulation of the activity of p38 mitogen-activated protein kinase by Akt in cancer and adenoviral protein E1A-mediated sensitization to apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2003 Oct;23(19):6836-48.
182. Miki H, Yamada H, Mitamura K. Involvement of p38 MAP kinase in apoptotic and proliferative alteration in human colorectal cancers. *Anticancer Res*. 1999 Nov-Dec;19(6B):5283-91.
183. Esteva F, Hortobagyi G, Sahin A, Smith T, Chin D, Liang S, et al. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res*. 2001;7(3):171-7.
184. Schmitz KJ, Callies R, Wohlschlaeger J, Kimmig R, Otterbach F, Bohr J, et al. Overexpression of cyclo-oxygenase-2 is an independent predictor of unfavourable outcome in node-negative breast cancer, but is not associated with protein kinase B (Akt) and mitogen-activated protein kinase (ERK1/2, p38) activation or with Her-2/neu signalling pathways. *J Clin Pathol*. England2006. p. 685-91.
185. Davidson B, Konstantinovskiy S, Kleinberg L, Nguyen MT, Bassarova A, Kvalheim G, et al. The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma. *Gynecol Oncol*. United States2006. p. 453-61.
186. Samaras V, Tsopanomichalou M, Stamatelli A, Arnaoutoglou C, Samaras E, Arnaoutoglou M, et al. Is there any potential link among caspase-8, p-p38 MAPK and bcl-2 in clear cell renal cell carcinomas? A comparative immunohistochemical analysis with clinical connotations. *Diagn Pathol*. 2009;4:7.
187. Jorgensen K, Davidson B, Florenes VA. Activation of c-jun N-terminal kinase is associated with cell proliferation and shorter relapse-free period in superficial spreading malignant melanoma. *Mod Pathol*. United States2006. p. 1446-55.

## Bibliografia

188. Handra-Luca A, Lesty C, Hammel P, Sauvanet A, Rebours V, Martin A, et al. Biological and prognostic relevance of mitogen-activated protein kinases in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2012 Apr;41(3):416-21.
189. Gill K, Mohanti BK, Ashraf MS, Singh AK, Dey S. Quantification of p38alphaMAP kinase: a prognostic marker in HNSCC with respect to radiation therapy. *Clin Chim Acta*. Netherlands: 2011 Elsevier B.V; 2012. p. 219-25.
190. Greenberg A, Basu S, Hu J, Yie T, Tchou-Wong K, Rom W, et al. Selective p38 activation in human non-small cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 May;26(5):558-64.
191. Vicent S, Garayoa M, López-Picazo J, Lozano M, Toledo G, Thunnissen F, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun;10(11):3639-49.
192. Vicent S, López-Picazo JM, Toledo G, Lozano MD, Torre W, Garcia-Corchón C, et al. ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours. *British journal of cancer*. 2004 Mar;90(5):1047-52.
193. Tong X, Liu H, Zhao H, Xu S, Li Y, Han L, et al. [The role of Smad4 and MAPK proteins in signal transduction pathway in non-small cell lung cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2006 Oct;28(10):741-5.
194. Zhang Z, Ma J, Zhang L. [Expression and clinical significance of MAPK in non-small cell lung cancer.]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2005 Feb;85(5):339-42.
195. Mountzios G, Planchard D, Besse B, Validire P, Girard P, Devisme C, et al. Mitogen-activated protein kinase activation in lung adenocarcinoma: a comparative study between ever smokers and never smokers. *Clin Cancer Res*. 2008 Jul 1;14(13):4096-102.
196. Shi Y, Chen L, Li J, Lv YL, Sun Q, Wang LX, et al. Prognostic and predictive values of pERK1/2 and pAkt-1 expression in non-small cell lung cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2011 Apr;32(2):381-90.
197. Olson J, Hallahan A. p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy. *Trends Mol Med*. 2004 Mar;10(3):125-9.
198. Matthew P, Tolcher A, Haluska P, Papadopoulos K, Erlichman C, Beheram L, et al. A first-in-human phase I study of the oral p38 MAPK inhibitor LY2228820

dimesylate in patients with advanced cancer. En: 2012 ASCO Annual Meeting. Chicago: J Clin Oncol 30, 2012 (suppl; abstr 3001).

199. Ayala G, Wang D, Wulf G, Frolov A, Li R, Sowadski J, et al. The prolyl isomerase Pin1 is a novel prognostic marker in human prostate cancer. *Cancer Res.* 2003 Oct;63(19):6244-51.

200. Ben-Levy R, Hooper S, Wilson R, Paterson H, Marshall C. Nuclear export of the stress-activated protein kinase p38 mediated by its substrate MAPKAP kinase-2. *Curr Biol.* 1998 Sep;8(19):1049-57.

201. Raingeaud J, Gupta S, Rogers J, Dickens M, Han J, Ulevitch R, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995 Mar;270(13):7420-6.

202. Bava SV, Sreekanth CN, Thulasidasan AK, Anto NP, Cheriyan VT, Puliappadamba VT, et al. Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF- $\kappa$ B in paclitaxel-induced survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their synergism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011 Mar;43(3):331-41.

203. Su JC, Lin KL, Chien CM, Tseng CH, Chen YL, Chang LS, et al. Furano-1,2-naphthoquinone inhibits EGFR signaling associated with G2/M cell cycle arrest and apoptosis in A549 cells. *Cell Biochem Funct.* 2010 Dec;28(8):695-705.

204. Tesz GJ, Guilherme A, Guntur KV, Hubbard AC, Tang X, Chawla A, et al. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) stimulates Map4k4 expression through TNFalpha receptor 1 signaling to c-Jun and activating transcription factor 2. *J Biol Chem.* 2007 Jul;282(27):19302-12.

205. Meijer CA, Le Haen PA, van Dijk RA, Hira M, Hamming JF, van Bockel JH, et al. Activator protein-1 (AP-1) signalling in human atherosclerosis: results of a systematic evaluation and intervention study. *Clin Sci (Lond).* 2012 May;122(9):421-8.

206. Si L, Xu X, Kong Y, Flaherty KT, Chi Z, Cui C, et al. Major response to everolimus in melanoma with acquired imatinib resistance. *J Clin Oncol.* 2012 Feb;30(4):e37-40.

207. Frogne T, Laenkholm AV, Lyng MB, Henriksen KL, Lykkesfeldt AE. Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors. *Breast Cancer Res.* 2009;11(1):R11.

## Bibliografía

208. McDaid HM, Lopez-Barcons L, Grossman A, Lia M, Keller S, Pérez-Soler R, et al. Enhancement of the therapeutic efficacy of taxol by the mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor CI-1040 in nude mice bearing human heterotransplants. *Cancer Res.* 2005 Apr;65(7):2854-60.
209. Hyman JM, Firestone AJ, Heine VM, Zhao Y, Ocasio CA, Han K, et al. Small-molecule inhibitors reveal multiple strategies for Hedgehog pathway blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug;106(33):14132-7.
210. Albanell J, Andreu X, Calasanz MJ, Concha A, Corominas JM, García-Caballero T, et al. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). *Clin Transl Oncol.* 2009 Jun;11(6):363-75.
211. Karnofsky DA, Burchenal JH. The Clinical Evaluation of Chemotherapeutic Agents in Cancer. In: MacLeod CM, editor. *Evaluation of Chemotherapeutic Agents*: Columbia Univ. Press; 1949. p. 196.
212. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer.* 1981 Jan;47(1):207-14.
213. Fisher RA. On the Interpretation of  $\chi^2$  from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Journal of the Royal Statistic Society.* 1922 Jan;85(1):87-94.
214. Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-81.
215. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 1966 Mar;50(3):163-70.
216. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological).* 1972;34(2):187-220.
217. Lopez Guerra JL, Gomez DR, Lin SH, Levy LB, Zhuang Y, Komaki R, et al. Risk factors for local and regional recurrence in patients with resected N0-N1 non-small-cell lung cancer, with implications for patient selection for adjuvant radiation therapy. *Ann Oncol.* 2012 Sep.
218. Paesmans M, Sculier JP, Libert P, Bureau G, Dabouis G, Thiriaux J, et al. Prognostic factors for survival in advanced non-small-cell lung cancer: univariate and multivariate analyses including recursive partitioning and amalgamation algorithms in 1,052 patients. The European Lung Cancer Working Party. *J Clin Oncol.* 1995 May;13(5):1221-30.

219. Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Performance status and smoking status are independent favorable prognostic factors for survival in non-small cell lung cancer: a comprehensive analysis of 26,957 patients with NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2010 May;5(5):620-30.
220. Lipford EH, Eggleston JC, Lillemoe KD, Sears DL, Moore GW, Baker RR. Prognostic factors in surgically resected limited-stage, nonsmall cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol.* 1984 May;8(5):357-65.
221. Vicent S, Garayoa M, Lopez-Picazo JM, Lozano MD, Toledo G, Thunnissen FB, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 1;10(11):3639-49.
222. Ucvet A, Kul C, GURSOY S, Erbaycu AE, Kaya SO, Dinc ZA, et al. [Prognostic value of epithelial growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, E-cadherin, and p120 catenin in resected non-small cell lung carcinoma]. *Arch Bronconeumol.* 2011 Aug;47(8):397-402.
223. Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res.* 1997 Apr;3(4):515-22.
224. Kim YM, Park SY, Pyo H. Cyclooxygenase-2 (COX-2) negatively regulates expression of epidermal growth factor receptor and causes resistance to gefitinib in COX-2-overexpressing cancer cells. *Molecular cancer research : MCR.* 2009 Aug;7(8):1367-77.
225. Adachi S, Yasuda I, Nakashima M, Yamauchi T, Yamauchi J, Natsume H, et al. HSP90 inhibitors induce desensitization of EGF receptor via p38 MAPK-mediated phosphorylation at Ser1046/1047 in human pancreatic cancer cells. *Oncology reports.* 2010 Jun;23(6):1709-14.
226. Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol. United States*2003. p. 3798-807.
227. Shahidi H, Kvale PA. Long-term survival following surgical treatment of solitary brain metastasis in non-small cell lung cancer. *Chest.* 1996 Jan;109(1):271-6.

## Bibliografía

228. Dakubo GD, Jakupciak JP, Birch-Machin MA, Parr RL. Clinical implications and utility of field cancerization. *Cancer Cell Int.* 2007;7:2.
229. Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK, Ro JY, Lee JJ, Tu N, et al. Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol.* 1995 Aug;13(8):1893-903.
230. Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Maynard R, Minna JD. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res.* 1999 Apr;5(4):791-800.
231. Pollán M, Varela G, Torres A, de la Torre M, Ludeña MD, Ortega MD, et al. Clinical value of p53, c-erbB-2, CEA and CA125 regarding relapse, metastasis and death in resectable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2003 Dec;107(5):781-90.
232. Graziano SL, Gu L, Wang X, Tatum AH, Vollmer RT, Strauss GM, et al. Prognostic significance of mucin and p53 expression in stage IB non-small cell lung cancer: a laboratory companion study to CALGB 9633. *J Thorac Oncol.* 2010 Jun;5(6):810-7.
233. Cabanillas R, Rodrigo JP, Astudillo A, Domínguez F, Suárez C, Chiara MD. P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases: new results for an old question. *Cancer.* 2007 May;109(9):1791-8.
234. di Martino E, Tomlinson DC, Knowles MA. A Decade of FGF Receptor Research in Bladder Cancer: Past, Present, and Future Challenges. *Adv Urol.* 2012;2012:429213.
235. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Br J Cancer.* 2005 Aug 22;93(4):387-91.