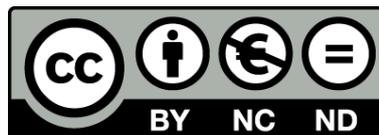




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Valor pronóstico de la expresión tumoral de marcadores embrionarios y restadificación molecular ganglionar en el carcinoma de pulmón no célula pequeña

Ivan Macía Vidueira



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Valor pronóstico de la expresión tumoral de marcadores embrionarios y restadificación molecular ganglionar en el carcinoma de pulmón no célula pequeña

Tesis presentada por
Ivan Macía Vidueira

Para obtener el título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Dirigida por
Dr. Gabriel Capellá Munar - Prof. Dr. Juan Antonio Moya Amorós

Tutorizada por
Prof. Dr. Juan Antonio Moya Amorós

Programa de Doctorado Medicina
Universitat de Barcelona

2016



Health Universitat de
Barcelona
Campus

Esta tesis se realizó en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitari de Bellvitge y en el Laboratori de Recerca Translacional I del Hospital Duran i Reynals, en el marco del Departament de Ciències clíniques, el Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge y el Health Universitat de Barcelona Campus.

Este proyecto fue financiado por la Beca de Ayudas a la Investigación SEPAR2008 848 de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica.

Período de docencia e investigación para la Suficiencia Investigadora, 2006-2008.
Período de investigación del estudio de concordancia, 2005-2007.
Período de investigación del estudio tumoral y ganglionar, 2008-2014.
Proyecto de tesis doctoral, 2013

Sin dudarlo, cosa difícil en mi, dedicada a Beatriz, lo eres todo para mí.
Dedicada a Marc, mezcla adorable, pura energía, es fascinante,
cada día te quiero más.

Ós meus pais, amor infinito, sen o voso esforzo, sen todo o que me destes,
nunca podería chegar ata aquí.

A miña abuela, un pouco de ti sempre vai comigo,
un pouco de ti sempre vai co meu fillo.

A mis directores de tesis, éste es el fruto de vuestro trabajo,
sabed que me sentí muy halagado de poder contar con vosotros,
sabed que me siento muy orgulloso del resultado.

Ha llegado el momento que esperaba desde hace mucho tiempo, unos 10 años aproximadamente. He esperado hasta casi el final de la tesis para disfrutar del momento dulce de agradecer muchas cosas a todas aquellas personas que han participado en esta tesis y en mi vida.

Primero de todo, quisiera dar las gracias a mis directores de tesis. Muchas gracias Dr. Moya, jefe, por todo lo que me has dado, por confiar en mi, por cuidarme, por creer en mi, por apoyarme en los malos momentos, por los consejos del día a día. Gracias por todas las oportunidades. Para mi eres tan importante, eres mi padre profesional y me has hecho crecer como cirujano y como persona, me has enseñado y me sigues enseñando cada día que compartimos. Es difícil resumir en pocas palabras lo mucho que sientes por algunas personas.

Gracias Dr. Capellá, Gabi, por todas aquellas tardes-noches rehaciendo la tesis, gracias por aguantarme, sé que suelo ser bastante testarudo y a veces me cuesta entender las cosas. Gracias por toda la paciencia que has tenido. Es un honor, que en general no sé si merezco, el disponer de tu valioso tiempo. Gracias por abrirme de forma altruista las puertas del laboratorio, por creer en el proyecto y por darme una oportunidad.

Gracias Ignacio por todas aquellas palabras amables, por apoyarme e interesarte por mí en este duro camino que es la tesis, gracias por ser tan cercano. Cuando supe que volvías a Bellvitge fue genial, todo cuadraba. Gracias por recordarme que no hay que tener miedo, que debo ser yo mismo y por todo lo que me estás enseñando día a día desde hace 10 años.

Gracias Ricard por enseñarme los primeros entresijos de la investigación y por todos aquellos consejos ante situaciones clínicas del día a día, me gusta compartir contigo el gusto por la Anatomía, por la investigación y por la Cirugía Torácica, nos lo pasamos bien en quirófano. Gracias por proporcionarme los excelentes diagramas que acompañan algunas fotos de esta tesis. Gracias Fran por lo buen compañero que eres, con mayúsculas y esto no es una cosa menor, contigo aprendo día a día. Gracias a la Annita por ser la alegría del servicio, consigues que la gente tenga química contigo, yo tengo la sensación que conectamos y eso hace fácil trabajar contigo. Gracias Gaby por ser tan buena persona y al Pauet, el más junior que ya se ha hecho grande, te tengo mucho aprecio porque eres muy buen tío, no me olvido que tenemos unos temas pendientes, afortunadamente pronto los saldaremos...

Tengo muchas ganas de deciros que me siento orgulloso de pertenecer a este Servicio. Ya sé que muchas cosas podríamos hacerlas mejor, siempre se puede mejorar, pero cuando me ayudáis y me apoyáis en el día a día, cuando veo como trabajamos en grupo, cuando los pacientes nos felicitan por cómo los tratamos, me hace sentirme orgulloso de trabajar a vuestro lado. Tenemos un estilo que me gusta, cuidamos a la gente, somos exigentes y cariñosos, somos una Escuela de Cirugía Torácica. Todos aportamos nuestro granito de arena, desde el jefe hasta el más junior.

Gracias a la gente de quirófano que me ayudó a recoger los mejillones y que me aguanta estoicamente, a la Xesca, Pili, Carme y Mariluz. Mariluz es como la sombra protectora en el quirófano, la mirada amable con la que comparto origen. Sin querer he hecho que odie los mejillones; sabed que volveremos a recogerlos... Gracias a toda la enfermería de planta que soporta mis manías. Gracias a los pacientes que permitieron estudiar sus muestras y sus casos.

Gracias al Dr. Morera y al Dr. Saumench por todas las cosas que me enseñásteis, aún me acuerdo de vosotros cuando pido un punto de Morera o cuando le digo a la Xesca que me pase aquel disector pequeño que le gustaba al Saumench...

Gracias a toda la gente del lab que me ha ayudado, al Marc Gallegos, a la María Martínez Iniesta y al Daniel Azuara, gracias por ayudar a este friky cirujano que aparecía por el lab en busca de consejo. Pero sobretodo, gracias a la Nadia y a la Gemmeta Aiza. Mirad, esta tesis no sería posible sin el gran trabajo que ha hecho la Gemma. Determinación a determinación, PCR a PCR, has hecho un gran trabajo. Detrás de cada número, detrás de cada gráfica hay muchísima faena hecha por ti, Gemma. Muchas muchas gracias por acogerme, de verdad, sois grandes personas y unas grandes profesionales, un gran gran porcentaje de esta tesis es vuestro y es un placer ir a veros al lab. Gracias a Ernest Nadal por todo el soporte científico, me ilusiona mucho ese proyecto que iniciaremos pronto, conjuntamente con nuestros compañeros.

Gracias Samy por aguantarme todas las mañanas en el coche, a este gruñón que últimamente ya no lo es tanto, hemos forjado nuestra amistad de camino al Hospital o a casa. Gracias al resto de compañeros de la Unidad Funcional de Pulmón y del Comité de Pulmón del Hospital General de l'Hospitalet i Moisés Broggi que han estudiado, estadificado y tratado también a los pacientes de esta tesis.

Gracias a Mar Varela y al equipo del Biobanc por proporcionarme las muestras necesarias. Gracias a Cristina Masuet, Marta Banqué, Daniel Cuadras y Christian Tebé por todo el soporte estadístico que durante estos años me habéis dado. Gracias a la SEPAR por la beca que ha sido el soporte económico para todo este estudio.

Gracias a Albert Violant por maquetar tan bien esta tesis.

Gracias a Maribel Miguel y a mi querida Julia, por acogerme tan bien en la Facultad. Gracias a toda la gente de la sala por hacer que me sienta tan a gusto cuando doy clases o cuando diseco.

Gracias Mercè por aquellos maravillosos ratos en la biblioteca y gracias Josep por todo, me habéis acompañado y formado como persona desde que era bien pequeño.

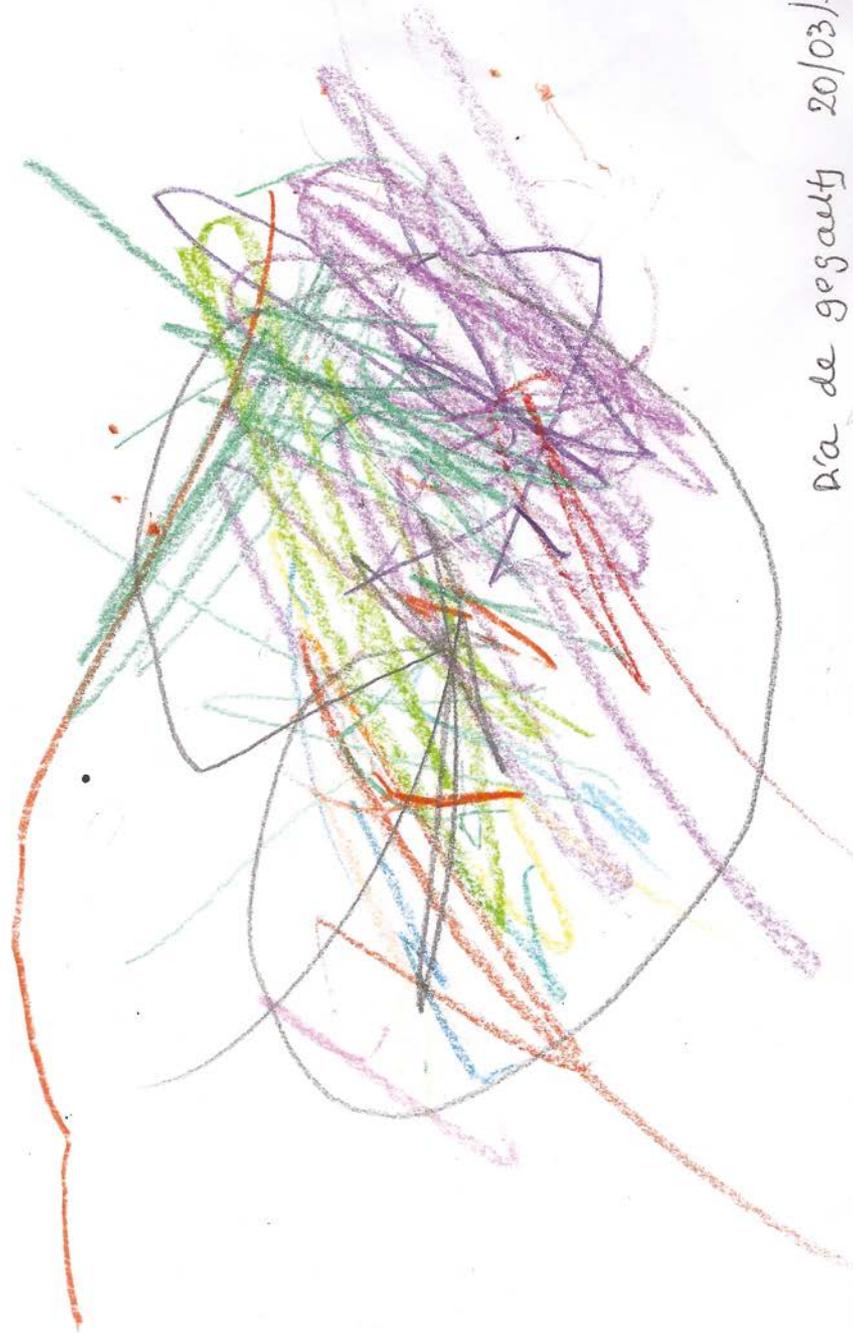
Gracias Sebas por ser mi amigo desde hace aproximadamente 33 años. Gracias por esas llamadas en el coche, preguntando por la tesis, permitiendo que me desahogara y ofreciendo medidas expeditivas para acabar con esta agonía. Sé que hemos tenido que vivir momentos muy duros en los últimos años, sólo espero haber estado a la altura de lo que os merecéis como mi segunda familia. Gracias Manu porque siempre te siento cerca. Gracias al Marc, al Dr. Ruger Prades, ojito, Premio del Claustro de Doctores, habéis llegado muy lejos, sois tan buenas personas, tan nobles, tanto, que soy muy feliz de compartir vuestra amistad, y sí... voy a ir a correr con vosotros, pero yo en bici, que si no me canso, a cambio de una "frugal" comida de aquéllas que nos gustan. Gracias Anna y Mõamí por vuestro cariño y por cuidar tan bien al Marc y al Ruger.

Gracias Heleni y Marti, por expandir mi mente cuando llegué a la Facultad, sois muy buenas amigas, gracias por hacerme pensar y gracias por todas aquellas reflexiones que tanto me gusta compartir con vosotras. Gracias Anna y al grupo de watsap de los doctorandos, por toda la info en momentos de estrés mental.

Finalmente, gracias a mi familia, a toda mi familia que está a mil kilómetros y que me quiere, pero sobretodo a mis padres y a la Cari. Gracias Cari, gracias, por ser tan cariñosa conmigo, por ser mi hermanita incondicional, gracias David por quererla. Gracias papas porque todo os lo debo, todo, todo. Habéis trabajado duro, humildes como sois, desde hace 40 años para conseguir que yo esté donde estoy, allí donde he querido. Gracias por los valores que cada día me enseñáis, el trabajo, la humildad, la honradez, la constancia, gracias por todo el amor incondicional que me dais. Sabed que me habéis dado, a parte del amor y los valores que es lo más importante, lo siguiente que más aprecio, una cultura. Sé de donde venimos.

Y por último, el agradecimiento más importante de esta tesis, gracias Bety por todo lo que me das y compartimos día a día, gracias Marc por quererme sin que lo sepas. Si alguien en este mundo sabe la magnitud de lo que tenéis entre manos esa es Beatriz. Gracias por aguantarme en todas mis imperfecciones, gracias por quererme, sois tan importantes para mi que no tengo palabras y sólo lágrimas para expresarlo. Disculpa, disculpadme tanto por el tiempo que no os he dedicado. Sabed que esto que tenéis entre manos es muy importante para mi, que todo el esfuerzo ha valido la pena porque las cosas deben hacerse bien. Os quiero muchísimo. He vuelto.

Pulmón



Art de gestalt 20/03/2016

Marc Macía

Índice

Artículo original que contribuye a la tesis	17
Bases teóricas	19
Embriología traqueal, bronquial y pulmonar	19
Primera a cuarta semana del desarrollo	19
Divertículo laringotraqueal o respiratorio	21
Embriología del árbol traqueobronquial	22
Biología molecular de la embriogénesis del árbol traqueal y bronquial	22
FGFR2	23
FRS2	25
SHP2	26
SHH	27
Vía intracelular mediada por FGFR2b	28
TGFB	30
Biología molecular de la ramificación bronquial	31
Maduración pulmonar	31
Etapa pseudoglandular	32
Etapa canalicular	32
Etapa de los sacos terminales	32
Etapa alveolar	33
Biología molecular de la embriogénesis y maduración pulmonar	34
SFTPC	34
SOX17	34
MYCN	35
CEA	36
Carcinoma pulmonar	38
Incidencia y mortalidad	38

Factores de riesgo	40
Susceptibilidad genética	41
Tipos histológicos	41
Adenocarcinoma	41
Hiperplasia adenomatosa atípica	42
Adenocarcinoma in situ	42
Adenocarcinoma mínimamente invasivo	43
Adenocarcinoma invasivo	43
Carcinoma escamoso	44
Carcinoma de célula grande	45
Tumores neuroendocrinos	45
Métodos diagnósticos y de estadificación	46
Estadificación	48
Sistema linfático de drenaje pulmonar y sistematización ganglionar	49
Nódulos linfáticos intrapulmonares	49
Nódulos linfáticos traqueobronquiales	50
Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores y posteriores	53
Sistematización ganglionar y rutas de drenaje linfático	54
Estadificación ganglionar	56
Algoritmos de estadificación ganglionar mediastínica	57
Estadificación ganglionar intraoperatoria	59
Micrometástasis y células tumorales aisladas	60
Tratamiento (6)	61
Estadios I y II	61
Estadio III	62
Estadio IV	63
Recidiva y supervivencia tras el tratamiento	64
Biología molecular del carcinoma pulmonar	66
Bases celulares y moleculares de la neoplasia	66
Características de la neoplasia	66
Tipos de genes	68
Oncogenes	68
Genes supresores de tumores	69
Genes estabilizadores	69
Epigenética	69
Marcadores moleculares en el carcinoma pulmonar	71
Driver oncogenes	72
EGFR	72
ALK	74
KRAS	75
ERBB2	75
ROS1	75
BRCA1	75
ERCC1	76
RRM1	76

PIK3CA	76
p53	76
Ki-67	77
Marcadores embrionarios	77
CEA	78
FGFR	80
FRS2	81
MYCN	81
SFTPC	82
SHH	84
SHP2	84
SOX17	86
Marcadores epigenéticos	88
Firmas genómicas	90
Firmas tumorales	90
Restadificación molecular ganglionar	94
Marcadores y firmas que restadifican molecularmente	94
KRT19	95
CEA-CEACAM5	95
MUC1	95
Firmas de genes	95
Marcadores metilados	96
Marcadores y firmas que no restadifican molecularmente	96
Mutaciones	96
Expresión	97
Metilación	97
Marcadores y firmas no evaluados pronósticamente	98
Premisas	103
Hipótesis de trabajo	104
Objetivos	105
Material y método	107
Poblaciones a estudio	107
Concordancia entre estadificación clínica y patológica	107
Estudio pronóstico tumoral y de restadificación ganglionar molecular	108
Aspectos éticos	110
Protocolos de estudio	110
Protocolo del estudio de concordancia	110
Estadificación clínica	110

Tratamiento quirúrgico	111
Estadificación patológica	111
Análisis estadístico	112
Protocolo del estudio pronóstico tumoral y de restadificación ganglionar molecular	112
Estudio pronóstico tumoral	113
Valores basales y patológicos	113
Protocolo de estadificación clínica	113
Tratamiento quirúrgico y estadificación patológica.	
Test de referencia.	113
Recogida de datos	114
Seguimiento de los pacientes	114
Estimación del tamaño muestral y potencia estadística	115
Procesamiento de las muestras	115
Grupos B y C	115
Grupo D	116
Pool de muestras de pulmón normal	116
Extracción de RNA	116
Extracción de DNA	116
Diseño de los <i>primers</i>	117
Transcripción inversa	118
Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)	119
Puesta a punto de los <i>primers</i>	120
Obtención de las concentraciones absolutas. Recta patrón.	121
Normalización de las concentraciones absolutas por los genes de referencia	121
Determinación del valor normal a través de un <i>pool</i> de muestras normales	122
Determinación de la concentración relativa	123
Determinación del punto de corte (<i>cutoff</i>) diagnóstico	123
Análisis estadístico	123
Estudio descriptivo	123
Análisis bivariantes y multivariantes	123
Tratamiento de los casos sin determinación, <i>missing</i> , y <i>outliers</i>	124
Estudio de restadificación ganglionar molecular	125
Valores basales y patológicos	125
Protocolo de estadificación, recogida de datos y seguimiento	125
Potencia estadística	126
Protocolo de procesamiento y procedimientos moleculares	126
Determinación del punto de corte (<i>cutoff</i>) diagnóstico	126
Concentración absoluta. Curvas ROC. Área bajo la curva.	126
Concentración relativa	127
Análisis estadístico	127

Resultados	129
Concordancia entre la estadificación clínica y la patológica	129
Estudio pronóstico tumoral	131
Diagrama de flujo	131
Descriptivo	132
Expresión tumoral	133
Selección de los marcadores tumorales	133
Expresión tumoral respecto el pulmón normal	135
Concentración absoluta	135
Concentración relativa	138
Expresión tumoral según histología	139
Análisis de correlación. Factores asociados a expresión molecular tumoral.	140
Factores asociados al tiempo libre de enfermedad y supervivencia global	142
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según la expresión tumoral de los marcadores	146
FGFR2b	147
SHH	147
SFTPC	148
SHP2	148
CEACAM5, FRS2, MYCN y SOX17	149
Combinación de marcadores.	
Firma genética embrionaria tumoral	149
Análisis multivariante	151
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según la expresión tumoral de los marcadores según histología	152
Restadificación molecular ganglionar	154
Diagrama de flujo	154
Expresión ganglionar basal	155
Resultados de las bases de datos de la literatura	155
Expresión ganglionar respecto el pulmón normal y el tumor	156
Restadificación molecular ganglionar	158
Descriptivo	159
Pacientes restadificados	160
Consideraciones del tiempo libre de enfermedad y supervivencia	161
Comparación de la expresión tumoral y ganglionar	163
Análisis de los pacientes pN2	163
Restadificación mediante la concentración absoluta normalizada	163

Discusión	165
Concordancia entre la estadificación clínica y la patológica	166
Análisis pronóstico de los marcadores embrionarios	169
SFTPC	169
FGFR2b	170
CEA, CEACAM5	172
SHH	172
SHP2	173
SOX17, MYCN y FRS2	173
Combinación de marcadores	173
Restadificación molecular ganglionar	174
Limitaciones	177
Líneas de investigación futuras	178
Conclusiones	181
Bibliografía	183
Resumen estructurado	206
Lista de tablas	209
Lista de figuras	213
Abreviaturas y acrónimos	217
Anexos	225
Anexo 1. Artículo	225
Anexo 2. Estadificación y mapa ganglionar	233
Anexo 3. Informe del Comitè Ètic d'Investigació Clínica	236
Anexo 4. Protocolos de recogida de datos	237
Anexo 5. Protocolos de extracción de RNA y DNA	240
Anexo 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	243
Anexo 7. Curvas de fusión de los marcadores	249
Anexo 8. Rectas patrón de los marcadores	252
Anexo 9. Datos de expresión de los pacientes del estudio tumoral	254
Anexo 10. Concentración absoluta tumoral según histología	267
Anexo 11. Análisis de correlación	268
Anexo 12. Análisis multivariante de correlación	273

Anexo 13. Análisis del tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según expresión tumoral de los marcadores en la serie global, según histología y según otras variables	277
Anexo 14. Modelos multivariantes con la combinación de marcadores y por histología	306
Anexo 15. Datos de expresión de los pacientes del estudio ganglionar	310
Anexo 16. Restadificación molecular ganglionar de los marcadores por separado	335

Artículo original que contribuye a la tesis

Quality study of a lung cancer committee: study of agreement between preoperative and pathological staging.

Macia I, Moya J, Escobar I, Ramos R, Masuet C, Gámez C, Llatjós R y Martínez-Ballarín I. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*. 2010; 37(3):540-545.

Posición en su área (Surgery): 47 de 187. Impact Factor: 2,293.

Bases teóricas

Embriología traqueal, bronquial y pulmonar

Primera a cuarta semana del desarrollo

El desarrollo del ser humano durante las épocas embrionaria y fetal se caracteriza por una rápida y constante replicación celular. Además, se produce una progresiva diferenciación desde células pluripotenciales hasta células altamente especializadas. A continuación se explica brevemente el desarrollo del embrión, centrándonos en el desarrollo de aquellos grupos celulares que derivarán en los órganos y tejidos del cuerpo humano; otros grupos celulares que forman los anejos (placenta, etc.) se desarrollan paralelamente.

El cigoto, resultado de la fecundación, se segmenta generando muchas células de menor tamaño que conforman la mórula a los tres días del desarrollo. El cuarto día del desarrollo se genera el blastocisto, con dos grupos celulares, una capa externa llamada trofoblasto y una masa celular interna que dará lugar al embrión, el embrioblasto. En la segunda semana del desarrollo, el embrioblasto se diferencia en dos grupos celulares, el epiblasto y el hipoblasto, que adoptan la forma de un disco; es el disco germinativo bilaminar.

A partir de la tercera semana del desarrollo, día 15, se produce la gastrulación. La gastrulación es el proceso formativo de las tres capas germinativas a partir del disco bilaminar, exactamente a partir del epiblasto. Cuando se inicia la gas-

trulación, en el epiblasto se forma un engrosamiento lineal de células, la estría primitiva. A partir de la estría primitiva, células del epiblasto se invaginan para generar primero el endodermo y luego también el mesoblasto-mesodermo. Las células epiblasticas que no se diferenciarán en mesodermo ni endodermo conformarán el ectodermo. Estas tres capas: ectodermo, mesodermo y endodermo, originarán todos los tejidos del cuerpo humano y constituyen en estos momentos el disco germinativo trilaminar como organización del embrión(1,2). En este proceso hay una transición entre las características de células epiteliales a características de células mesenquimales; es lo que en la carcinogénesis se denominará *transición epitelial-mesenquimal* (EMT). El mesodermo (específicamente el cordomesodermo) formará la notocorda, la estructura axial del embrión que servirá de guía en el crecimiento y pliegue del mismo. La notocorda estimulará el ectodermo para formar la placa neural, que originará el tubo neural y el sistema nervioso central.

En estos momentos, hay un intenso tráfico celular, hecho que también se repetirá en otros períodos del desarrollo. Se asume que estos intercambios celulares, entre capas y localizaciones, se realizan con total precisión, sin error. Pero estos reordenamientos celulares nos pueden llevar a pensar fácilmente que puede haber error, que células del endodermo podrían quedar atrapadas alrededor de mesodermo.

Los extremos laterales del disco embrionario crecen a mayor velocidad que el eje longitudinal y eso provoca que el embrión empiece a plegarse, es el proceso de la delimitación. El pliegue lateromedial forma un cilindro uniéndose los extremos del disco embrionario en la línea media anterior; así el embrión se recubre totalmente por ectodermo, salvo en el punto donde emergerá el cordón umbilical, y formará un cuerpo cerrado o tronco, con una cavidad única o cavidad celomática(3). No obstante, el eje longitudinal también crece, de manera que el pliegue craneocaudal de los extremos craneal y caudal en sentido ventral forma los pliegues cefálico y caudal del cilindro. Este movimiento arrastra y aumenta el volumen de la cavidad amniótica. El desarrollo del pliegue cefálico implicará el prosencéfalo, el mesencéfalo y el rombencéfalo así como la formación de los arcos branquiales y las bolsas faríngeas.

Todos estos movimientos mientras crece el embrión provocan que se constriña la región yuxtaembrionaria de la vesícula umbilical (o saco vitelino o lecitocelo secundario) y se incorpore al embrión un tubo recto de endodermo siguiendo el eje longitudinal del embrión y de la notocorda. Este tubo es el intestino primitivo y se comunica a través del canal vitelino (o conducto onfalomesentérico) con la saco/vesícula vitelina. El intestino primitivo se divide en tres regiones: el intestino primitivo anterior o faríngeo, el medio y el posterior(4).

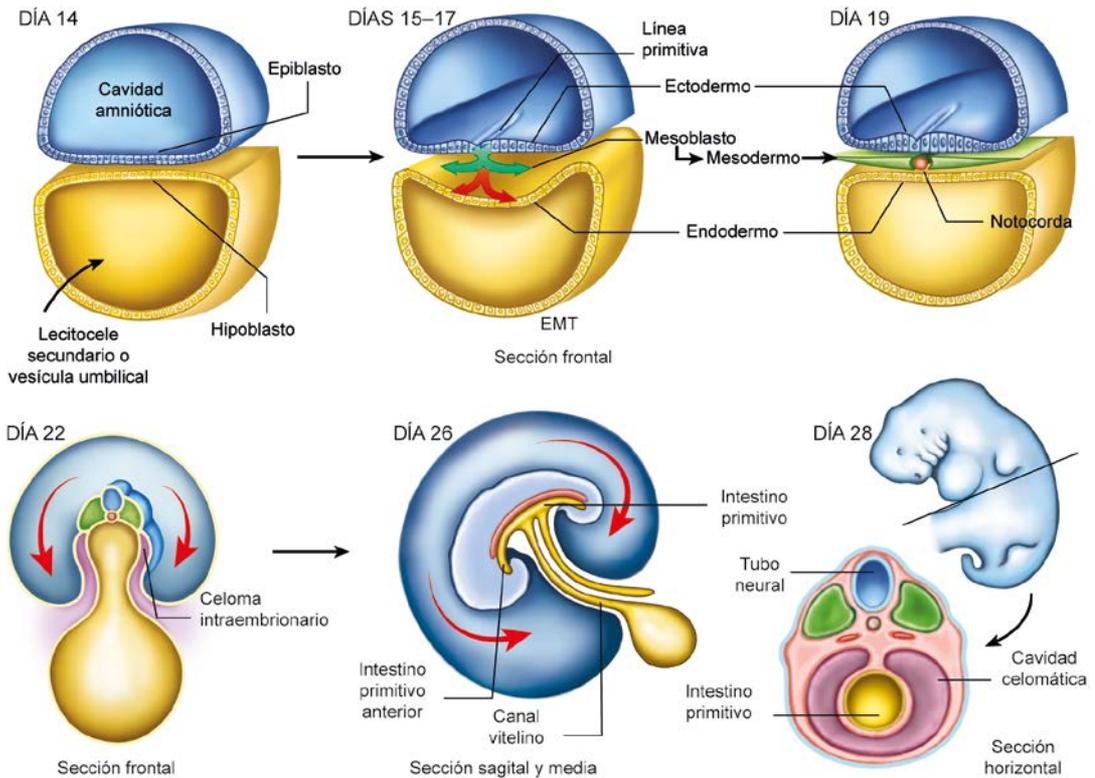


Figura 1. Desarrollo del embrión desde el disco germinativo bilaminar hasta el plegamiento que originará el tronco y englobará el futuro intestino primitivo en el embrión, pasando por la gastrulación.

Divertículo laringotraqueal o respiratorio

El desarrollo de la laringe, la tráquea, el árbol bronquial y los pulmones se inicia en la cuarta semana del desarrollo, alrededor del día 28, con la formación del surco laringotraqueal. Este surco se localiza caudal a las cuartas bolsas faríngeas, en la línea media ventral del intestino primitivo anterior (faringe primitiva), que está tapizado por endodermo. El surco laringotraqueal se evagina para formar, al final de la cuarta semana y principios de la quinta, una bolsa llamada divertículo respiratorio o laringotraqueal, situada ventralmente al intestino anterior primitivo. La diferenciación de las células endodérmicas del intestino anterior primitivo en células epiteliales de tipo respiratorio va asociada a moléculas como el factor de transcripción tiroideo 1 (*thyroid transcription factor 1*, **TTF-1**), factor nuclear de los hepatocitos β (*hepatocyte nuclear factor β* , **HNF3B**), **GATA6** (*GATA binding protein 6*), miembros de la familia de los dedos de zinc, receptores del ácido retinoico y genes del dominio *homeobox* (**HOX**)(5).

Este divertículo crece caudalmente, se reviste de mesénquima visceral y forma un tubo recto -tubo laringotraqueal- que termina en un fondo de saco en su extremo caudal, la yema respiratoria. Este tubo formará la tráquea y se separa

de la faringe, manteniendo comunicación con ella por su extremo craneal, el primordio de la entrada a la laringe. También se separa del esbozo del esófago mediante unos pliegues traqueo-esofágicos de mesodermo que se unen entre sí para formar el tabique traqueo-esofágico (quinta semana del desarrollo). El interior del divertículo y del tubo laringotraqueal está formado por endodermo y externamente estará rodeado por mesodermo(1,2).

Embriología del árbol traqueobronquial

El tubo laringotraqueal, a las 10 semanas, está diferenciado en epitelio, cartílago y tejido conjuntivo embrionario. A las 11 semanas, el endodermo ha originado además glándulas traqueales, mientras que el mesodermo ha originado los esbozos de los anillos cartilagosos y el músculo traqueal.

La yema respiratoria o pulmonar se divide en dos yemas, las yemas bronquiales primarias, que darán lugar a los bronquios principales. Éstas se alargan durante la quinta semana y protruyen lateralmente en la hoja de mesodermo esplácnico (esplacnopleura) de los conductos pericardioperitoneales derivados del celoma intraembrionario (primordios de las cavidades pleurales)(3). Posteriormente, los pliegues pleuroperitoneal y pleuropericárdico separan las futuras cavidades pleural, pericárdica y peritoneal(6). Las yemas bronquiales primarias se vuelven a dividir originando las yemas bronquiales secundarias, que darán los bronquios lobares o lobulares. Estas divisiones se irán sucediendo hasta 24 generaciones para originar todo el árbol bronquial. Durante la séptima semana se empiezan a formar los bronquios segmentarios y alrededor de ellos se dispone mesénquima con esplacnopleura alrededor; esto determinará los segmentos pulmonares. A las 24 semanas, se han producido 17 divisiones y han aparecido los bronquiolos respiratorios. El endodermo dará el epitelio y las glándulas y el mesodermo dará el cartílago, el músculo, el tejido conjuntivo, las arterias bronquiales y los capilares derivados de la arteria pulmonar y las venas pulmonares.

Biología molecular de la embriogénesis del árbol traqueal y bronquial

Este desarrollo traqueal y bronquial está determinado por una compleja interacción de proteínas a nivel de la yema pulmonar, entre endodermo y mesodermo. Las inducciones pueden ser más o menos específicas, reservando un papel fundamental a la respuesta de la célula respondedora. Además, muchas de estas

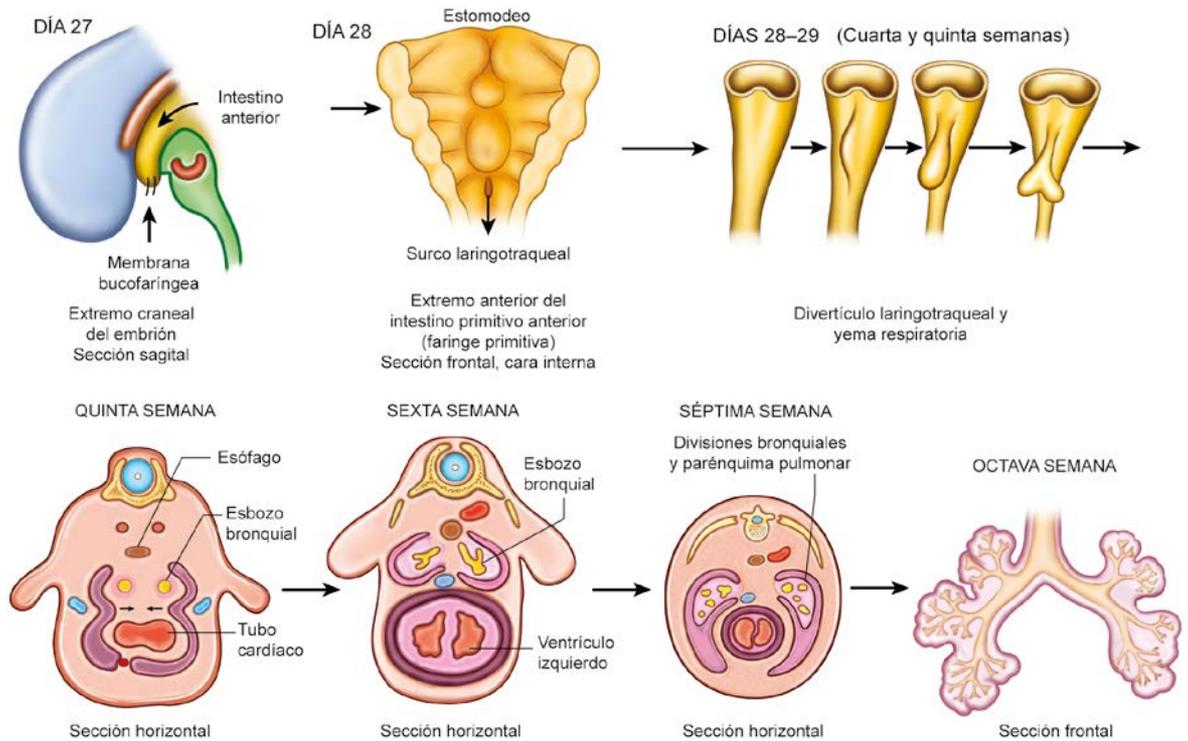


Figura 2. Desarrollo de la tráquea, árbol bronquial y parénquima pulmonar durante la época embrionaria.

interacciones/inducciones se producen de manera secuencial para asegurar un desarrollo equilibrado de estructuras complejas. La cercanía entre las células inductoras y respondedoras permite toda esta compleja diferenciación. Se han expuesto teorías que implicaban también la relación temporal como un factor clave en la interacción entre estructuras; sólo se podían producir determinadas interacciones durante un período determinado de tiempo. Los actuales hallazgos en relación a la transición epitelial-mesenquimal que se están presentando en la literatura ponen en duda esta presencia de ventanas temporales. En el adulto, estas vías están implicadas en el mantenimiento de las células madre, en las respuestas celulares a la lesión y en la carcinogénesis. A continuación exponemos los genes y proteínas que intervienen en las vías principales de la embriogénesis traqueobronquial.

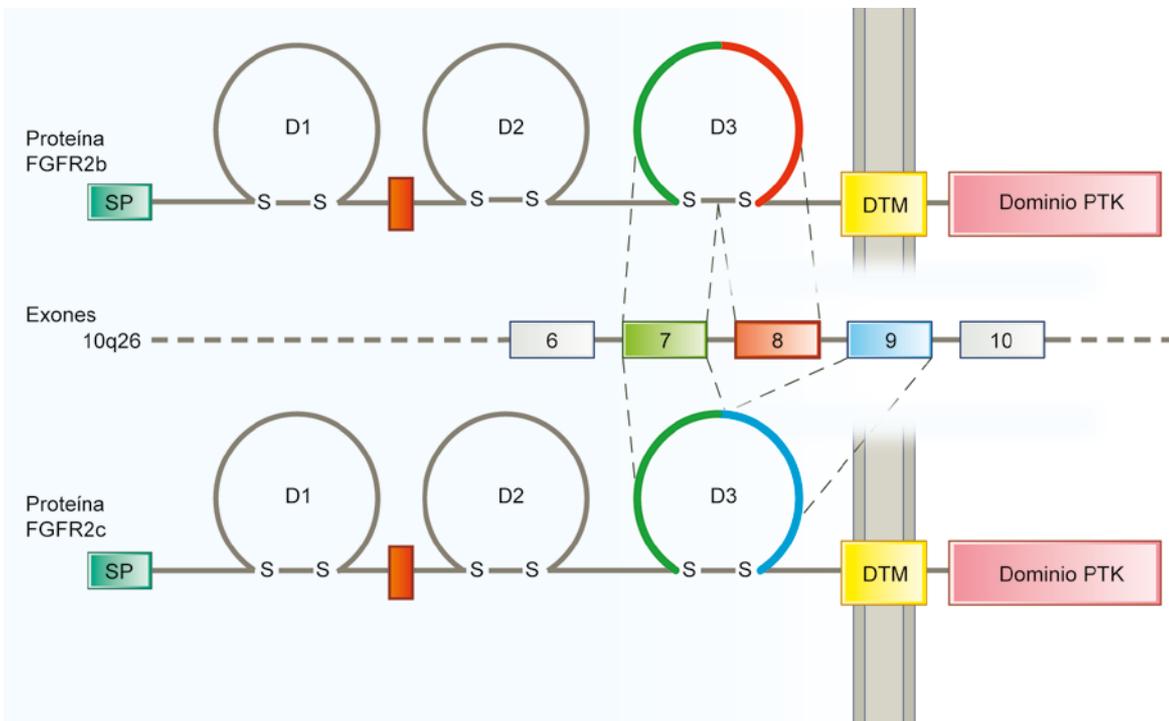
FGFR2, fibroblast growth factor receptor 2

La familia del FGFR son receptores de membrana celular de tipo tirosina-quinasa (RTKs), como el **EGFR** (*epidermal growth factor receptor*), el **MET** (*MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), el **AXL** (*AXL receptor tyrosine kinase*), el **IGFR1** (*insulin growth factor receptor 1*), el **ALK** (*anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*) o el **ROS** (*ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase*). Como todos los receptores tirosina-quinasa, los FGFR están formados por un dominio extracelular

que se une al ligando, un dominio único transmembrana y un dominio citoplasmático que incluye la región tirosina-quinasa y una serie de secuencias reguladoras. El dominio extracelular está formado por dos o tres regiones similares a inmunoglobulinas (*Ig-like domains*: D1, D2, D3). Existen cuatro tipos de FGFR: el **FGFR1**, **2**, **3** y **4**. A su vez, los FGFR1-3 presentan dos subtipos: b y c.

Figura 3. Esquema de la estructura de las proteínas transmembrana FGFR, con especial hincapié en la transcripción alternativa del gen de *FGFR2* para generar los subtipos de FGFR2b y FGFR2c. DTM: dominio transmembrana; PTK: *protein tyrosine kinase*.

El gen *FGFR2* se encuentra en el cromosoma 10, exactamente en la región 10q26 y está formado por 21 exones. Los subtipos b y c se forman como resultado de la transcripción (*splicing*) alternativa y mutuamente excluyente de dos exones. La mayoría de autores describen que la transcripción alternativa se produce entre los exones 8 ó 9. El exón 7 codifica la mitad N-terminal del dominio D3 (a), mientras que los exones 8 ó 9 codifican la mitad C-terminal D3 (b ó c), unos 50 aminoácidos. El exón 8 codifica la región "b", mientras que el exón 9 codifica la región "c"(7-10). Otros autores se posicionan a favor de la transcripción alternativo de los exones 9 y 10(11).



Esta diferencia en la transcripción es crucial, porque la isoforma **FGFR2b** (FGFR2-IIIb ó **KGFR**, *keratinocyte growth factor receptor*) se expresa en células epiteliales -endodermo embrionario-, mientras que la isoforma FGFR2c (FGFR2-IIIc o **BEK** -*fibroblast growth factor receptor, partial*) se codifica en células mesenquimales(8). Durante la embriogénesis, desde la gastrulación, se expresan los dos subtipos. No obstante, hasta el inicio de la organogénesis las diferencias eran más cuantitativas que de localización; la expresión de ambos subtipos se encuentra en similares localizaciones, aunque la FGFR2b es más intensa. En cambio, con el progreso de la organogénesis, FGFR2b y FGFR2c se

diferencian en su localización: el FGFR2b se encuentra sobretodo en el ectodermo de superficie y en el epitelio de los órganos, mientras que FGFR2c se encuentra en el mesénquima(7,11). Las circunstancias que condicionen una diferente concentración de factores de transcripción a favor de FGFR2b ó FGFR2c incidirán también en esta especificidad tisular.

Las proteínas **FGF** (*fibroblast growth factor*), los ligandos, estarán implicadas en este proceso de especificidad-diferenciación, además de implicarse en la proliferación y la migración celular. La interacción FGF-FGFR2b se expresa en el estómago del feto promoviendo el desarrollo del epitelio glandular, en la yema cecal para producir la invasión del epitelio en el mesénquima cecal, en el ectodermo de superficie para promover la formación y el crecimiento de las extremidades o en las neuronas vestibulares y pontinas, los axones de las cuales se dirigen a la capa granulosa de la sustancia gris del córtex cerebeloso atraídos por el **FGF22** (*fibroblast growth factor 22*) producido por las células granulosas, para producir la sinapsis. En la mayoría de órganos y tejidos donde FGFR2b interviene en la morfogénesis, éste se une con **FGF10** (*fibroblast growth factor 10*), producido en el mesodermo. El receptor FGFR2b no sólo se une con la proteína FGF10, si no también con FGF1, 3, 7 y 22. De hecho, la interacción FGFR2b-FGF7 está implicada en la vía del *wound healing* y la reparación de la mucosa de los tejidos adultos.

Algunas células progenitoras secretoras de FGF10 persisten tras el nacimiento y en el adulto, mientras que el FGFR2b se expresa en el epitelio gastrointestinal, en el epitelio glandular mamario, en el urotelio y en los queratinocitos de la epidermis(11).

FRS2, fibroblast growth factor receptor substrate 2

FRS2 es una proteína de 508 aminoácidos implicada en las cascadas de FGFR, **NGFR** (*nerve growth factor receptor*), **PDGFR** (*platelet-derived growth factor receptor*), **BDNFR** (*brain-derived neurotrophic factor receptor*), **GDNFR** (*glial derived neurotrophic factor receptor*) o **VEGFR** (*vascular endothelial growth factor receptor*), cuyo gen se encuentra en el cromosoma 12q15(12). FRS2 presenta en el extremo N-terminal una secuencia miristilada que será importante para el anclado de la proteína a la membrana y un dominio de unión fosfotirosina (**PTB**, *phosphotyrosine binding domain*)(13) al cual se unen determinados péptidos de ciertos receptores tirosina quinasa con o sin residuos tirosina fosforilados(14). En el extremo C-terminal, se aprecian varias regiones para la fosforilación de tirosinas, 4 lugares de unión de la proteína reguladora **GRB2** (*growth factor receptor bound protein 2*) y 2 de la tirosina fosfatasa **SHP2** (*Shatterproof 2; PTPN11: protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*).

En nuestro caso, FRS2 inactivo se encuentra anclado en la membrana celular y unido al FGFR como proteína de acoplamiento. La unión del ligando (FGF) al

receptor (FGFR2b) y su posterior dimerización provocan la fosforilación de tirosinas de FRS2 y la aparición de los 6 sitios de unión de FRS2(15). La fosforilación de FRS2 atrae a GRB2 y también a **SOS** (*son of sevenless*) y activa fundamentalmente 3 cascadas intracelulares: **RAS** (*rat sarcoma viral oncogene homolog*)/**MAPK** (*mitogen activated protein kinases*), **PIK3** (*phosphoinositide 3-kinase*)/**AKT** (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) y la cascada de **SRC** (*SRC proto-oncogene non receptor tyrosine kinase*). FRS2 también modula la vía MAPK-**ERK** (*mitogen-activated protein kinase 1*) y PIK3/AKT a través de SHP2.

Dado que realiza una acción clave en la vía del FGFR, puede integrar señales activadoras o inhibitoras de otras proteínas reguladoras (**SPRY2** - *sprouty 2*-, **CBL** -*casitas B-lineage proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase*-) o proteínas de la misma vía activada (MAPK), fosforilando FRS2 en residuos treonina. Se ha evidenciado además que FRS2 participa activando otras vías intracelulares una vez activada, de manera que se establece una red activadora intracelular e incluso inhibitora entre las diversas vías, implicando, por ejemplo la vía del EGFR.

FRS2 se encuentra abundantemente en el pulmón, cerebro, riñón, ovario y testículos(13). Presenta un rol importante en la embriogénesis; los ratones *FRS2 knock-out* no progresan en su desarrollo debido a problemas en la gastrulación (12,14). Otras mutaciones provocan malformaciones cardíacas en los ventrículos (15), alteraciones en la inervación y del cuerpo carotideo, de los ganglios simpáticos, del ojo o del córtex cerebral, donde presenta una función preservadora de progenitores neurales y de neurogénesis. En los derivados del endodermo, también se aprecian malformaciones tiroideas, paratiroideas o del timo(16).

SHP2, shatterproof 2 (PTPN11, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11).

Shatterproof 2 (SHP2), también llamada *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11* (PTPN11), codificada por el gen *PTPN11*, es una tirosina fosfatasa (**PTPs**, *protein tyrosine phosphatases*) implicada en la regulación de receptores tipo tirosina quinasa y de matriz extracelular.

Las tirosinas fosfatasas tradicionalmente se han descrito como reguladores negativos de las acciones activadoras de la cascada de las tirosinas quinasas. Dentro de las tirosinas fosfatasas se puede destacar **PTEN** (*phosphatase and tensin homolog*), uno de los genes supresores de tumores más frecuentemente mutados en las neoplasias. No obstante, otras PTPs se han evidenciado activadoras de señal, cooperando con las **PTKs** (*protein tyrosine kinases*) propagando o prolongando la señal activadora, potenciando la proliferación celular y regulando la supervivencia celular(17) a través de la fosforilación de residuos tirosina.

La proteína SHP2 está formada por dos dominios SH2 (*SRC homology 2*) N-terminales, un dominio catalítico PTP, un dominio C-terminal con lugares de fosforilación de tirosinas y un motivo rico en prolina(18,19). En reposo, el dominio N-SH2 está acoplado al dominio PTP, autoinhibiendo la actividad del mismo. La unión con la región BTAM (*bisphosphoryl tyrosine-based activation motif*) de **GAB1** (*GRB2-associated binding protein 1*) o con proteínas acopladoras a los dominios SH2 cambia la conformación a una abierta y activa. En un segundo paso, PTKs fosforilan los residuos Y62 y Y63 de SHP2, que ayudan a estabilizar la conformación activa. Por tanto, la fosforilación de Y62 y Y63 se podría usar como marcador de activación de SHP2(17).

La proteína SHP2 es necesaria para la activación completa de la cascada RAS-ERK (MAPK1). Según el receptor o el tipo celular, SHP2 activa o inhibe la activación de PI3K-AKT, la actividad **RHOD** (*RAS homolog family member D*), **NFKB** (*nuclear factor kappa B*), **NFAT** (*nuclear factor of activated T-cells*), **JAK** (*janus kinase*), **STAT3** [*signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)*] o **JNK** (*mitogen activated protein kinase 8, MAPK8*)(20). Esta variedad de acciones las realiza uniéndose a través de los dominios SH2 a los receptores de crecimiento **PGFR** (*platelet growth factor receptor*), **FRS** (*fibroblast growth factor receptor substrate*) y a proteínas **GAB** (*GRB2-associated binding protein*)(18).

En células madre, SHP2 se ha asociado a diferenciación en las tres líneas celulares y a proliferación. Por otra parte, se ha asociado a una disminución de la capacidad de autorenovación de la célula(21), que se realiza sin la participación de STAT3. En estas células madre, SHP2 también regula **BMP4** (*bone morphogenetic protein 4*) y, en consecuencia, proteínas **SMAD** [*mothers against DPP homolog (Drosophila)*]. El balance entre las señales a favor y en contra de proliferación, autorenovación y diferenciación celular, coordinadas o moduladas por SHP2, contribuye al cambio entre células pluripotenciales y células diferenciadas.

SHP2 está implicado en el Síndrome de Noonan (defectos cardiovasculares, craneofaciales o neurocognitivos y talla baja), Síndrome LEOPARD (Lentiginoso, anomalías en el Electrocardiograma, hipertelorismo Ocular, estenosis Pulmonar, Alteraciones genitales y *Deafness* -sordera-), su baja expresión se asocia a retraso en el crecimiento y está implicada en el desarrollo renal y de las gónadas.

SHP2 juega, por tanto, un papel importante en el crecimiento, en la transformación, la diferenciación y la migración celular(22,23).

SHH, sonic hedgehog

El endodermo también expresa el gen **SHH** (*sonic hedgehog*), localizado en el cromosoma 7q36. **SHH** es un morfogen, un gen que codifica para una proteína que emigra extracelular a través de la proteína transmembrana *dispatched* (**DISP**) y que difunde para generar un gradiente de concentración; dependen-

do de su concentración presenta uno u otro efecto en las células. SHH tiene dos formas, una N-SHH que es un mediador de vías intracelulares y C-SHH, que presenta actividad proteasa.

SHH se une a **PTCH1** (*patched 1*) y **PTCH2** (*patched 2*), unos homólogos de receptor transmembrana que se encuentran en el endodermo o en el mesodermo según el momento del desarrollo, los cuales en estado inactivo reprimen un receptor acoplado a proteína G, **SMO** (*smoothed, frizzled class receptor*). La unión de SHH-PTCH provoca la activación de SMO, lo cual provoca la entrada de **Ci** (*cubitus interruptus*) y **GLI** (*glioma associated oncogene family zinc finger 1*) al núcleo y su actuación como activadores transcripcionales. En condiciones basales GLI está unido a los microtúbulos con un complejo formado por **Fu** (*fused*) y **SuFu** (*supressor of fused*). **GLI1** (*GLI family zinc finger 1*) activado es un activador de la transcripción, mientras que **GLI2-3** (*GLI family zinc finger 2 and 3*) son activadores y represores de la transcripción. SHH regula positivamente la expresión de GLI1 y reprime la de GLI3. La disponibilidad de SHH para el órgano diana dependerá de la expresión de la **HIP** (*hedgehog interacting protein*), que se encuentra en la superficie de la célula sensible a SHH(24-26).

SHH presenta un papel modulador del FGF10, inhibiendo la producción en el mesodermo, en consecuencia inhibiendo la producción de células mesenquimales y endoteliales. La inhibición selectiva en determinadas zonas de los esbozos bronquiales permite modelar el patrón espacial del árbol traqueobronquial. No obstante, SHH también fomenta el crecimiento celular en el endodermo bronquial (24,27,28) y del mesodermo esplácnico, además de mantener y expandir las células progenitoras durante el desarrollo.

Además de participar ampliamente en el desarrollo pulmonar, SHH también participa en la formación del tubo neural, de la glándula suprarrenal, del esqueleto axial y las extremidades y en el intestino primitivo(29,30).

Vía intracelular mediada por FGFR2b

La autofosforilación de aminoácidos tirosina de proteínas o receptores como FGFR o EGFR es el inicio de una cascada intracelular muy importante y un mecanismo habitual en la génesis y el desarrollo de la neoplasia. En la embriogénesis, la unión FGFR2b-FGF10 promueve el desarrollo broncopulmonar.

La unión con pares de FGF, sobretodo con FGF10 y FGF7, provoca la dimerización del receptor FGFR y la autofosforilación de los residuos tirosina intracelulares. Este dímero fosforilado fosforila a su vez a FRS2 y **FRS3** (*fibroblast growth factor receptor substrate 3*); FRS3 también se une a la porción intracelular yuxtamembrana del FGFR. Este complejo atrae GRB2, flotilina-1 y SHP2 para la fosforilación de BTAM-GAB1 y la activación de tres cascadas. Por una parte, se unen a SOS y continúan la cascada RAS/MAPK estimulando la prolifera-

ración del endodermo y la quimiotaxis hacia la fuente de FGF, en nuestro caso FGF10, por otra parte la cascada de PI3K/AKT, promoviendo la supervivencia celular, y finalmente la cascada de SRC.

En cuanto a la cascada RAS/MAPK, la unión FGFR2b-FRS2/3-GRB2-SOS, transforman la guanosina difosfato (**GDP**) de RAS en guanosina trifosfato (**GTP**) y la activan. RAS se combina con **RAF** (*proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*) y esta última activa **MAP3K** (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) que activa **MAP2K1 y 2 (MEK1 y 2: mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2)**, las cuales activan **MAPK3 (ERK1: mitogen-activated protein kinase 3) y MAPK1 (ERK2: mitogen-activated protein kinase 1)** y su translocación al núcleo, induciendo la expresión de **ZEB1** (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) y controlando la transcripción de **C-MYC** (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog c*). ERK además fosforila otros reguladores citoplasmáticos y nucleares implicados en el crecimiento, supervivencia, diferenciación, motilidad y en la angiogénesis, tanto en el embrión, como en el feto y en el adulto (31).

En cuanto a la cascada PI3K-AKT, existen 8 enzimas PI3K en los mamíferos, agrupados en 3 clases. PI3K produce **PIP₃** (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) y activa AKT y **MTOR2** (*mechanistic target of rapamicin 2*). AKT inhibe **TSC** (*tuberous sclerosis complex*) que a su vez inhibía **MTOR1** (*mechanistic target of rapamicin 1*), activando MTOR1. El resultado es la activación de varias proteínas, como **MDM2** (*MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase*), **CREB** (*cAMP responsive element binding protein*), que están implicadas en el control del ciclo celular, la resistencia a la apoptosis y la proliferación celular(32).

Por otra parte, el FGFR1, 2b, 3, 4 autofosforilado atrae **PLCG1** (*phospholipase C, gamma 1*), que activa **PAP2** [*MYB binding protein (P160) 1a*], **DAG1** (*distriglycan 1, dystrophin associated glycoprotein*) e **IP3** (*inositol 1,4,5-trisphosphate*). DAG activa la cascada de **PRKC** (*protein kinase C*), mientras que IP3 induce la liberación del calcio del retículo endoplasmático para la activación de la cascada de la calmodulina-calcineurina-NFAT.

La vía del FGFR también interacciona con las vías de **MMTV** (*family with sequence similarity 89*) y **WNT** (*wingless-type MMTV integration site family*), NOTCH y SHH para mantener una correcta homeostasis en el desarrollo embrionario y fetal.

La activación del FGFR2b también produce la expresión de algunas proteínas de corte inhibitorio en el endodermo, como SPRY2, SHH o BMP4. SPRY2 interfiere en la cascada RAS/MAPK, inhibiendo el crecimiento y la migración del endodermo. Los productos de la expresión de SPRY2 también inhiben el crecimiento regulando FRS2 y SHP2. Finalmente, **TWIST1** (*twist family bHLH transcription factor 1*) se une a la región promotora de FGFR2 y regulan su expresión.

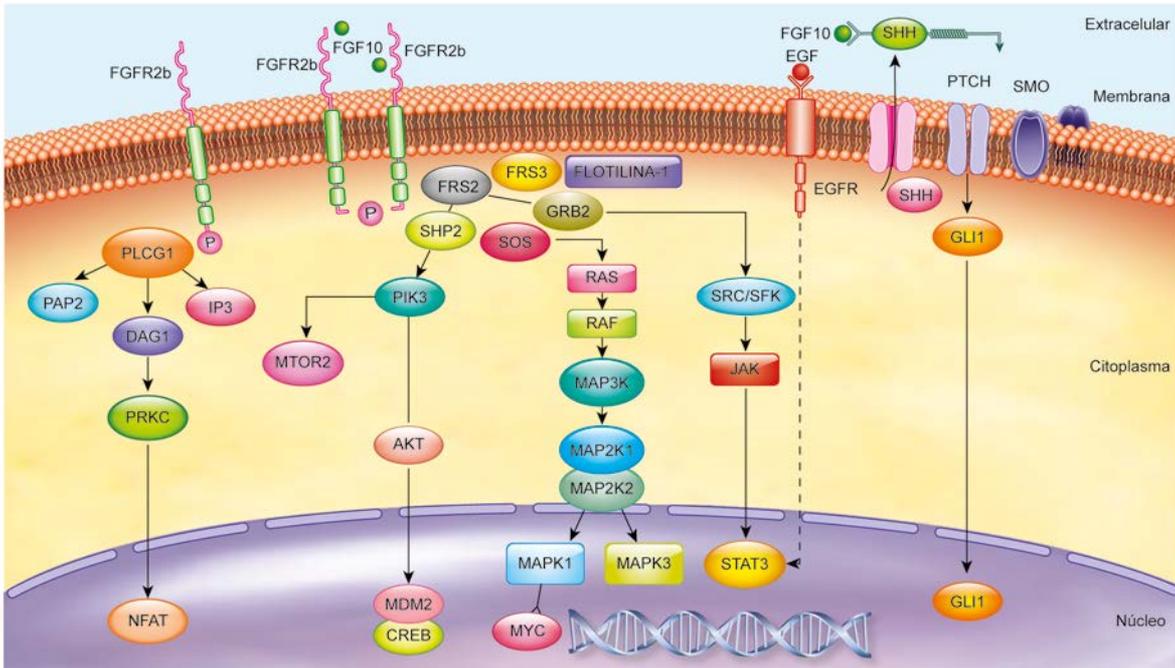


Figura 4. Diagrama de las interacciones moleculares en la yema pulmonar haciendo hincapié en la vía mediada por FGFR y los puntos en común con la vía del EGFR.

TGFB, transforming growth factor beta

La superfamilia de citoquinas de difusión extracelular **TGFB** (*transforming growth factor beta*) incluye unos 40 miembros, entre ellos las proteínas BMP, y están implicadas en la proliferación, diferenciación, producción de matriz extracelular, motilidad y supervivencia celular.

Las TGFB y las BMPs forman dímeros que se unen a receptores serina-treonina quinasa de tipo I y II, de manera que el receptor tipo II activa el tipo I fosforilándolo. El receptor tipo I activado fosforila proteínas **R-SMAD**, en el caso de TGFB: **SMAD2** (*SMAD family member 2*) y **SMAD3** (*SMAD family member 3*); en el caso de BMP: **SMAD1, 5 y 8** (*SMAD family member 1, 5 and 8*) y forman un complejo heteromérico con **SMAD4** (*SMAD family member 4*). Este complejo se transloca al núcleo e interacciona con el DNA (*deoxyribonucleic acid*) en regiones promotoras de genes, regulando su expresión. La regulación de este potente mecanismo/vía intracelular se consigue con la fosforilación y la ubiquitinización.

La superfamilia TGFB presenta tres miembros implicados en el desarrollo pulmonar: **TGFB1, 2 y 3** (*transforming growth factor, beta 1, 2 and 3*). El TGFB1 se expresa en el mesodermo e inhibe la expresión de FGF10. Esto es importante en la ramificación bronquial y en la génesis de la configuración espacial final de los bronquios y pulmones. Por otra parte, impide la formación de excesivas yemas bronquiales en el tallo bronquial ya formado. En cambio, TGFB2 se expresa en el epitelio distal de los pulmones y TGFB3 se expresa en el epitelio proximal,

mesénquima y pleura. El TGF β 3 tiene un papel destacado en la proliferación celular alveolar en los mecanismos de reparación frente a la agresión(1,27,28).

Las BMPs presentan un dominio N-terminal, un prodominio y un dominio de factor de crecimiento C-terminal. La vía intracelular asociada a BMPs se comparte con otros miembros TGF β s y es la presentada anteriormente. Destacar que cordina y nogina, regulan, por ejemplo, BMP4 y que otras rutas menos relevantes para BMP, pero también activadas, son ERK/MAPK, p38, JNK, WNT, NOTCH, calcio/calmodulina y JAK/**STAT** (*signal transducer and activator of transcription*)(33).

Inicialmente, las BMPs se identificaron asociadas a la habilidad para generar hueso en espacios fuera del esqueleto, pero actualmente se sabe que están implicadas en la proliferación, la diferenciación y la motilidad celular, sobre todo durante el desarrollo. Las BMPs están implicadas en la determinación de la asimetría corporal derecha-izquierda y en la organogénesis. La producción de BMP4 está estimulada durante la gastrulación, en el endodermo(33) y en el mesodermo. Esta ubicuidad confiere una doble acción activadora e inhibidora del crecimiento endodérmico(28).

Biología molecular de la ramificación bronquial

La ramificación bronquial se produce por la acción conjunta y antagónica de la estimulación FGF10 ~ FGFR2b y la inhibición de BMP4 y SHH. La inhibición del crecimiento endodérmico se acompaña de la proliferación mesenquimal y la producción de TGF β 1 por estas células, inhibiendo el FGF10 y facilitando la síntesis de moléculas de la matriz extracelular, como la fibronectina o los colágenos de tipo I, III y IV. Esta inhibición y depósito de moléculas de matriz extracelular estabiliza la punta y permite la proliferación del endodermo en las regiones laterales. Se generan dos nuevos centros de interacción de señales a cada lado del original, iniciándose un nuevo período de proliferación, y así sucesivamente. WNT también está implicado en este proceso. El proteoglicano sindecán y la proteína tenascina estabilizan las láminas epiteliales una vez formadas, mientras que la epimorfina le confiere polaridad a la célula epitelial(1,27,28).

Maduración pulmonar

La maduración pulmonar implica el desarrollo del parénquima pulmonar en cada uno de los segmentos pulmonares delimitados por los bronquios segmentarios. Incluye la formación de bronquiolos, bronquiolos terminales, que son el final de la porción conductora de las vías respiratorias(34), bronquiolos respiratorios,

conductos alveolares, sacos alveolares y alvéolos. Finalmente, también implica la configuración de la membrana alvéolocapilar, de los capilares y del sistema linfático pulmonar. Todo este proceso se divide en cuatro etapas: pseudoglandular, canalicular, de los sacos terminales y postnatal.

Etapa pseudoglandular

La etapa pseudoglandular se extiende desde la semana 6 a la 16 y se caracteriza por la formación de todos los elementos del parénquima pulmonar excepto las vías aéreas distales a los bronquiolos terminales, las que permiten el intercambio de gases. En estos momentos, los pulmones son similares a una glándula exocrina y las paredes de los bronquios están tapizadas por un epitelio cúbico.

Etapa canalicular

La etapa canalicular comprende las semanas 16 a la 26. En la semana 24 cada bronquiolo terminal ha generado como mínimo 2 bronquiolos respiratorios, los cuales a su vez se dividen en 3-6 conductos alveolares; al final de esta etapa se han generado algunos sacos terminales o alveolares y el feto podría respirar. Se desarrolla la vascularización pulmonar y el epitelio es plano formando las delgadas paredes de la vía aérea distal existente.

Los segmentos craneales maduran a mayor velocidad que los caudales, motivo por lo cual la etapa canalicular y pseudoglandular pueden coincidir.

Etapa de los sacos terminales

La etapa de los sacos terminales va desde la semana 26 hasta el parto. En este período se incrementa el número de sacos alveolares y las células endodérmicas de los sacos se aplanan y se diferencian en neumocitos tipo I y tipo II. Estos últimos empiezan a producir, en este período, el surfactante, mezcla de proteínas y fosfolípidos que incluye la **SFTPC** (*surfactant protein C*). También producen TTF-1. Se desarrolla la red de capilares y de vasos linfáticos.

Finalmente, en las últimas 4 semanas del período fetal, se empiezan a formar los alvéolos en los sacos alveolares y se consolida la íntima relación entre las células endodérmicas alveolares y las células endoteliales de los capilares, formando la membrana alvéolocapilar.

Etapa alveolar

La etapa alveolar empieza en la semana 32 y es una etapa donde se desarrollan completamente los alvéolos y aumenta de forma progresiva el volumen pulmonar. En la semana 32 existen unos sacos análogos a los alvéolos con una finas paredes de epitelio escamoso de manera que los capilares protruyen hacia la luz. Esto implica un gran adelgazamiento de la membrana alvéolocapilar y la posibilidad de intercambio gaseoso, permitido por el surfactante que mantiene abierta la luz alveolar. Con el desarrollo, estos sacos alveolares presentarán abombamientos desde la luz que serán los futuros alvéolos. Aproximadamente el 95% de los alvéolos maduros no se forman hasta después del parto, fruto no tanto del incremento del tamaño alveolar, si no del aumento del número de bronquiolos respiratorios y alvéolos que se produce a medida que el bebé y el niño crecen. Los alvéolos inmaduros son capaces de generar nuevos alvéolos primitivos por la invaginación de septos de tejido conjuntivo. El desarrollo alveolar queda cerrado a los 3 años pero se prolonga añadiendo poco a poco nuevas unidades hasta los 8 años. El recién nacido tiene unos 150 millones de alvéolos primitivos que se duplicarán hasta los 300 millones que encontramos a partir de los 8 años de edad.

Paralelamente, el sistema linfático de los pulmones y el corazón se esboza al final de la etapa embrionaria y se completa al principio de la edad fetal. Los plexos linfáticos paratraqueales aparecen a los 44 días de gestación (embrión de 13 mm de longitud craneocaudal) y poco más tarde aparecen los vasos linfáticos torácicos (embrión de 21 mm.). El tejido linfático aparece en embriones de entre 33,5 - 42 mm. A pesar de que el primordio de los ganglios subcarinales aparece en el embrión de 22 mm, los últimos elementos en originarse son los ganglios linfáticos, de forma que se aprecia tejido ganglionar linfático en embriones de 69 - 70,5 mm y están totalmente formados cuando el feto llega a los 92 mm. Los vasos linfáticos, el tejido linfático y los ganglios linfáticos aparecen al mismo tiempo a nivel subcarinal, alrededor del bronquio lobar superior derecho, en la ventana aortopulmonar y a nivel paratraqueal derecho (estos últimos para corazón y pulmón)(5).

Biología molecular de la embriogénesis y maduración pulmonar

SFTPC, surfactant protein C

SFTPC es una proteína cuyo gen se localiza en 8p21, se secreta por los neumocitos tipo II del alvéolo y presenta una gran capacidad hidrofóbica. SFTPC, por tanto, es propia del tejido pulmonar y es el marcador más específico de las células epiteliales respiratorias. Se sintetiza como una proproteína (**proSFTPC**, *precursor surfactant C*) de 197 aminoácidos. Se empieza a localizar en la etapa de los sacos terminales y se expresa mucho más a partir de la época alveolar.

Las apolipoproteínas **SFTPA** (*surfactant protein A*), **SFTPB** (*surfactant protein B*) y **SFTPD** (*surfactant protein D*) y otras proteínas plasmáticas acompañan a SFTPC para formar el 10% del surfactante; el 90% lo forman lípidos. El surfactante se almacena en lisosomas y se excreta a la superficie alveolar(35).

Los neumocitos tipo II son sensibles a la transformación oncogénica de **KRAS** (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*).

SOX17, SRY (sex determining region Y)-box 17

La familia de **SOX** [*SRY (sex determining region Y)-box*] está formada por más de 30 miembros y se expresa en varios tipos celulares y tejidos en varios momentos del desarrollo. **SOX7** [*SRY (sex determining region Y)-box 7*], **SOX17** y **SOX18** [*SRY (sex determining region Y)-box 18*] forman el grupo F dentro de la familia SOX dadas sus características genómicas y su secuencia de aminoácidos y son factores de transcripción. El gen **SOX17** se localiza en 8q11.23, la proteína se une a una secuencia específica del DNA y regula la transcripción de varios genes, entre ellos **FOXA1** y **2** (*forkhead box A1 and 2*).

SOX17 está implicada en el desarrollo de oligodendrocitos, el desarrollo vascular (36,37) o en la hematopoyesis. En relación con el desarrollo pulmonar, SOX17 es un factor de transcripción necesario para la formación del endodermo, se expresa en el endodermo pulmonar embrionario y en el epitelio pulmonar adulto. La expresión de SOX17 en las vías aéreas periféricas en el adulto puede conducir a la formación de grupos celulares que expresen características de la región proximal de las vías aéreas. Por otra parte, la expresión de SOX17

puede inhibir la diferenciación de los progenitores epiteliales en neumocitos tipo I y II y mantenerlos con unas características típicas del primer período del desarrollo pulmonar. Por tanto, SOX17 juega un papel importante en la diferenciación de las células epiteliales respiratorias(38).

Simultáneamente a la formación del árbol traqueobronquial, se inicia la formación de la vasculatura pulmonar en el mesodermo esplácnico, incluida la microvasculatura. En este desarrollo, SOX17 y **WNT7B** (*wingless-type MMTV integration site family, member 7B*) están muy implicados. La delección de SOX17 a nivel endotelial implica defectos en la formación vascular o en la diferenciación arterial.

MYCN, v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

La familia **MYC** (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) es un grupo de factores de transcripción asociados con **MAX** (*MYC associated factor X*) y se unen al DNA en regiones promotoras de los genes para regular positivamente o negativamente la expresión génica. Además, MYC puede silenciar epigenéticamente la transcripción de varios genes reclutando DNA metiltransferasas como **DNMT3A** [*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha*] que actúen versus **CDKN1A** (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), **DNMT3B** [*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta*] o **RASSF1A** (*Ras association domain family member 1A*). Hay tres oncogenes principales dentro de la familia de MYC: C-MYC, MYCN y **MYCL** (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene lung carcinoma derived homolog*).

MYCN es una proteína con una estructura de hélice-giro-hélice codificada por un gen localizado en 2p24.3. Se localiza en el núcleo, dimeriza con proteínas de estructura hélice-giro-hélice y regula la expresión génica, implicándose en el control del ciclo celular, el metabolismo (glicólisis), la transducción de señales o el mantenimiento de la pluripotencialidad. También está implicada en el reclutamiento de reguladores de tipo epigenético. Por otra parte, y aunque parezca sorprendente, MYCN es un potente apoptótico. MYCN y en general las proteínas MYC se encuentran tanto en el endodermo, como en el mesodermo y en el neuroectodermo. La expresión del gen MYCN en células progenitoras endodérmicas de la vía aérea distal, estaría implicado en la persistencia de la capacidad de crecimiento.

MYCN coopera con la survivina (**BIRC5**: *baculoviral IAP repeat containing 5*), una proteína ampliamente expresada en el período embrionario y fetal y en la carcinogénesis en líneas celulares de fibroblastos(39).

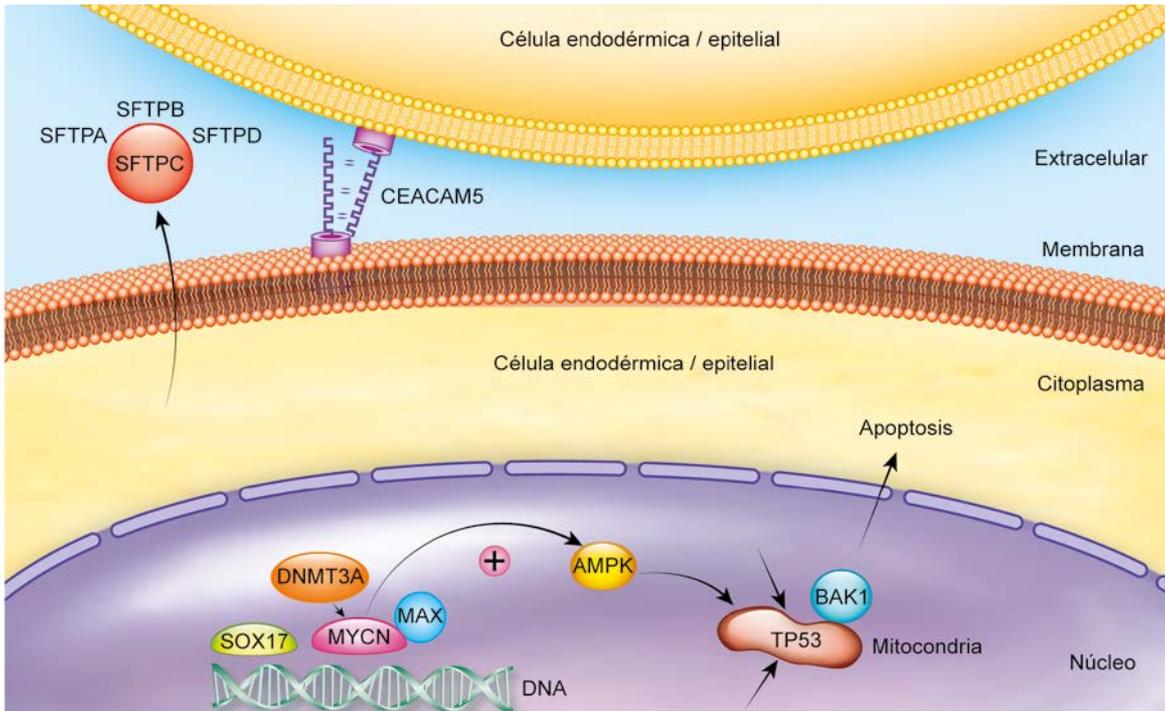


Figura 5. Acciones de moléculas implicadas en la maduración pulmonar. Nótese el papel de MYCN en la apoptosis.

CEA, carcinoembryonic antigen

La familia del CEA pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), la cual presenta una gran variedad de glicoproteínas altamente glicosiladas. La familia del CEA se divide en dos grandes grupos: las *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules* (**CEACAMs**) y las *pregnancy-specific glycoproteins* (**PSGs**). En humanos, la familia del CEA consta de 35 genes situados entre 19q13.2 y 19q13.4.

Las glicoproteínas CEA presentan un dominio similar a inmunoglobulinas variable (IgV) y varios dominios similares a Ig constantes (IgC). Algunas CEACAMs presentan también un dominio transmembrana o se anclan a la membrana a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Las que tienen dominio transmembrana también presentan un dominio citoplasmático con regiones de unión para la transducción de señales(40). **CEACAM5** (*carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5*) presenta 7 dominios similares a Ig extracelulares y un anclaje GPI.

Los genes *CEACAM* se expresan en varios tejidos, tanto en epitelio como en endotelio, en leucocitos y en células dendríticas. CEACAM5 se expresa abundantemente en el epitelio de superficie gastrointestinal, pero también en el pulmón(41). En cambio, las PSGs se expresan en el trofoblasto placentario.

En relación con la embriogénesis, las CEACAMs presentan un papel esencial, dado que conectan las células integrándolas y anclándolas en los órganos y tejidos. CEA no se relaciona directamente con la maduración pulmonar ni con la génesis del árbol traqueobronquial, pero sí está presente a nivel transversal en ambos momentos del desarrollo pulmonar.

Carcinoma pulmonar

La neoplasia de origen pulmonar y/o bronquial puede tener varios orígenes histológicos, desde las células epiteliales hasta el tejido linfoide. No obstante, usualmente el término cáncer de pulmón se reserva para un grupo de neoplasias de origen epitelial que acaparan más del 99% de los tumores malignos pulmonares(42); su origen se encuentra en las vías aéreas y de ahí que también se denomine en ocasiones carcinoma broncogénico.

El carcinoma broncogénico o pulmonar se dividió tradicionalmente en dos grupos: el carcinoma de pulmón de célula pequeña (CPCP) y el carcinoma de pulmón no célula pequeña (CPNCP), que a su vez incluye principalmente tres tipos histológicos: el adenocarcinoma, el carcinoma escamoso y el carcinoma indiferenciado de célula grande. La mayoría de pacientes tributarios de tratamiento radical por parte de los Servicios de Cirugía Torácica son los incluidos en el grupo de CPNCP.

Incidencia y mortalidad

El carcinoma broncogénico es de las neoplasias más frecuentes del mundo. Se estima que 1.608.055 casos fueron diagnosticados en el 2008 (globocan.iarc.fr/factsheet.asp). La incidencia está descendiendo en varones y se mantiene en mujeres. El cáncer de pulmón representa el 16,5% de los tumores en hombres y el 8,5% en mujeres en el mundo. En Europa, representa el 15,9% en hombres y el 7,4% en mujeres(43). En España, presentaba una tasa de incidencia de 52 casos por 100.000 hombres y 3 por 100.000 mujeres(44). En Catalunya presenta tasas estandarizadas ligeramente superiores; la proyección para 2015 preveía un tercer puesto en incidencia en ambos sexos. Nuestra área de influencia, el Àrea de Barcelona Metropolitana Sud (ABMS), presenta una población de 1.425.966 habitantes y unas tasas de incidencia similares. Estas tasas y población permitían estimar en nuestra área unos 732 casos de neoplasia de pulmón durante el 2008 y 802 para cada año del período 2010-2014. En relación con el resto de países europeos, Catalunya y España ocupan una posición intermedia en varones y baja en mujeres. Las curvas evolutivas en varones muestran una estabilización o un ligero descenso de incidencia para los próximos años, mientras que en el resto de Europa ya se inició el descenso. En mujeres, en cambio, se prevé una tendencia al alza. No obstante, en Catalunya se prevé para 2015 un aumento de incidencia en varones del 20,5% y en mujeres del 89,1%; en nuestra área, el aumento será del 14,5% en varones y 31,6% en mujeres. Los aumentos de incidencia y mortalidad dependerán del riesgo de padecer la enfermedad, de los cambios en la estructura poblacional y del aumento del tamaño poblacional(45,46).

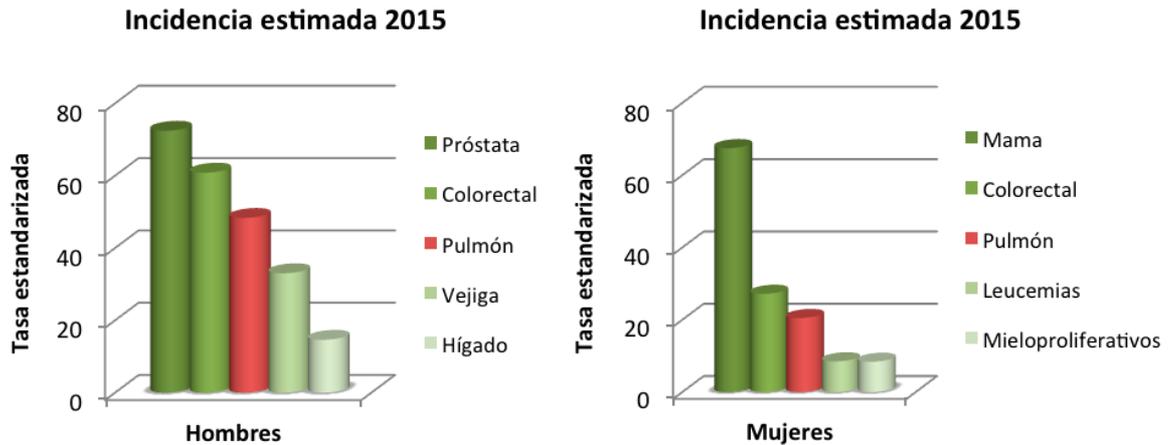


Figura 6. Estimación de las tasas de incidencia de las 5 neoplasias más incidentes, por sexo, en Catalunya para el año 2015. Datos sobre 100.000 personas y año. Tasa estandarizada por población mundial. Fuente: Generalitat de Catalunya, <http://cancer.gencat.cat>.

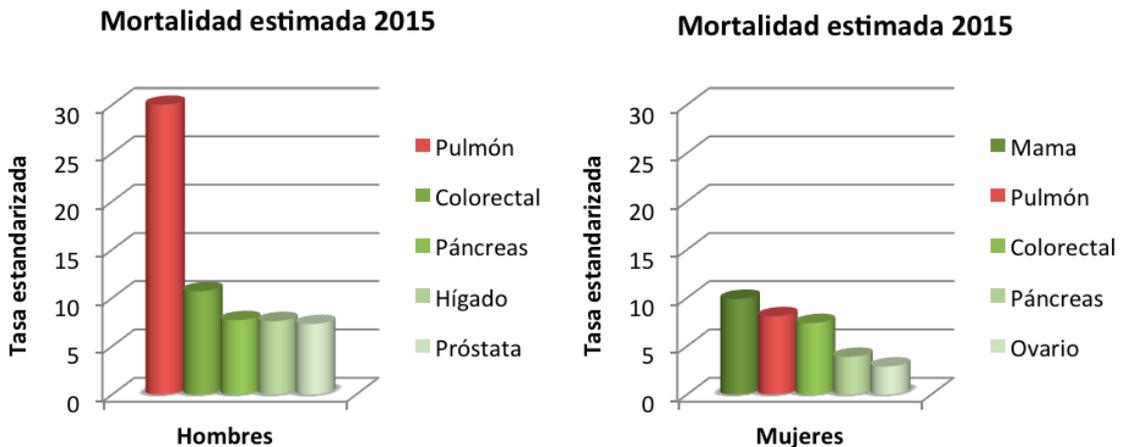


Figura 7. Estimación de las tasas de mortalidad de las 5 neoplasias más letales, por sexo, en Catalunya para el año 2015. Datos sobre 100.000 personas y año. Tasa estandarizada por población mundial. Fuente: Generalitat de Catalunya, <http://cancer.gencat.cat>.

En el año 2008, se estima que más de 1.376.579 pacientes murieron en el mundo debido a esta neoplasia, cifras que son sólo discretamente inferiores a su incidencia. En los Estados Unidos de América, en 2014, el cáncer de pulmón era la primera causa de muerte por neoplasia en varones (29%) y en mujeres (26%). En España, en 2005, la mortalidad fue de 16.645 varones y 2.470 mujeres, tasa estandarizada de 66 por 100.000 varones y 8 por 100.000 mujeres(47). En 2010, la tasa estandarizada fue de 67 por 100.000 varones y 11 por 100.000 mujeres, evidenciando la tendencia al alza en mujeres (OECD *Health Data* 2012; Eurostat *Statistics Database*). La neoplasia de pulmón, tanto en Catalunya como en España, es la primera causa de muerte por neoplasia en varones (27%) y probablemente representará en 2015 la segunda causa en mujeres (7%) (figura 7). En relación con la incidencia, presenta una elevada mortalidad y la tendencia es al aumento de número de defunciones. En Catalunya, para 2015, la mortalidad en varones habrá aumentado un 14% y en mujeres ascenderá un 67%.

Con todos los datos anteriores, podemos visualizar que la supervivencia del carcinoma broncogénico es mala, situándose entre las neoplasias de mayor letalidad(48). En el mundo, la prevalencia a los 5 años es del 5,8% para ambos sexos; en los hombres, es de 8,3% y en las mujeres es del 3,6%. Concretamente, en el Área de Barcelona Metropolitana Sud, presenta una supervivencia en los hombres del 9,2% a 5 años, mientras que en mujeres la supervivencia a 5 años es del 11,7%. Esta supervivencia es similar a la presentada en el Estado Español y es próxima o superior a la de Francia, Alemania, Finlandia o Reino Unido.

Factores de riesgo

El carcinoma broncogénico es una neoplasia asociada a varones, con una proporción 8,5:1. El tabaco es el factor de riesgo más asociado, presentando el antecedente de hábito tabáquico actual o pasado más del 90% de los pacientes varones y entre el 60-80% de las mujeres. Un fumador varón tiene un riesgo 20-25 veces superior de morir por cáncer de pulmón respecto al no fumador, una fumadora tiene un riesgo 10-12 veces superior al de una no fumadora. El riesgo de los pacientes no fumadores de tener cáncer de pulmón es similar al riesgo de tener un linfoma no Hodgkin e inferior al del cáncer de próstata(49,50). Dejar de fumar tiene un efecto de reducción progresiva del riesgo, pero nunca se llega al de un nunca fumador. El tabaquismo pasivo también se asocia a un aumento del riesgo de neoplasia pulmonar, con un riesgo relativo 1,3 veces superior. A pesar de todos los datos anteriores, sólo un 10-15% de los pacientes fumadores desarrollarán cáncer de pulmón.

Otros factores de riesgo asociados a la neoplasia de pulmón son el radón, las radiaciones ionizantes, los contaminantes ambientales-laborales (asbesto, arsénico, uranio, sílice o níquel), la polución en recintos cerrados (por ejemplo, la combustión de biomasa/carbón e incluso la exposición a las emisiones de cocinar aceite a alta temperatura), el nivel de arsénico en el agua consumida, determinadas enfermedades pulmonares crónicas como el EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), las neumopatías intersticiales, la tuberculosis, las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana o por el virus del papiloma humano(50). La polución ambiental se ha postulado como factor de riesgo, pero no hay datos concluyentes que permitan incluirla.

Así mismo, se han evidenciado factores hormonales, donde los estrógenos parecen tener un papel promotor de la proliferación celular en caso de neoplasia de pulmón. Siguiendo esta línea argumental, se ha evidenciado el género como factor de riesgo: las mujeres presentan peor supervivencia que los varones, a igual estadio patológico. La expresión de **CYP1A1** (*cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*) u otros genes promotores de la expresión ligados al cromosoma X(51) se han asociado a este hecho. Una dieta rica en frutas y vegetales, rica en antioxidantes y carotenos, es un factor protector frente al cáncer de pulmón(6).

Susceptibilidad genética

Varios estudios epidemiológicos evidencian un riesgo 2,5 veces superior de presentar una neoplasia de pulmón si existe historia familiar asociada. El análisis a gran escala basado en 52 familias ha identificado 6q23-25 como el principal locus autosómico de susceptibilidad para el cáncer de pulmón. El cromosoma 15 también se ha asociado a 3 genes que codifican para subunidades del receptor nicotínico de la acetilcolina, promoviendo el cambio celular con la unión de la nicotina. Una alteración constitutiva de los mecanismos de reparación de daño de DNA también confiere susceptibilidad genética a la neoplasia pulmonar si los factores exógenos se presentan(52).

Tipos histológicos

El CPNCP es más frecuente que el CPCP, con un 80% y 20% de los casos, respectivamente. El carcinoma escamoso sigue siendo el tipo histológico más frecuente en España, mientras que, por ejemplo, en Estados Unidos, Canadá y sudeste asiático lo es el adenocarcinoma. La serie quirúrgica del Hospital Universitario de Bellvitge pone de manifiesto que en nuestro medio el tipo histológico más frecuente de los pacientes intervenidos por carcinoma broncogénico es el adenocarcinoma, pasando del 36% de los casos en 2009 al 58% en 2012. Seguidamente, encontramos al carcinoma escamoso (29%) y en tercer lugar al carcinoma de célula grande y al carcinoma neuroendocrino de célula grande, con el 4% de los pacientes.

Adenocarcinoma

El adenocarcinoma es una neoplasia maligna con diferenciación glandular, producción de mucina o expresión de marcadores de neumocito por inmunohistoquímica. Se ha clasificado en varias categorías teniendo en cuenta criterios de anatomía patológica, clínicos, radiológicos e incluso moleculares (tabla 1)(53).

Las células neoplásicas se pueden presentar en los espacios alveolares de forma aislada o formando mórulas, acinos, pseudopapilas o papilas. Suele expresar por inmunohistoquímica TTF-1 -el mejor marcador de adenocarcinoma de pulmón-, napsina A, **KRT7** y **KRT20** (*keratin 7, type II* -citoqueratina 7- y *keratin 20, type I* -citoqueratina 20-), **AE1** y **3** [*solute carrier family 4 (anion exchanger) member 1 and 3*] o CEA.

Tradicionalmente se apreciaba por la TC (tomografía computadorizada) como un nódulo pequeño y periférico, pero el aumento de la casuística ha hecho que se presente en cualquier imagen radiológica (vidrio deslustrado, nódulo sólido, masa, etc.). El 15% presenta infiltración de pleura y de pared torácica. Son el

CPNCP que más frecuentemente metastatiza al encéfalo junto con el carcinoma indiferenciado de célula grande.

Tabla 1. Clasificación del adenocarcinoma. Basada en la Clasificación 2015 de la OMS de los tumores del pulmón, la pleura, el timo y el corazón (Travis WD, et al. J Thorac Oncol. 2015;10:1243-60) y en la clasificación de la IASLC, ATS y ERS. 1, IASLC: *International Association for the Study of Lung Cancer*; 2, ATS: *American Thoracic Society*; 3, ERS: *European Respiratory Society*.

Clasificación del adenocarcinoma según la OMS	
Clasificación de la IASLC ¹ /ATS ² /ERS ³ del adenocarcinoma pulmonar	
Lesiones preinvasivas	
Hiperplasia adenomatosa atípica	
Adenocarcinoma in situ (mucinoso, no mucinoso o mixto)	
Adenocarcinoma mínimamente invasivo (mucinoso, no mucinoso, mixto)	
Adenocarcinoma invasivo	
Lepídico	
Acinar	
Papilar	
Micropapilar	
Sólido	
Invasivo mucinoso (incluye el subtipo mixto mucinoso y no mucinoso)	
Coloide	
Fetal	
Entérico	

Respecto la biología molecular, destacar sobretudo el papel del *EGFR*; la mutación produce una activación continua favoreciendo el crecimiento celular. Estas pacientes suelen ser mujeres y no fumadoras y en estadios avanzados presentan buena respuesta al tratamiento con gefitinib o erlotinib. Otras alteraciones a destacar son la del **BRCA1** (*breast cancer 1, early onset*), **EML4** (*echinoderm microtubule associated protein like 4*)/*ALK* (los pacientes con esta translocación son jóvenes, varones y no o poco fumadores y se pueden tratar con crizotinib), **HER2** (*erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*), **PIK3CA** (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*), *KRAS* o **BRAF** (*B-Raf protooncogene, serine/threonine kinase*).

Hiperplasia adenomatosa atípica

La lesión preneoplásica príncips del adenocarcinoma es la hiperplasia adenomatosa atípica (HAA), que consiste en una proliferación localizada y pequeña de neumocitos tipo II y/o células de clara leve o moderadamente atípicas que envuelven las paredes alveolares. Entre 5-23% de los pacientes con adenocarcinoma presentan HAA asociada en el resto de parénquima resecaado. Suelen visualizarse en la TC como lesiones en vidrio deslustrado de <5 mm. No precisan de tratamiento per se, pero sí de seguimiento porque pueden evolucionar a adenocarcinoma.

Adenocarcinoma in situ

El siguiente paso en la escala del adenocarcinoma es el adenocarcinoma in situ (AIS), también considerado lesión preneoplásica. Es un adenocarcinoma de ≤30 mm con crecimiento de las células neoplásicas entre las estructuras alveolares (crecimiento lepídico), sin evidencia de invasión sanguínea, linfática, estromal

o pleural, sin patrón de adenocarcinoma invasivo, sin diseminación por los espacios aéreos, con células predominantemente no mucinosas, sin atipia celular o como máximo discreta y con habituales engrosamientos septales con esclerosis o elastosis. Por TC se presentan como un vidrio deslustrado y pueden presentar componente sólido asociado. Tanto la HAA como el AIS presentan en ocasiones mutaciones en *KRAS* o *EGFR*.

Adenocarcinoma mínimamente invasivo

El adenocarcinoma mínimamente invasivo (AMI) es un adenocarcinoma ≤ 30 mm con un patrón de crecimiento predominantemente lepidico con ≤ 5 mm de invasión como máximo en cualquier punto. El componente invasivo incluye cualquier subtipo menos el lepidico y la infiltración del estroma miofibroblástico. Si se invaden los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos, la pleura o se invade/se disemina a través de los espacios aéreos o hay necrosis, entonces no es un AMI. Suele presentarse como un nódulo mixto sólido y en vidrio deslustrado. Presentan una supervivencia libre de enfermedad cercana al 100%.

Adenocarcinoma invasivo

El adenocarcinoma invasivo recibe el apellido de la variedad histológica predominante (sobre todo en los casos lepidico, acinar, papilar, micropapilar o sólido con producción de mucina), aunque más del 90% suelen presentar varios componentes combinados. Representan entre 70-90% de los adenocarcinomas resecaados.

Subtipo histológico	Alteraciones moleculares	Presentación radiológica
Adenocarcinoma in situ no mucinoso Adenocarcinoma mínimamente invasivo no mucinoso	EGFR en no fumador (10-30%)	Vidrio deslustrado
Lepidico	EGFR (10-50%)	Nódulo sólido y vidrio deslustrado Vidrio deslustrado Nódulo sólido
Papilar	EGFR (10-50%) p53 (30%)	Nódulo sólido
Acinar	KRAS en fumador (20%)	Nódulo sólido
Micropapilar	KRAS (33%) EGFR (20%)	Sin predominancia
Sólido	EGFR (10-50%) KRAS en fumador (10-30%) EML4/ALK >5%	Nódulo sólido
Invasivo mucinoso	KRAS (80-100%) TTF-1 (0-33%)	Consolidación

Tabla 2. Alteraciones moleculares y presentación radiológica frecuente de los subtipos de adenocarcinoma.

Carcinoma escamoso

Las lesiones preneoplásicas del carcinoma escamoso son la displasia escamosa y el carcinoma escamoso in situ (CIS). La displasia escamosa es un término histológico que se utiliza para describir aquellas células, en nuestro caso epiteliales, que presentan algunos signos citológicos de neoplasia: un índice aumentado de división celular y una maduración celular incompleta. Además, presentan alteraciones de las relaciones espaciales entre células. Existen tres grados de displasia: leve, moderada y severa. El carcinoma in situ representa un paso más hacia la neoplasia. Presentan pleomorfismo celular y aumento de actividad mitótica, pero sin invasión de la lámina propia o de la membrana basal del epitelio.

Estas lesiones suelen aparecer como focos múltiples en el árbol traqueobronquial, preferentemente en las bifurcaciones de los bronquios segmentarios y con aspecto de leucoplasia o eritema. Aunque la broncoscopia con luz blanca puede detectar estas lesiones, la broncoscopia con autofluorescencia es especialmente útil en estos casos.

La displasia no requiere de tratamiento pero sí de seguimiento. El carcinoma in situ se trata de forma local con láser o braquiterapia. La tasa de progresión a carcinoma invasivo son del 0-9% en la displasia moderada, 0-32% en la severa y 20-60% para el CIS. El tratamiento completo asegura supervivencias del 100%.

El carcinoma escamoso es un tumor de células epiteliales que presenta queratinización y/o puentes intercelulares o expresión por inmunohistoquímica de marcadores de diferenciación escamosa; nace del epitelio bronquial y alveolar. El crecimiento acostumbra a ser polipoide, con expansión intraepitelial, pero también con invasión subepitelial, de la pared bronquial y del tejido peribronquial. Los carcinomas escamosos suelen ser tumores localmente agresivos, centrales y en estos casos acostumbran a afectar a las adenopatías intrapulmonares e hiliares y provocar colapso pulmonar. En cambio, los tumores <2 cm y periféricos presentan menos frecuentemente que el adenocarcinoma metástasis a los ganglios intrapulmonares o hiliares. Es por ello que, en estos tumores en concreto, se puede realizar una linfadenectomía lóbulo específica. Pueden presentarse como tumoración cavitada. Los tumores del ápex pulmonar que pueden invadir costilla, vértebra, vasos subclavios, ramas nerviosas C8 y/o T1 del plexo braquial, rama T2 o afectación del simpático cervical, suelen ser carcinomas escamosos. Si están bien o moderadamente diferenciados, presentan menos tendencia a la metástasis a distancia. Expresan por inmunohistoquímica queratinas de alto peso molecular, **KRT5** (*keratin 5, type II*) y **CK6** (citoqueratina 6), **34B12**, **p63**, **p40** y CEA. No presentan TTF1 ni napsina A(54). Aunque inicialmente no se conocían muchas alteraciones moleculares relacionadas con el carcinoma escamoso, en los últimos años han aumentado de forma considerable los estudios al respecto.

Subtipos de carcinoma escamoso
Lesiones preinvasivas
Displasia escamosa
Carcinoma in situ
Queratinizante
No queratinizante
Carcinoma basaloide

Tabla 3. Subtipos histológicos de carcinoma escamoso.

Gen	Prevalencia
Amplificación de <i>FGFR1</i> ¹	20%
Mutación de <i>PTEN</i>	10%
Mutación de <i>NFE2L2</i> ²	9%
Amplificación de <i>SOX2</i> ³	8%
Mutación de <i>AKT1</i>	6%
Mutación de <i>DDR2</i> ⁴	4%
Mutación de <i>PIK3CA</i>	4%
Mutación de <i>EGFR</i>	1-15%
Mutación de <i>KRAS</i>	1-9%

Tabla 4. Alteraciones moleculares relevantes del carcinoma escamoso. 1, *FGFR1*: fibroblast growth factor receptor 1; 2, *NFE2L2*: nuclear factor, erythroid 2-like 2; 3, *SOX2*: *SRY* (sex determining region Y)-box 2; 4, *DDR2*: discoidin domain receptor tyrosine kinase 2.

Carcinoma de célula grande

Los carcinomas de célula grande son tumores muy poco diferenciados que presentan hojas o nidos de células poligonales grandes (más grandes que los leucocitos), con núcleos grandes e hiper cromáticos, que no se pueden clasificar en otros tipos histológicos tras el análisis morfológico y por inmunohistoquímica. Así, la expresión focal de TTF-1/napsina A o la expresión difusa de p40/p63/KRT5/CK6 excluye el diagnóstico de carcinoma de célula grande. El carcinoma de célula grande representaba aproximadamente el 9% de los carcinomas, pero tras la nueva clasificación de la OMS, que añade criterios inmunohistoquímicos y reclasifica sus subtipos, probablemente la prevalencia será mucho menor. Suelen presentarse en las pruebas de imagen como una masa grande en la periferia pulmonar. Como sucede en el resto de tipos histológicos, el pronóstico dependerá fundamentalmente del estadio patológico, pero son tumores de mal pronóstico dentro de los CPNCP.

Tumores neuroendocrinos. Tumores carcinoides, carcinoma neuroendocrino de célula grande, carcinoma célula pequeña

Los tumores carcinoides son un tipo histológico particular de CPNCP, pues son carcinomas neuroendocrinos de bajo e intermedio grado derivados de las células de Kulchitsky o células K del sistema neuroendocrino difuso. Presentan características moleculares diferentes al resto de CPNCP y en nuestra serie quirúrgica representan un 4%. Suelen presentarse como masas endobronquiales de superficie lisa y muy vascularizada. Los tumores carcinoides presentan una buena supervivencia, aunque los pacientes con tumor carcinoide atípico presentan evolución intermedia entre los tumores carcinoides típicos (excelente supervivencia) y el resto de CPNCP.

El carcinoma neuroendocrino de célula grande es un tumor de alto grado que representa el 3-5% de los carcinomas, con un pronóstico habitualmente peor que los carcinomas escamosos o adenocarcinomas, aunque mejor que los CPCP. Finalmente, los carcinomas de célula pequeña son tumores epiteliales malignos de células pequeñas con poco citoplasma y bordes poco definidos, que muestran diferenciación a células neuroendocrinas con gránulos neurosecretorios y de alto grado. Suelen presentarse con importante afectación adenopática hiliar y mediastínica y pueden presentar síndromes paraneoplásicos. El 80% de los pacientes presentan estadio III-IV al diagnóstico y la evolución es mala (medianas de supervivencia de 8-9 meses). La supervivencia a los 5 años global es del 6,2%, aunque los estadios I y II pueden llegar al 35-50% a los 5 años(6).

Métodos diagnósticos y de estadificación

Para poder conocer el diagnóstico y la extensión anatómica de la neoplasia se utilizan los datos de las siguientes exploraciones.

- 1.- **Historia clínica y exploración física.** Grado evidencia 1B.
- 2.- **Radiografía de tórax**
- 3.- **TC torácica y abdominal superior con contraste,** sensibilidad del 61% y especificidad del 79%. Especialmente útil para determinar la extensión del descriptivo tumor (cT). Grado 1B.
- 4.- **TC con punción aspiración con aguja fina o biopsia con aguja gruesa (PAAF/BAG)** para obtener material histológico. Tiene buena sensibilidad (90%) y especificidad (97%) aunque los falsos negativos son altos (22%) con mínimos falsos positivos (1%).
- 5.- **Tomografía por emisión de positrones asociada a tomografía computarizada (PET-TC).** La PET-TC nos permite aumentar el grado de sospecha de neoplasia pulmonar, detectar metástasis torácicas y sobretodo extratorácicas (grado 1B), conocer el status del mediastino (número de estaciones e incluso el número de ganglios potencialmente afectados) y nos aporta información sobre la actividad metabólica del tumor. Los ensayos clínicos randomizados nos indican que hay una reducción, tras la introducción de la PET-TC, del 40% al 20% de resecciones no curativas (por enfermedad benigna definitiva, afectación ganglionar mediastínica no sospechada, enfermedad irresecable en la cirugía o muerte por cualquier causa dentro del primer año tras la cirugía). Además, la tasa de metástasis a distancia subió al 14% (previa 7%). Aunque existe un aumento de sobreestadificación (5% vs 1%) con la PET-TC, la posibilidad de infraestadificación final pretratamiento bajó del 30% al 15%(55). Un 20% más de los pacientes están correctamente estadificados en cuanto a mediastino o metástasis, pero la confirmación de los hallazgos muchas veces es esencial.

- 6.- Resonancia magnética cerebral.** De rutina en estadios III-IV. Grado 2C. En estadio II se deberá considerar en adenocarcinomas o carcinomas de célula grande.
- 7.- Broncoscopia.** La sensibilidad global es del 78-88% y depende si el tumor es central o periférico. La sensibilidad diagnóstica de la biopsia fue del 57-74%; del cepillado 54-61%; del lavado broncoalveolar, 43% y del broncoaspirado, 47%. La broncoscopia con punción aspiración con aguja fina (*transbronchial needle aspiration*, TBNA) tiene una sensibilidad de 56-65% y se utiliza menos por la aparición de la broncoscopia asociada a ecografía.
- 8.- Broncoscopia asociada a ecografía para realizar punción aspiración con aguja fina transbronquial** (EBUS-TBNA, *endobronchial ultrasound associated with transbronchial needle aspiration*). El EBUS permite abordar los nódulos con eje corto >5 mm de 2R y L, 4R y L, 7, 10R y L, 11R y L. El EBUS radial para el diagnóstico tiene una sensibilidad del 73%, especificidad del 100%.
- 9.- Mediastinoscopia.** La mediastinoscopia convencional permite abordar los ganglios 1R y L, 2R y L, 4R y L y 7.
- 10.- Toracocentesis con o sin ecografía torácica y citología de líquido pleural.** Sensibilidad del 72%.

Otras pruebas se realizan en casos seleccionados

- 1.- Broncoscopia ultrafino con punción guiada por escopia**
- 2.- Broncoscopia con autofluorescencia**
- 3.- Navegación electromagnética**
- 4.- Endoscopia digestiva alta asociada a ecografía para la punción aspiración con aguja fina** (EUS-FNA, *endoscopy ultrasound associated with fine needle aspiration*). El EUS permite abordar los nódulos 2L, 4L, 7, 8, 9, retroperitoneales paraaórticos, en especial los abdominales celíacos, la glándula suprarrenal izquierda y determinados segmentos hepáticos (izquierdos).
- 5.- Biopsia pleural a ciegas o guiada por TC.** Sensibilidad del 57% a ciegas, si está guiada por TC asciende al 76-88%; valor predictivo negativo (VPN) del 44%, guiada por TC asciende al 75-80%.
- 6.- Toracoscopia.** En caso de derrame pleural maligno, la sensibilidad de la biopsia pleural por toracoscopia oscila entre el 80-99%, la especificidad 93-100%, y VPN 93-96%. Para la estadificación ganglionar, nos permite abordar casi todas las estaciones derechas e izquierdas, aunque su utilidad radica sobretodo quizás en la exploración de los niveles 5 y 6.
- 7.- Mediastinoscopia cervical extendida.** Permite abordar las estaciones de la mediastinoscopia convencional y también las estaciones 5 y 6.

Una adecuada estadificación clínica permite saber la extensión de la enfermedad, ofrecer el mejor tratamiento a cada paciente y establecer un pronóstico cercano a la realidad.

Estadificación

Los pacientes se clasifican en base al sistema TNM (*tumor, node and metastasis classification of malignant tumors*), que es una clasificación anatómica con un descriptivo para el tumor (T), otro para los ganglios (N) y otro para las metástasis (M)(56,57), aceptada por la UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) y la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*). La última revisión (7ª) para la neoplasia pulmonar es de 2009 (para más detalle ver el Anexo 2). Durante 2015 se han propuesto nuevas modificaciones(58-60) que se espera que se confirmen en la nueva revisión del TNM prevista para 2017.

Tabla 5. Estadios anatómicos según las combinaciones de los descriptivos T, N y cM, séptima edición de la clasificación TNM.

Estadios anatómicos			
Carcinoma oculto			
	Tx	NO	M0
Estadio 0			
	Tis	NO	M0
Estadio I			
IA	T1a, T1b	NO	M0
IB	T2a	NO	M0
Estadio II			
IIA	T2b	NO	M0
	T1a, T1b, T2a	N1	M0
IIB	T2b	N1	M0
	T3	NO	M0
Estadio III			
IIIA	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	NO, N1	M0
IIIB	T4	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
Estadio IV			
	Cualquier T	Cualquier N	M1

La combinación de los 3 descriptivos nos permite establecer unos estadios, ya bien sean clínicos o quirúrgico-patológicos. Desde el punto de vista quirúrgico, la estadificación clínica (cTNM) es aquella que se culmina antes del tratamiento quirúrgico del paciente, mientras que la estadificación patológica (pTNM) es el resultado de combinar las observaciones realizadas durante la cirugía y el análisis por anatomía patológica. Actualmente la estadificación patológica es el *gold standard* para clasificar a los pacientes y es el principal factor pronóstico. No obstante, se ha evidenciado que entre la estadificación clínica y la quirúrgico-patológica la concordancia es moderada, 22-47%(61-65). Por tanto, los métodos de estadificación no son suficientemente precisos para determinar

la extensión de la enfermedad. Más allá aún; el hecho que haya un 24% de los pacientes con estadio I con recidiva(66) nos indica que la estadificación *gold standard*, la quirúrgica-patológica, no es suficientemente precisa para detectar la verdadera extensión de la enfermedad.

Sistema linfático de drenaje pulmonar y sistematización ganglionar

El drenaje linfático torácico se divide en dos sistemas: uno superficial, el parietal o pleural, y uno profundo, el visceral. Los nódulos o ganglios del sistema parietal se dividen en diafragmáticos o frénicos superiores, paraesternales y parietales posteriores. Se distribuyen en la pared torácica y el diafragma.

El sistema relevante para el cirujano torácico es el visceral(67). Este sistema está formado por dos redes linfáticas, una que se distribuye subpleural y otra que se despliega peribroncovascular(68). La red peribroncovascular se distribuye por pulmón y mediastino y está compuesta por cuatro grupos ganglionares: el grupo intrapulmonar, el traqueobronquial, el mediastínico anterior o prevascular y el mediastínico posterior. Los tres últimos grupos sobrepasan los límites del pulmón. Todos estos ganglios drenarán finalmente, directa o indirectamente, en el ángulo venoso yuguloclavio o de Pirogoff derecho o izquierdo. La agrupación de varios nódulos linfáticos forma las cadenas linfáticas.

Nódulos linfáticos intrapulmonares

Los ganglios intrapulmonares suelen ocupar los ángulos de división del bronquio, la arteria o la vena, dificultando en ocasiones la disección en las resecciones pulmonares. Se localizan laterales a la reflexión de la pleura mediastínica, dentro del espacio delimitado por la pleura visceral. Los primeros ganglios son los subsegmentarios en la división broncovascular subsegmentaria, que se continúan con los ganglios segmentarios, en la división broncovascular segmentaria. Estos ganglios se encuentran en el adulto y de forma inconstante; Rouvière no los evidenció en estudio de fetos.

Además, por su importancia clínica, hay que destacar en este punto los ganglios lobares, que se sitúan en la bifurcación de los bronquios lobares, los ganglios interlobares y los hiliares(67). Existen dos grupos interlobares derechos, el superior está entre el bronquio lobar superior y el bronquio intermediario; el inferior se encuentra entre el bronquio lobar medio y el bronquio lobar inferior derecho.

Nódulos linfáticos traqueobronquiales

Los ganglios traqueobronquiales se encuentran entre los ganglios mediastínicos anteriores y posteriores y son el grupo ganglionar más importante del tórax. Se dividen en 3 subgrupos: los ganglios pediculares o de la raíz del pulmón, los ganglios de la bifurcación y los ganglios paratraqueales.

- 1.-** Los nódulos pediculares o de la raíz del pulmón rodean al bronquio principal desde el origen bronquial hasta la pleura visceral.
- 2.-** Los nódulos de la bifurcación, intertraqueobronquiales o traqueobronquiales inferiores son los ganglios subcarinales y se sitúan en la bifurcación traqueobronquial. Reciben la linfa de ambos pulmones y se prolongan hasta contactar con el esófago y por debajo de los bronquios principales hasta el hilio pulmonar continuándose con los ganglios hiliares.
- 3.-** Los nódulos paratraqueales se dividen en tres grupos: laterotraqueales derechos, laterotraqueales izquierdos o recurrenciales izquierdos y retrotraqueales. Los ganglios laterotraqueales derechos se localizan en la región anterior y lateral derecha de la tráquea en una depresión llamada espacio de Baréty y que tiene como límites anteriores la vena cava superior y la vena braquiocefálica izquierda; mediales el arco aórtico y el tronco braquiocefálico; posterior y medial la cara anterolateral de la tráquea y el nervio vago; lateral la pleura mediastínica; superior la arteria subclavia y el nervio laríngeo recurrente derecho e inferiores el arco de la vena ácigos y el borde superior de la arteria pulmonar derecha. Se continúan superiormente hasta el espacio supraclavicular derecho. En la base de este espacio se encuentra el nódulo linfático más voluminoso de este grupo, es el nódulo linfático del arco de la vena ácigos, donde convergen la mayor parte de los vasos linfáticos del pulmón derecho y de la porción inferior del pulmón izquierdo. A medida que ascendemos en el espacio de Baréty, los ganglios se hacen más pequeños. Estos ganglios desbordan la línea media traqueal.

Los ganglios laterotraqueales izquierdos se sitúan a la izquierda de la tráquea y acompañan la porción vertical del nervio laríngeo recurrente izquierdo. El primer nódulo se sitúa por debajo de la aorta y la arteria pulmonar y por encima del origen del bronquio principal izquierdo.

Finalmente, los ganglios retrotraqueales se sitúan por detrás de la tráquea, entre el músculo traqueal y el esófago. Suele empezar por un ganglio asociado al músculo traqueal del bronquio principal derecho(67,69,70).

NÓDULOS LINFÁTICOS LATEROTRAQUEALES DERECHOS

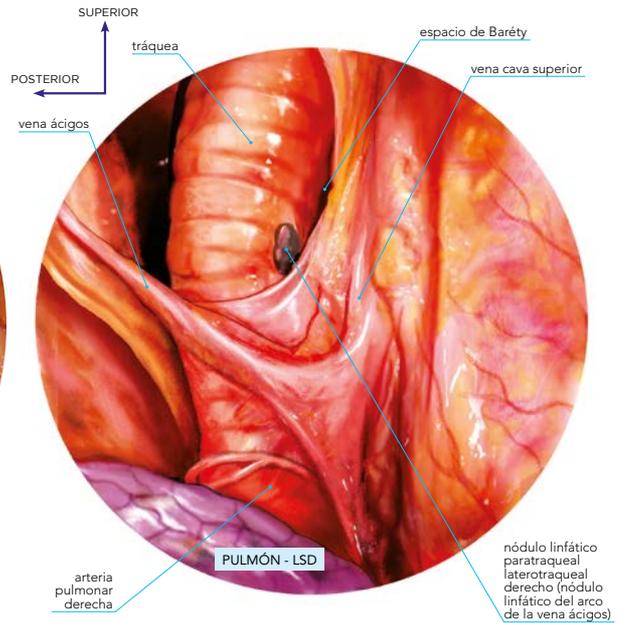
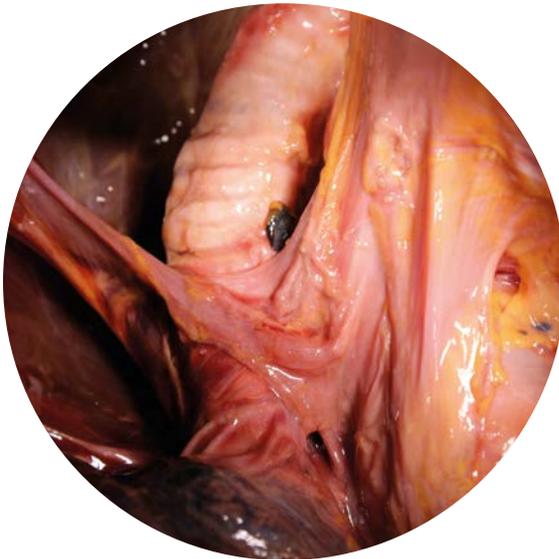


Figura 8. Nódulos linfáticos laterotraqueales derechos en el espacio de Baréty.

NÓDULOS LINFÁTICOS TRAQUEOBRONQUIALES

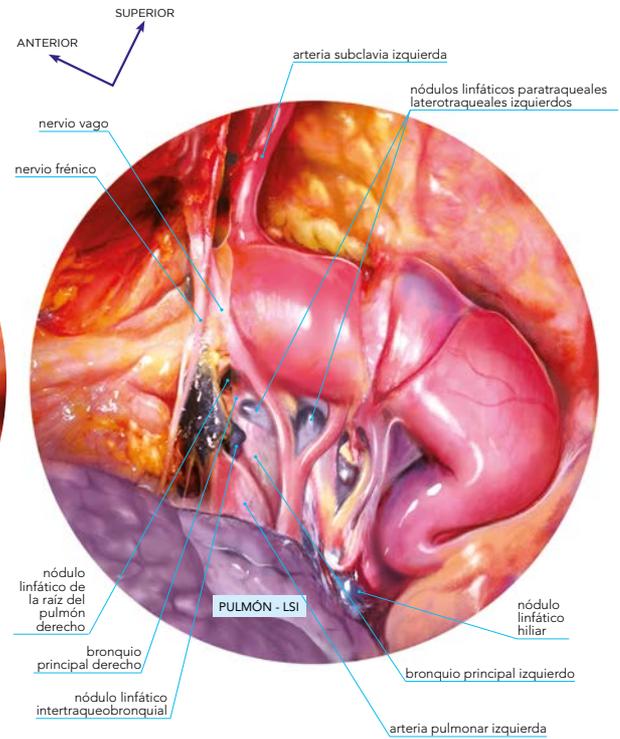
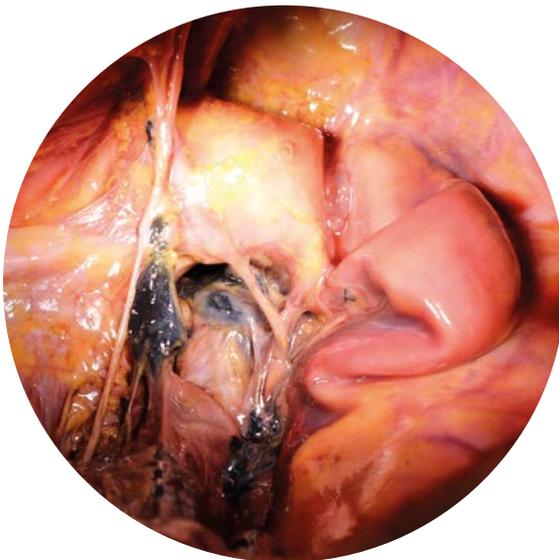


Figura 9. Nódulos linfáticos traqueobronquiales.

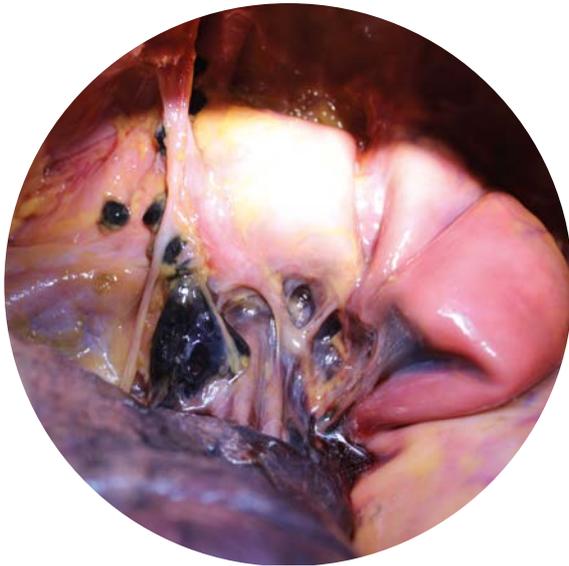


Figura 10. Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores izquierdos.

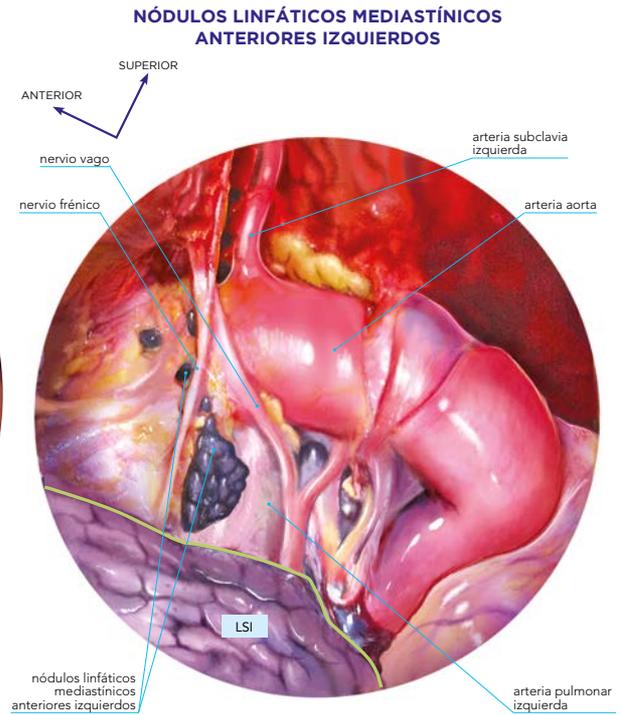
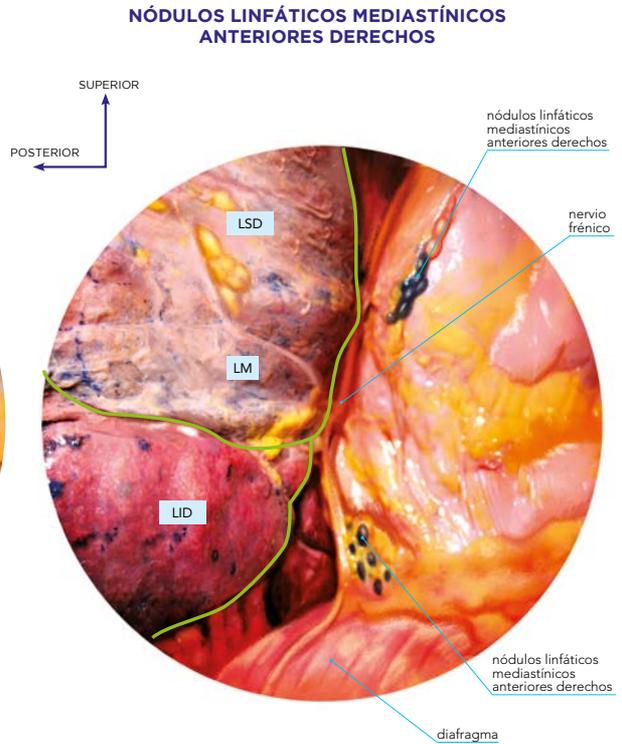


Figura 11. Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores derechos.



Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores y posteriores

Los ganglios *mediastínicos anteriores o prevasculares* están situados en el mediastino anterosuperior, anteriores a la vena cava superior, vena braquiocefálica derecha, vena braquiocefálica izquierda, arco de la aorta y arteria carótida común izquierda, drenando la linfa hacia la base del cuello. Forman parte de las vías linfáticas ascendentes mediastínicas anteriores derecha e izquierda. Reciben los linfáticos de órganos o tejidos vecinos (pleura, pericardio, corazón, pulmones, timo, diafragma) y drenan en el ángulo venoso yugulosubclavio que corresponda, directamente o a través de otro tronco colector de la base del cuello. Existen tres grupos: los mediastínicos anteriores derechos, los mediastínicos anteriores izquierdos y los mediastínicos anteriores transversos.

- 1.- Nódulos linfáticos anteriores derechos, prevenosos, se extienden a lo largo del paquete vasculonervioso frénico, vena cava superior y vena braquiocefálica derecha hasta la base del cuello.
- 2.- Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores izquierdos, prearteriales o preaortocarotídeos(70). Se sitúan desde el hilio pulmonar izquierdo (no incluido) pasando por delante del origen de la arteria pulmonar izquierda, a nivel del ligamento arterioso de Botal y siguen a nivel del arco aórtico, continúan anteriores a la arteria carótida común izquierda hasta llegar a los ganglios subclavios. Varios nódulos acompañan al nervio frénico y son más numerosos que los derechos.
- 3.- Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores transversos. Anastomosan ambas cadenas anteriores situándose a lo largo de la vena braquiocefálica izquierda.

Los ganglios mediastínicos posteriores se reparten a lo largo del esófago y la aorta descendente torácica. Drenan en los nódulos linfáticos traqueobronquiales inferiores y en el conducto torácico.

- 1.- Nódulos linfáticos de los ligamentos triangulares o pulmonares. Pertenecen a dos cadenas, derecha e izquierda. Presentan un tamaño ascendente de caudal a craneal, el más constante es un ganglio adyacente a la vena pulmonar inferior.
- 2.- Nódulos linfáticos paraesofágicos inferiores. Raramente reciben la linfa pulmonar.

El conducto torácico es el mayor conducto linfático del organismo. Recoge los linfáticos subdiafragmáticos excepto algunos linfáticos del hígado y los linfáticos de la porción supraumbilical de la pared abdominal, también recoge los linfáticos de la pared posterolateral del tórax y algunos colectores de la base del cuello. Se origina en la unión de dos troncos lumbares (D11-L2) que continúan a los nódulos linfáticos lumbares derechos e izquierdos. Ascende lateral derecho a la aorta, la cruza posteriormente a nivel de D5-D6 y sigue la cara posteromedial de la arteria

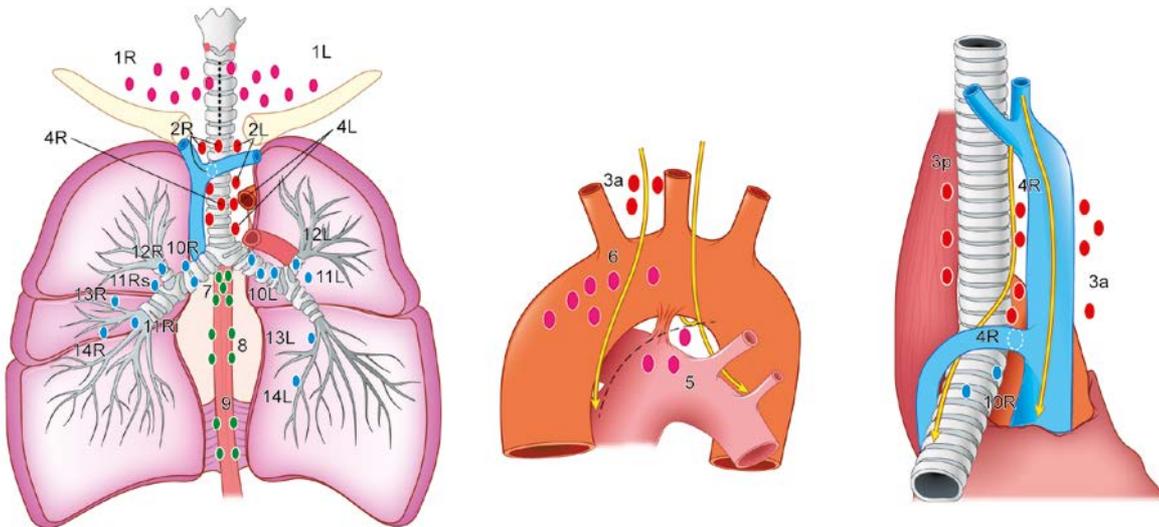
subclavia izquierda, describe una curva convexa y drena en el ángulo yuguloclavio izquierdo o en la porción inferior de la vena yugular interna izquierda o vena subclavia izquierda.

Sistematización ganglionar y rutas de drenaje linfático

A pesar de existir una abundante y válida literatura anatómica describiendo los nódulos linfáticos del tórax y los vasos asociados, el mapa ganglionar utilizado en la cirugía de resección pulmonar oncológica sigue los esquemas creados a partir de los hallazgos comunes en la cirugía.

Antes del mapa ganglionar internacional propuesto por la IASLC en 2009 (detallado en el Anexo 2)(71), se utilizaban dos mapas ganglionares similares pero no superponibles, el de la *American Thoracic Society* modificado por Mountain-Dresler(72) y el de Naruke, adoptado por la Sociedad Japonesa de Cáncer de Pulmón(73). Las discrepancias surgían en el límite de los ganglios hiliares con los subcarinales y en la nomenclatura de los ganglios laterotraqueales derechos y pediculares. El mapa ganglionar actual intenta superar las pequeñas discrepancias y ofrecer una estándar único. Uno o varios nódulos linfáticos se agrupan dentro de cada estación, que ahora están descritas con límites precisos; a su vez, una o varias estaciones se agrupan en zonas anatómicas, que permitirán posteriores análisis de tipo pronóstico y que se aproximan de nuevo a las descripciones anatómicas y finalmente una o varias zonas se agrupan en áreas ganglionares.

Figura 12. Mapa ganglionar propuesto por la IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) y vigente en la actualidad. 1, R: derecho; 2, L: izquierdo.



Número	Nomenclatura quirúrgica	Zonas ganglionares
1R ¹ y L ²	Cervicales bajos Supraclaviculares De la escotadura yugular esternal	Zona supraclavicular
ÁREA DE LOS NÓDULOS MEDIASTÍNICOS SUPERIORES		
2R	Paratraqueales superiores derechos	Zona superior
2L	Paratraqueales superiores izquierdos	
3a	Prevasculares	
3p	Retrotraqueales	
4R	Paratraqueales inferiores derechos	
4L	Paratraqueales inferiores izquierdos	
ÁREA DE LOS NÓDULOS AÓRTICOS		
5	Subaórticos (ventana aortopulmonar)	Zona AP
6	Paraórticos (de la aorta ascendente o frénicos)	
ÁREA DE LOS NÓDULOS MEDIASTÍNICOS INFERIORES		
7	Subcarinales	Zona subcarinal
8	Paraesofágicos (por debajo de la carina)	Zona inferior
9	Del ligamento pulmonar	
ÁREA DE LOS NÓDULOS N1		
10R y L	Hiliares	Zona hilar e interlobar
11R y L	Interlobares	
12R y L	Lobares	
13R y L	Segmentarios	Zona periférica
14R y L	Subsegmentarios	

Tabla 6. Mapa ganglionar propuesto por la IASLC y vigente en la actualidad. 1, R: derecho; 2, L: izquierdo.

La linfa pulmonar drena de forma ascendente y confluyente para llegar a la circulación sanguínea a nivel de los ángulos yugulosubclavios. Este circuito se inicia con el drenaje de la linfa del intersticio alveolar pulmonar en los vasos linfáticos de los segmentos pulmonares y de los lóbulos y pasa por los ganglios intrapulmonares. Las cadenas linfáticas mediastínicas se inician en los ganglios interlobares e hiliares, presentes desde el final del período fetal. El patrón de drenaje de cada lóbulo puede ser variable, existiendo múltiples conexiones y rutas, incluso vías directas a los vasos torácicos o a los ángulos yugulosubclavios(68,69). No obstante, las rutas de drenaje lobar pulmonar más habituales se presentan en la figura 13(74-76). El pronóstico de las metástasis ganglionares y la posibilidad de afectación N2 (ganglionar mediastínica) sin afectación N1 (ganglionar hilar-intrapulmonar, *skip metastasis*) es un fiel reflejo de esta anatomía linfática multicomunicada. Los pacientes con afectación de una cadena o zona ganglionar N2 presentan una supervivencia del 35% aproximadamente(77), mientras que la afectación de dos cadenas o más disminuye la supervivencia a menos del 20%, reflejo de un mayor drenaje linfático-neoplásico hasta la sangre (75).

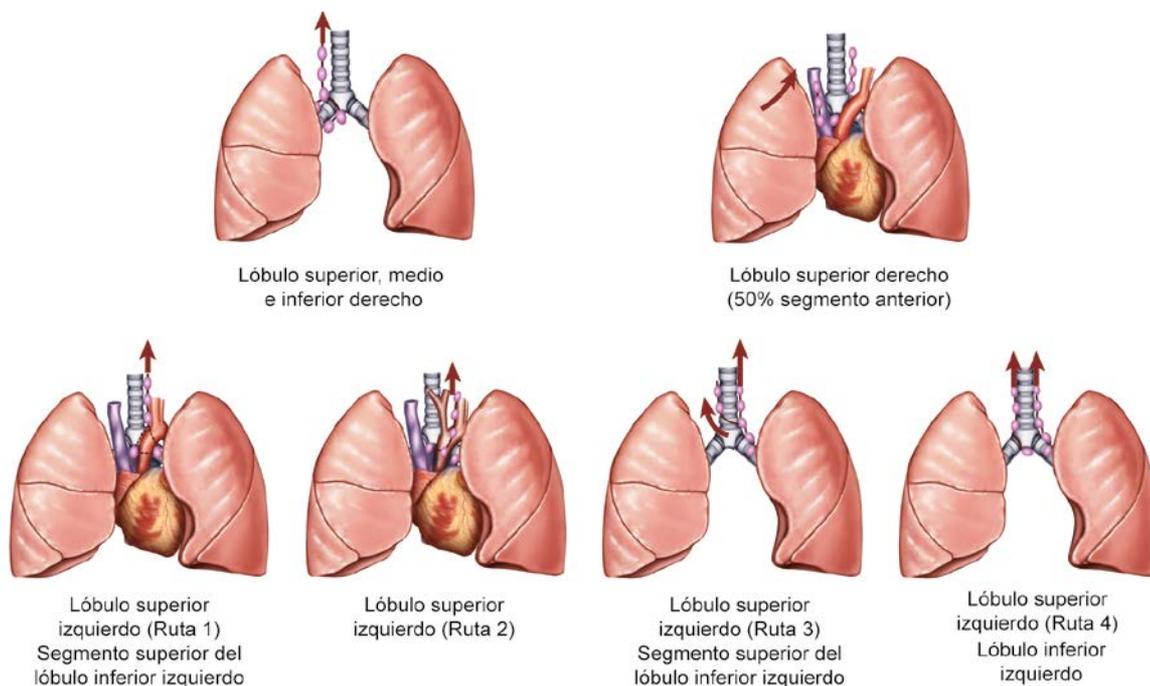


Figura 13. Rutas de drenaje linfático lobar.

Estadificación ganglionar

El 57% de los pacientes de la base de datos de la IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) están clasificados en uno u otro estadio debido a la afectación ganglionar(78). Dado que el estadio es el principal factor pronóstico en la neoplasia pulmonar, automáticamente el estatus ganglionar se convierte en uno de los principales factores pronósticos en el CPNCP. La afectación ganglionar, ya sea a nivel hiliar-intrapulmonar o a nivel mediastínico condiciona disminución del tiempo libre de enfermedad y menor supervivencia. Los pacientes con mejor pronóstico son aquellos pN0, seguidos por los pN1, luego los pN2 y finalmente los cN3. Los pacientes con afectación N2 presentan una supervivencia global (OS) del 22% a los 5 años, variando desde el 29-48% en los cN3 no sospechados hasta el 3-20% de los N2 clínicos o el 8-20% de los pacientes con varias zonas o ganglios afectados a nivel N2(73,77). Por tanto, la estadificación ganglionar, sobretodo mediastínica, es relevante para localizar aquellos pacientes cM0 pero con N2 clínico o multinivel o cN3; éstos serán tributarios de quimioterapia y/o radioterapia, mientras que el resto de pacientes cM0 se les intentará ofrecer un tratamiento quirúrgico o multimodal si no hubiere contraindicación por el descriptivo T o su estatus funcional y comorbilidades.

La ACCP (*American College of Chest Physicians*) establece una clasificación basada en hallazgos radiográficos que permite orientar si es preciso o no la estadificación ganglionar más allá de las pruebas de imagen(55).

- Grupo 1. Pacientes con imagen de infiltración mediastínica englobando vasos y vía aérea. No es preciso más estadificación mediastínica; la prioridad es obtener material histológico tumoral para determinar la estirpe y las alteraciones moleculares susceptibles de tratamiento diana.
- Grupo 2. Pacientes con aumento de adenopatías mediastínicas (≥ 1 cm en el eje corto). Hay sospecha de afectación mediastínica pero debe confirmarse con más pruebas.
- Grupo 3. Pacientes con tumores centrales o c-pN1, la posibilidad de afectación ganglionar mediastínica es del 20-25%. La estadificación ganglionar mediastínica es necesaria.
- Grupo 4. Tumores periféricos, la posibilidad de afectación ganglionar es baja y no es preciso más estadificación ganglionar.

Algoritmos de estadificación ganglionar mediastínica

El punto clave en la estadificación ganglionar es qué porcentaje de pN2 no sospechado, es decir, de falsos negativos tras la estadificación ganglionar, se considera asumible; algunos estudios lo sitúan en el 10%(79). Es más, dentro de los pN2 no sospechados, los realmente determinantes son aquellos con pN2 múltiple, dado que presentan una evolución muy desfavorable y la cirugía no les aporta ninguna ventaja. El porcentaje asumible de estos pacientes no debería sobrepasar el 1-2%(80).

Tabla 7. Resumen de las técnicas de estadificación mediastínica ganglionar y sus valores de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP. Dado que el VPN está afectado por la prevalencia y en los estudios de PAAF/BAG guiada por TC es $>80\%$, el VPN no se calculó. *Ensayo clínico ASTER, comparado con cirugía sola (Sensibilidad 79%, VPN 86%). 1, VPP: valor predictivo positivo; 2, VPN: valor predictivo negativo; 3, VAMLA: video assisted mediastinal lymphadenectomy; 4, TEMLA: transcervical extended mediastinal lymphadenectomy.

Técnicas de estadificación ganglionar				
Técnica	Sensibilidad	Especificidad	VPP ¹	VPN ²
TC	55%	81%	58%	83%
PET-TC	62%	90%	63%	90%
EBUS	89%	100%	100%	91%
EUS	89%	100%	100%	86%
EBUS y EUS	91%	100%	100%	96%
PAAF/BAG guiada por TC	94%	100%	100%	-
PAAF transbronquial guiada por broncoscopia	78%	100%	100%	77%
Mediastinoscopia	89%	100%	100%	92%
Mediastinoscopia cervical extendida	71%	100%	100%	91%
Mediastinotomía anterior	71%	100%	100%	91%
Toracoscopia	99%	100%	100%	96%
Combinación (EBUS + EUS negativo) + cirugía*	94%	100%	100%	93%
VAMLA ³	100%	100%	100%	100%
TEMLA ⁴	94%	100%	100%	97%

Para obtener la estadificación ganglionar se combinan técnicas de imagen, endoscópicas e incluso quirúrgicas. Un punto clave es determinar qué pacientes

precisarán de estadificación mediastínica invasiva y si la morbilidad del procedimiento de estadificación es asumible. Los procedimientos más invasivos aportan menos falsos negativos, pero a costa de una mayor morbilidad. Aunque hay pequeñas diferencias según el algoritmo (ESTS, ACCP, NCCN -*National Comprehensive Cancer Network*-) los pacientes tributarios de un procedimiento invasivo son los que presenten:

- 1.- **Aumento de los ganglios mediastínicos por TC o hipermetabolismo ganglionar mediastínico por PET-TC.** El EBUS/EUS o combinados se recomienda como primer mejor test por encima de la estadificación quirúrgica (1B)(55). No obstante, en los casos con alta sospecha y EBUS/EUS negativo, la estadificación quirúrgica mediante mediastinoscopia debería realizarse (1B). Esto se basa en los resultados de algunos ensayos clínicos que sitúan los VPN de las pruebas endoscópicas alrededor de 85-88%. No obstante, los resultados en centros experimentados y los resultados expuestos por la revisión de la ACCP mejoran esos valores de VPN, cosa que pondrá en duda en el futuro la necesidad de confirmación quirúrgica en caso de EBUS/EUS negativos.
- 2.- **cN1, tumores centrales o >3 cm, sobretudo adenocarcinomas con alto SUVmax, con PET-TC negativo ganglionar mediastínico (1C).** Como primera opción se recomienda el EBUS, EUS o EBUS+EUS (2B). Los pacientes con enfermedad N1 tienen un 30% de posibilidades de presentar pN2-3, los pacientes con tumores >3 cm presentan un VPN ganglionar del PET-TC más bajo, de 85-89% (≤ 3 cm, VPN 92-94%) y la posibilidad de afectación pN2 en tumores periféricos (tercio externo del pulmón), sin ganglios aumentados por TC y sin aumento del hipermetabolismo por PET-TC, es del 3-6%, mientras que los centrales es del 22%(79,81). En los casos sospechosos con EBUS/EUS negativo, la estadificación quirúrgica debería valorarse.

Todos los algoritmos asumen la realización previa de TC de tórax y abdomen superior y de broncoscopia.

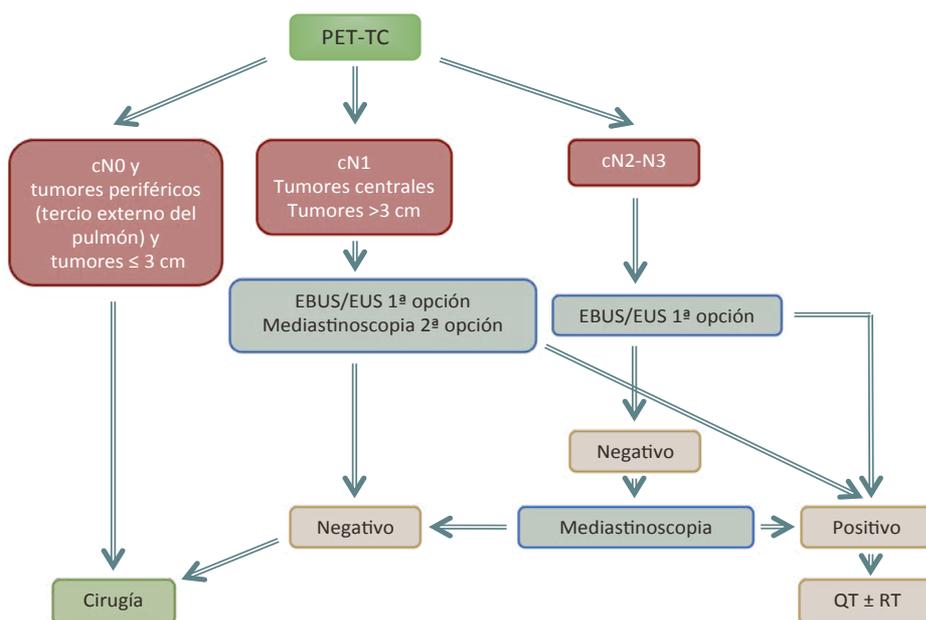


Figura 14. Algoritmo de estadificación ganglionar mediastínica propuesto por la ESTS.

Las guías de práctica clínica de la ESTS (*European Society of Thoracic Surgeons*) de 2013 recomiendan que, en el caso que fuera necesario la exploración invasiva del mediastino, las estaciones a evaluar, como mínimo, serán la 4R y 4L y la 7. Si presentan nódulos linfáticos, también la estación 2R y 2L deben biopsiarse. Las estaciones 10R y L y las 5, 6, 8, 9 deben biopsiarse en caso que esto implique un cambio de tratamiento. En caso de invasión extracapsular por pruebas de imagen de las citadas estaciones mediastínicas, también deberían biopsiarse. En las neoplasias del lóbulo superior izquierdo en las cuales la estadificación invasiva del mediastino es necesaria y donde las pruebas han descartado la afectación del resto de zonas o estaciones ganglionares, es necesario abordar quirúrgicamente las estaciones 5-6 por toracoscopia, mediastinotomía anterior o mediastinoscopia cervical extendida; siempre y cuando los resultados cambien el tratamiento(55).

La VAMLA (*video assisted mediastinal lymphadenectomy*) y la TEMLA (*transcervical extended mediastinal lymphadenectomy*), aunque sirven para la estadificación ganglionar mediastínica, son técnicas quirúrgicas que permiten realizar una linfadenectomía o disección ganglionar mediastínica. Por tanto, la sensibilidad y el VPN son muy altos, a costa de una morbilidad más elevada e incluso mortalidad, sobretodo para el TEMLA(79).

Estadificación ganglionar intraoperatoria

El tratamiento quirúrgico de la neoplasia pulmonar se basa en la exéresis pulmonar anatómica y en la linfadenectomía de las estaciones o cadenas de drenaje linfático. Con la linfadenectomía, se está realizando una estadificación ganglionar intraoperatoria. Las recomendaciones de las principales sociedades de Cirugía Torácica a nivel mundial indican que siempre que sea posible, se deberá realizar una disección ganglionar sistemática; como alternativa, muestreo ganglionar sistemático.

La disección ganglionar sistemática implica la disección y exéresis en bloque de las adenopatías y el tejido fibroadiposo asociado, de todas las estaciones anatómicas abordables en cada hemitórax(69,82). Se recomienda que, como mínimo, deben haberse resecado 3 ganglios de 3 estaciones mediastínicas diferentes, incluyendo siempre la subcarinal. Se deberá realizar también la linfadenectomía de los ganglios intrapulmonares (hiliares, interlobares e intraparenquimatosos), resecados con la pieza anatómica pulmonar; como mínimo, tres ganglios deben ser resecados(83).

El muestreo ganglionar es la exéresis o biopsia de uno o varios nódulos linfáticos guiados por las pruebas preoperatorias o los hallazgos intraoperatorios. En ocasiones este muestreo se convierte en sistemático si el cirujano tiene prefijado una serie de localizaciones anatómicas a biopsiar.

La disección ganglionar específica de lóbulo implica la exéresis de los nódulos y el tejido fibroadiposo asociado de las estaciones o zonas de drenaje linfático asociadas al lóbulo en el cual se encuentra la neoplasia.

Micrometástasis y células tumorales aisladas

Las micrometástasis ganglionares son pequeños acúmulos de células de 0,2-2 mm de tamaño con invasión vascular o de la pared de senos linfáticos, mitosis, con reacción estromal y con proliferación celular extravascular/extrasinusoidal. Suelen detectarse mediante hematoxilina-eosina. Los estudios extendidos con inmunohistoquímica para detectar micrometástasis detectan una prevalencia del 48% entre los pacientes en estadio I-II, aunque sólo un 5% las presentaban a nivel N2 implicando un cambio pronóstico(84,85).

A pesar de los múltiples avances y la inclusión en los últimos años de varias técnicas que ayudan en la estadificación ganglionar, evidenciamos que un porcentaje no desdeñable de pacientes pN0 presentan recidiva local o a distancia. Esto indica que los actuales métodos de estadificación no son suficientemente sensibles para detectar la enfermedad a nivel ganglionar. En este sentido, se han intentado clasificar e incorporar los avances en biología molecular a la estadificación ganglionar, de una forma complementaria.

Se ha propuesto una clasificación accesoria de células tumorales aisladas (CTA). Las células tumorales aisladas son células tumorales individuales o pequeños racimos de células de no más de 0,2 mm en su mayor dimensión, sin mitosis ni invasión vascular ni de pared de senos linfáticos, sin reacción estromal, que son detectadas con tinciones histológicas de rutina, métodos inmunohistoquímicos o moleculares. No obstante, los casos con CTA o con hallazgos que sugieran células tumorales o sus componentes a nivel ganglionar o en otros órganos, por técnicas no morfológicas (citometría de flujo, análisis de DNA, RNA *-ribonucleic acid-*, etc.), aún se clasifican como N0 ó M0, respectivamente(57,82,86).

Tabla 8. Clasificación según la presencia o ausencia de células tumorales aisladas, ya fuere por hallazgos morfológicos o no morfológicos.

Células tumorales aisladas	
No metástasis en ganglios linfáticos regionales por histología	
N0	No metástasis en ganglios linfáticos regionales por histología (intratorácicos, mediastínicos, supraclaviculares y escalenos).
N0(i-)	Hallazgos morfológicos negativos de CTA
N0(i+)	Hallazgos morfológicos positivos de CTA
N0(mol-)	Hallazgos no morfológicos negativos de CTA
N0(mol+)	Hallazgos no morfológicos positivos de CTA

Tratamiento (6)

Estadios I y II

El tratamiento que se ofrece a los pacientes no sólo depende del estadio clínico, también de la teórica capacidad del enfermo para soportarlo. Sólo un 20% de los pacientes con carcinoma broncogénico son tributarios de tratamiento quirúrgico. Como norma general, los pacientes quirúrgicos presentan estadios clínicos I y II (1B).

La resección anatómica puede ser neumonectomía, bilobectomía o lobectomía. En casos de pacientes con compromiso funcional, con comorbilidades importantes o edad anciana (≥ 75 años y especialmente ≥ 80 años), sobretodo en tumores de pequeño tamaño (< 2 cm), puede optarse por una segmentectomía anatómica. En lesiones menores de 2 cm, los márgenes deben ser como el tamaño máximo del tumor; en lesiones > 2 cm, 2 cm de margen serán necesarios. En casos de hiperplasia adenomatosa atípica, adenocarcinoma in situ y probablemente adenocarcinoma mínimamente invasivo, es preferible la segmentectomía anatómica. Si la segmentectomía anatómica no es posible, se optará por la segmentectomía atípica. Si es posible, la exéresis pulmonar y la linfadenectomía deberán realizarse por toracoscopia (2C). En ocasiones es preciso ampliar la resección a la pleura parietal o mediastínica, la pared torácica, el diafragma o los segmentos pulmonares de otro lóbulo adyacente.

En el estadio I, varios estudios randomizados no han evidenciado beneficio en supervivencia de la disección ganglionar sistemática versus el muestreo ganglionar sistemático(87). Se acepta muestreo ganglionar sistemático (derecho: 2R, 4R, 7, 10R; izquierdo: 5, 6, 7, 10L, además de cualquier ganglio sospechoso durante la cirugía) en aquellos pacientes T1-2 N0 o N1 distal a la estación hilar, si previamente a la cirugía se ha llevado a cabo una estadificación ganglionar mediastínica completa(88). Se acepta disección ganglionar sistemática lóbulo-específica en los pacientes con carcinoma escamoso periférico y T1.

En el estadio II hay pocos datos y son favorables a la disección ganglionar sistemática para obtener un mejor control local de la neoplasia y mayor supervivencia. En resecciones tras tratamiento de inducción o en pacientes de alto riesgo, la linfadenectomía intraoperatoria puede ser menos exhaustiva para minimizar el impacto o los riesgos sobre el paciente. Tanto para la resección anatómica como para la linfadenectomía, el objetivo de la cirugía es una resección completa(83).

Los pacientes que rechazan la cirugía o no la tolerarían por estudio de operabilidad, pueden realizar, según el tamaño, SBRT (*stereotactic body radiation therapy*), radiofrecuencia guiada por TC o radioterapia externa.

Los pacientes con estadio patológico II (N1) y buen estadio funcional, la quimioterapia adyuvante basada doblete de platino y vinorelbina, etopósido o vin-

blastina está indicada (1A). La quimioterapia adyuvante también se valorará en pacientes N0 pero con tumores poco diferenciados, carcinomas neuroendocrinos de célula grande, carcinomas neuroendocrinos moderadamente diferenciados, con invasión vascular intratumoral, tumores >4 cm., segmentectomía atípica, afectación de la pleura visceral o linfadenectomía incompleta (Nx).

Los pacientes con estadio IIB T3N0, sobretudo los tumores del sulcus superior, en ocasiones pueden precisar de tratamiento neoadyuvante con quimioterapia (cisplatino y etopósido) o quimiorradioterapia (45-50 Gy -Grays-), posteriormente cirugía y completar con quimioterapia adyuvante (cisplatino con vinorelbina, etopósido o vinblastina). En otras ocasiones se realiza cirugía y posterior tratamiento con quimioterapia adyuvante.

Estadio III

El estadio IIIA lo forman un grupo heterogéneo de pacientes que, por otra parte, comparten pronóstico similar. Los pacientes T3N1 y T4 N0-1, si el componente T4 es por dos nódulos en dos lóbulos diferentes del mismo hemitórax, por invasión discreta de la grasa mediastínica, por afectación local y resecable del cuerpo vertebral o por afectación discreta y resecable de la vena cava superior, son tributarios de tratamiento quirúrgico con neoadyuvancia con quimiorradioterapia o adyuvancia con quimioterapia. Los tumores del sulcus superior resecables T3N1 ó T4N0-1, precisan de quimioterapia neoadyuvante, cirugía y posterior quimioterapia adyuvante. En caso que no fueran tumores resecables, se aplica quimioterapia y radioterapia concomitante.

Los pacientes con estadio III N2 se pueden dividir en 3 grupos según la clasificación de la ACCP:

- 1.- Enfermedad pN2 no sospechada tras la estadificación clínica completa.** En estos paciente se descubre la enfermedad N2 durante la cirugía o en el examen por anatomía patológica. Si en el análisis peroperatorio sólo hay una estación o zona ganglionar afectada y es posible realizar una resección completa menor a una neumonectomía, se deberá continuar con la resección pulmonar y la linfadenectomía, preferiblemente disección ganglionar sistemática(77). Tras la cirugía, se realizará quimioterapia (1A) y radioterapia secuencial (2C).
- 2.- Enfermedad cN2 discreta.** Son pacientes con una o dos estaciones o zonas ganglionares afectas por neoplasia. Estos casos se valorarán individualmente para realizar quimioterapia y radioterapia concomitante definitiva o quimioterapia/quimiorradioterapia y posterior cirugía. Los pacientes elegibles para cirugía son aquellos que tras el tratamiento de inducción presentaran ypN0-1, máximo pN2 en un solo nivel ganglionar y que el tratamiento quirúrgico consistiera en una lobectomía para conseguir una resección completa.

- 3.- Enfermedad cN2-3 infiltrativa.** Se considera enfermedad *bulky* cuando las adenopatías sobrepasan los 25 mm de diámetro. El tratamiento es la quimioterapia con los esquemas habituales y radioterapia concomitante (60-66 Gy) o radioterapia paliativa según *performance status*(89).

En el estadio IIIB por afectación T4 extensa, el tratamiento es la quimioterapia y la radioterapia si el estado general y la comorbilidad del paciente lo permiten.

Estadio IV

Los tumores, ganglios o metástasis de los pacientes con estadio IV deben ser analizados para conocer la histología. En caso de adenocarcinomas, carcinoma indiferenciado de célula grande o CPNCP no determinado, deben analizarse las mutaciones de EGFR y la translocación de ALK. Las mutaciones del EGFR (Gly719X, delección del exón 19, Leu858Arg, Leu861Gln, etc.) se encuentran en un 5-15% de los adenocarcinomas(90) y presentan un carácter predictivo dado que se han desarrollado fármacos inhibidores: fundamentalmente gefitinib y erlotinib. Estos fármacos han demostrado aumentar el tiempo libre de enfermedad respecto los dobles de platino clásicos (mediana 9,7 vs 5,2 meses) (91). Típicamente, los pacientes que se benefician de estos fármacos son mujeres no fumadoras. Por tanto, en pacientes con EGFR mutado, el tratamiento de primera línea es el gefitinib o el erlotinib (1A).

La translocación de ALK y fusión con EML4 está presente en el 5-15% de los adenocarcinomas y en general en el 3-7% de los CPNCP. Se ha desarrollado un tratamiento específico versus ALK-EML4, el crizotinib. Los pacientes con adenocarcinoma, varones, jóvenes y no o poco fumadores son los que se benefician más del tratamiento con crizotinib, con unas tasas de respuesta del 57% y con aumento del tiempo libre de enfermedad(92,93).

Hasta hace poco, los pacientes con carcinoma escamoso no presentaban dianas moleculares tratables y eran tributarios básicamente de tratamiento con quimioterapia. Recientemente se ha aprobado el uso de nivolumab, un anticuerpo inmunomodulador contra *programmed cell death protein 1* (**PD-1**), que presenta un aumento de supervivencia del 18% en un año en pacientes con carcinoma escamoso metastásico(94). Nivolumab también se ha probado en no escamosos con buenos resultados(95). Otros anticuerpos están actualmente en estudio en ensayos clínicos con prometedores resultados.

Determinados pacientes con 1-2 metástasis encefálicas o suprarrenal tratables por cirugía o radiocirugía, son considerados para tratamiento radical, preferentemente quirúrgico, de la lesión torácica y de la lesión metastásica.

Recidiva y supervivencia tras el tratamiento

Estudios clásicos apuntan una tasa global de recidiva del 29% para el estadio IA, con una tasa anual del 9% para los adenocarcinomas y un 4% para los carcinomas escamosos. La tasa de recidiva para el estadio IB es del 40%. Para los pacientes N1, a 5 años, un 38% presentaba recidiva local y un 47% a distancia. Se evidenció que los pacientes con >10 ganglios resecaados y T1-T2 eran factores independientes de buen pronóstico ante la recidiva(96,97). En general, la recidiva a distancia es más frecuente que la local en pacientes con estadios bajos y tratados de forma radical con cirugía; la recidiva locoregional solo aparece en un 24% de los pacientes con estadio I recidivado(66).

La evolución natural del carcinoma broncogénico es pésima, nos lleva a una supervivencia global a los 5 años de tan sólo el 16% para el estadio I (mediana de supervivencia: 9 meses) y del 0% para los estadios II-IV. En concreto, la OS a 5 años es del 23% para los pacientes con afectación T1 no tratados(98). El tratamiento actual mejora estos resultados pero no es plenamente efectivo, pues incluso los pacientes con CPNCP en estadio IA, resecaado de forma radical macroscópicamente y microscópicamente, presentan una supervivencia entorno al 73% a los 5 años(56). No obstante, en los últimos años se ha evidenciado un crecimiento de la supervivencia global del carcinoma broncogénico del 1,24%, acercándose al 20% en varones y sobre un 22% en mujeres a los 5 años del diagnóstico.

En cuanto al descriptivo T, a medida que aumenta el tamaño o la afectación de estructuras adyacentes al parénquima pulmonar (pleura visceral y parietal, pared, mediastino, etc.) disminuye la supervivencia. No obstante, incluso los pacientes pT1a presentan una supervivencia a 5 años del 77%.

Finalmente, en cuanto al descriptivo N, los pacientes pN0 presentan una supervivencia a los 5 años del 56%, mientras que los pN1 es del 38%, los pN2 del 22% y los pN3 del 6%. Diversos autores en la literatura y el subcomité de la IASLC para la revisión del descriptivo N han dividido esta clasificación anatómica N en subcategorías, sobretodo por el número de ganglios o zonas ganglionares implicadas. Los pacientes pN1a son aquellos con una zona ganglionar N1 afectada; los pacientes pN1b son aquellos con 2 o más zonas N1 implicadas; pN2a son los pacientes con 1 zona N2 (pN2a1 sin pN1; pN2a2 con pN1) y los pN2b son los que implican 2 o más zonas N2. Los mejores resultados los presentan los pacientes con un único ganglio afectado a nivel N1, siendo la supervivencia a 5 años en algunos estudios del 73%(77); a medida que aumenta la afectación, disminuye la supervivencia.

Supervivencia								
Estadio	Mediana OS ¹	OS 5 años	pT	Mediana OS ¹	OS 5 años	N	Mediana OS ¹	OS 5 años
pIA	119	73%	pT1a	-	77%	pN1a	52-77	53-48%
pIB	81	58%	pT1b	113	71%	pN1b	31-61	35-50%
pIIA	49	46%	pT2a	81	58%	pN2a1	71	54%
pIIB	31	36%	pT2b	56	49%	pN2a2	28-46	25-43%
pIIIA	22	24%	pT3	29-48	35-45%	pN2b	17-40	8-38%
IIIB	9-13	5-9%	pT4	25	35%	cN3	10-12	6-9%
IV	4-17	1-13%						

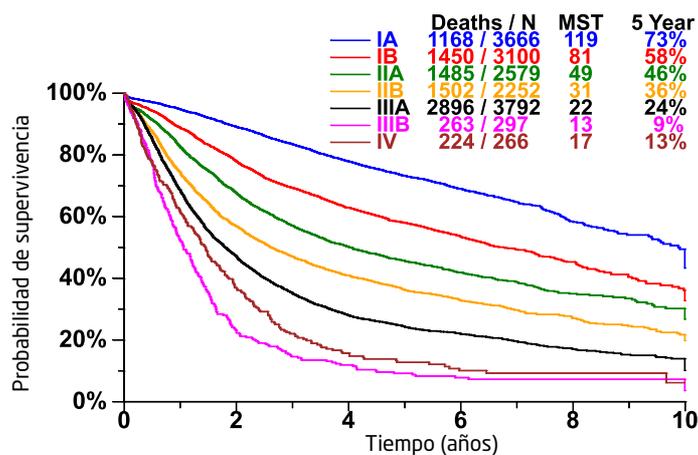


Tabla 9.

Supervivencia mediana y a 5 años en función del estadio patológico, del descriptivo pT y el N. Fuente: IASLC Database y New Database, bases de datos en la que se basaron la séptima y octava clasificación TNM de la neoplasia pulmonar; estudios adicionales referenciados (56,58,73,77,99,100). 1: mediana en meses.

Esta baja supervivencia a pesar de tratamiento radical implica que existe enfermedad que no detectamos con los actuales métodos de estadificación y las adenopatías torácicas son estructuras donde es posible que exista enfermedad no advertida.

Figura 15. Curvas Kaplan Meier de la supervivencia de los pacientes con neoplasia de pulmón según estadio patológico. Fuente: modificado de IASLC Database (56)

Biología molecular del carcinoma pulmonar

Bases celulares y moleculares de la neoplasia

Según las teorías actuales de la evolución del cáncer, el tumor se iniciaría a nivel epitelial de las vías aéreas y se formaría una masa celular que, en un punto crítico, se diseminaría de forma linfática hacia los ganglios intrapulmonares-hiliares-mediastínicos (en general dependiendo de la localización del tumor primario) y posteriormente por vía hematógica generando implantes tumorales a distancia.

No obstante, los tumores no son sólo masas de células proliferativas. Los tumores constituyen tejidos complejos de diversos tipos celulares que interactúan mediados por un estroma; todas estas células contribuyen al desarrollo de dicho tejido mediante la expresión de determinadas características implícitas a la neoplasia. El origen de la neoplasia es habitualmente monoclonal, se basa en una célula que adquiere, mediante inestabilidad genética, entre 3-7 alteraciones independientes del azar y que permiten la transformación de la célula en neoplásica. Existen dos modelos complementarios que explican el origen de la neoplasia, el modelo de Hanahan y Weinberg(101) y el modelo de Vogelstein y Kinzler(102).

Características de la neoplasia

Según el modelo de Hanahan, el cáncer presenta 10 características: 6 características clásicas distintas y complementarias que permiten la supervivencia, el crecimiento celular y la diseminación metastásica, dos características celulares emergentes y dos características facilitadoras(101).

Durante la carcinogénesis, las células iniciadas adquieren la capacidad de replicarse constantemente y mantener esa respuesta proliferativa, evadir las señales inhibitorias del crecimiento, alargar su supervivencia, estimular la producción de nuevos vasos sanguíneos y adquieren la capacidad de metastatizar vía linfática y sanguínea para colonizar otros tejidos y diseminar la neoplasia (mediante la disgregación del tejido de sostén y la disminución de la capacidad

de adhesión celular, por la pérdida de cadherina E). La capacidad de modificar o reprogramar el metabolismo energético celular y el escapar a la respuesta y destrucción inmune, en particular de los linfocitos T y B, macrófagos y *natural killers* (NK) son dos características de las células neoplásicas que se han evidenciado en los últimos años. Además, para adquirir las 8 características anteriores y facilitar la neoplasia, las células presentan inestabilidad genómica y mutaciones que llevan a la progresión tumoral y promueven la inflamación a través de activar las células inmunes innatas y por la vía de la reparación del daño (*wound healing*). Finalmente, existe un microambiente tumoral con intercambio de señales que permite estas características.



Figura 16. Modelo de Hanahan y Weinberg que expone las características de la neoplasia.

Entre las características clásicas de la neoplasia, destacar que la *proliferación celular*, incluso en las células normales, está mediada por factores de crecimiento que estimulan receptores con dominios tirosina quinasa y vías intracelulares como las que hemos detallado en el desarrollo embriológico del árbol traqueobronquial y el pulmón. Estas interacciones rescatan a la célula de la quiescencia e inician la proliferación. Los factores de crecimiento regulan temporalmente y espacialmente el crecimiento celular, de manera que las células iniciadas pueden enviar señales a través del estroma para activar las células normales. Mutaciones somáticas que activen de forma constitutiva los receptores de factores de crecimiento y las vías asociadas permiten una capacidad proliferativa ilimitada, sobretudo por la inhibición de los mecanismos de retroalimentación negativos (por ejemplo, de PTEN en la cascada de PIK3).

El proceso de *invasión y metástasis* empieza con un proceso de invasión local, seguido por la intravasación en los vasos linfáticos y sanguíneos adyacentes, la circulación por el sistema linfático y hematógeno, la extravasación de los vasos

al tejido de destino, la formación de micrometástasis y posteriormente la formación de tumores macroscópicos, denominado la colonización. En este proceso se ha evidenciado sobreexpresión de moléculas de adhesión normalmente asociadas con migraciones celulares típicas de la embriogénesis y la respuesta inflamatoria. Un ejemplo es la cadherina N, asociada a la migración de neuronas y células mesenquimales durante la organogénesis, que se encuentra sobreexpresada en varios carcinomas invasivos.

La *reacción inflamatoria* asociada a la neoplasia presenta un doble efecto: por una parte promueve la carcinogénesis y la progresión, activando el complemento, atrayendo factores de crecimiento, produciendo factores de supervivencia, factores proangiogénicos, enzimas extracelulares, radicales de oxígeno que provocan mutaciones en las células circundantes, etc. Además, la unión de **PD1** (*programmed cell death 1*, **PDCD1**), expresada por los linfocitos T, y **PDL1** (*programmed death ligand 1*, *CD274 molecule*) expresado por la célula tumoral, inactiva la apoptosis tumoral mediada por la célula T. Muchos tipos de neoplasia segregan PDL1 para inactivar estos linfocitos T y evadir la apoptosis. Actualmente se están testando anticuerpos vs PDCD1 (nivolumab, pembrolizumab) en pacientes estadio IV segunda línea con excelentes y prometedores resultados clínicos, sobretodo en tumores secretores de PDL1 (30% vs 10% de respuesta). Otro punto fuerte de esta nueva terapia es que es funcionante en adenocarcinoma y carcinoma escamoso. Paradójicamente, la reacción inflamatoria también activa la destrucción celular a través de la respuesta inmune.

Tipos de genes

Según Vogelstein y Kinzler, la alteración de tres tipos de genes está implicada en la carcinogénesis: los oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes estabilizadores. Las células tienen varios mecanismos de protección frente a las mutaciones que provocan la neoplasia, por tanto no podemos hablar de que las mutaciones causan el cáncer, sino que *contribuyen* al cáncer. Las mutaciones pueden originarse en líneas germinales y así haber predisposiciones hereditarias a la neoplasia o en células somáticas, apareciendo las neoplasias esporádicas.

Oncogenes

Un oncogén es un gen que promueve la proliferación celular. La mutación neoplásica implica una actividad constitutiva o que la proteína resultante se active en condiciones diferentes a lo habitual. La activación de los oncogenes puede originarse por translocaciones cromosómicas, amplificaciones o mutaciones intragénicas. Una mutación somática activadora en un alelo es suficiente para aportar a la célula esa ventaja proliferativa u otras características propias de la célula tumoral. Algunos oncogenes asociados a cáncer de pulmón son *EGFR*, *ERBB2*, *KRAS*, *C-MYC* o *STAT3*, como veremos posteriormente.

Genes supresores de tumores

Los productos de los genes supresores de tumores actúan normalmente promoviendo la muerte o la quiescencia celular (G0-1 del ciclo celular). Por tanto, son genes que la mutación neoplásica provoca una disminución en la actividad del producto, promoviendo la proliferación u otras capacitaciones de la célula. La inactivación de un gen supresor de tumores puede venir por mutaciones sin sentido en residuos que son básicos para la actividad de la proteína resultante, por mutaciones que truncan la proteína, de deleciones o inserciones o por el silenciamiento epigenético. Aunque la inactivación de un solo alelo puede aportar una ventaja a la célula, suele precisarse de la inactivación de ambos para aportar una ventaja real a la misma. Esto acostumbra a pasar por la deleción de un alelo por una alteración cromosómica grosera y una mutación intragénica del otro alelo. Clásicamente, las vías de **p53** (*tumor protein p53*) y **RB** (*retinoblastoma*) o p16 promueven la quiescencia celular.

La letalidad sintética (*synthetic lethality*) es un fenómeno biológico implicado en el cáncer. Engloba aquellas situaciones donde unas mutaciones o alteraciones en dos o más genes separados, que por sí solas no ocasionan daño celular, combinadas entre sí conllevan la muerte celular. La letalidad sintética es el mecanismo más importante existente en la actualidad para combatir la neoplasia a partir de los genes supresores de tumores.

Genes estabilizadores

La función normal de estos genes no está relacionada con la regulación de la proliferación, sino con el mantenimiento de la integridad del genoma. Estos genes reparan el DNA de los errores cometidos durante la replicación normal (errores en la recombinación mitótica y la segregación de cromosomas) o por errores inducidos por factores mutágenos exógenos. A este grupo de genes pertenecen los *mismatch repair* (MMR), *nucleotide-excision repair* (NER) y *base-excision repair* (BER) además de *BRCA1*, **BLM** (*Bloom syndrome, RecQ helicase-like*) y **ATM** (*Ataxia telangiectasia mutated serine/threonine kinase*). La inactivación de estos genes, dado que son específicos para la subsanación de errores y de control, provoca la aparición de múltiples mutaciones. Ambos alelos deben estar alterados para que se produzca el resultado.

Epigenética

La epigenética estudia y recoge los mecanismos moleculares que alteran la expresión del gen sin alterar la secuencia del DNA. Esto se consigue con varios mecanismos:

- **La metilación de DNA de las islas CpG dentro de las regiones promotoras de los genes.** Consiste en una añadir de forma covalente un grupo metil en el carbono 51 del anillo de la citosina, transformándola en 5'metilcitosina, en las secuencias 5'-CG-3'. La hipermetilación está presente en la neoplasia de

una forma transversal, de manera que muchos genes estarán hipermetilados aunque el impacto funcional sólo dependa de unos cuantos. Aunque es muy habitual que la hipermetilación se asocie a inactivación de genes supresores de tumores, no todos los genes hipermetilados serán supresores. Este mecanismo puede involucrar genes en todas las localizaciones cromosómicas y en todas las vías celulares conocidas: regulación del ciclo celular, reparación de DNA, apoptosis, angiogénesis, invasión local o a distancia... La regulación por hipermetilación se combina con mutaciones génicas en la génesis y progresión del cáncer. Un ejemplo clarificador es el del **MGMT** (*O-6-methylguanine DNA methyltransferase*), un gen que codifica una proteína reparadora de DNA; la hipermetilación del gen MGMT inactiva la expresión y provoca una disminución en la reparación de las transiciones de guaninas a adeninas en el oncogén KRAS y en el gen supresor de tumores p53, en consecuencia, aumentarán las mutaciones activadoras o represoras en ambos genes(103).

Los mecanismos de silenciamiento por hipermetilación son dos: interferencia directa del grupo metil en la unión de las proteínas reguladoras y el DNA y la atracción del CpG metilado a determinadas proteínas(52).

- **La hipometilación**, la presencia de un bajo número de metilaciones de las citosinas de las islas CpG respecto a la situación basal habitual. La hipometilación en cáncer se asocia a inestabilidad cromosómica, a activación de elementos de transposición y a pérdida de la huella (*imprinting*) genómica. Se producen más reordenamientos cromosómicos y más recombinación mitótica. El grado de hipometilación aumenta a medida que pasamos de una proliferación celular benigna a una neoplasia invasiva.
- **La modificación postranslacional de los extremos de las histonas** (acetilación, fosforilación, metilación, ubiquitinización) influye en la regulación transcripcional.
- Los **miRNAs** (*microribonucleic acid*) o microRNAs son unos pequeños fragmentos (22 bp) de RNA no codificante que están involucrados en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional, por apareamiento de bases específico de secuencia en la región 3' del RNA mensajero (mRNA). Esto producirá la degradación del mRNA y también inhibición de la síntesis de proteínas. Los miRNAs actúan como genes supresores de tumores y también están implicados en la apoptosis(103,104). La metilación de DNA de los genes de los microRNA está implicado en la neoplasia: el miRNA 34a, b/c hipermetilado se ha asociado a neoplasia y el miRNA 212 también(52,105-107).

Marcadores moleculares en el carcinoma pulmonar

Un marcador molecular es un cambio genético o molecular que puede ser detectado en asociación al riesgo, presencia, status y comportamiento futuro de la neoplasia. Los marcadores pueden tener un valor pronóstico, siendo indicadores de la agresividad innata de la neoplasia o pueden tener un valor predictivo, en relación a la respuesta o no a un tratamiento. Todas aquellas moléculas que de una forma u otra se han asociado a la neoplasia son potenciales marcadores moleculares.

En el CPNCP se ha estudiado la presencia y los niveles de diversos marcadores moleculares en el tumor, en ganglios linfáticos y en suero. Se ha asociado la presencia de marcadores con la recurrencia, la supervivencia y la afectación ganglionar de la neoplasia. Así, se han evaluado como parte de la monitorización postoperatoria.

Se han empleado principalmente 3 métodos para recoger la expresión de marcadores moleculares en tumor y ganglios torácicos. Por una parte la inmunohistoquímica, con abundante bibliografía, incluso en marcadores embrionarios. El marcador SOX2 se ha evaluado mediante inmunohistoquímica en tumor primario tipo adenocarcinoma y se ha evidenciado que los pacientes con una alta expresión de SOX2 presentaban peor supervivencia y peor intervalo libre de enfermedad(108).

Por otra parte está la PCR (*polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa). Esta última técnica permite amplificar y detectar pequeñas cantidades de DNA. La amplificación generada por la PCR puede estar precedida por la transcripción inversa del mRNA en DNA complementario (cDNA). Esta técnica se conoce como RT-PCR (*reverse transcription* PCR). La RT-PCR es mucho más sensible que la inmunohistoquímica. La RT-PCR en tiempo real (*real-time quantitative* RT-PCR, RT-qPCR) permite saber los niveles de expresión génica, pudiendo diferenciar entre las células sanas y las tumorales o entre diversos grupos de tumores. Esta técnica se ha demostrado como una herramienta útil para localizar o detectar células tumorales, dado que el RNA fuera de la célula se degrada rápidamente. La detección de niveles de RNA como en el tumor, pero en otro tejido, es un indicador indirecto de la presencia de células tumorales. La desventaja del mRNA es que la demostración de la expresión del RNA no es suficiente para demostrar la síntesis y la actividad de la proteína asociada.

Finalmente, los *microarrays*, una superficie sólida donde están añadidas pequeñas porciones de DNA de diversos genes. Los *microarrays* permiten evaluar la expresión génica a gran escala, de forma simultánea, y detectar aquellos que potencialmente podrían ser evaluados como marcadores. A partir de aquí se pueden realizar modelos de riesgo agrupando los marcadores. Los *microarrays* también permiten genotipar múltiples regiones del genoma.

Otros métodos para detectar marcadores moleculares son el MLPA (*multiplex ligation dependent probe amplification*), el FISH (*fluorescence in situ hybridization*), CISH (*chromogenic in situ hybridization*) o la citometría de flujo. Por otra parte, el análisis con *NanoString nCounter*[®] en cáncer de pulmón también ha permitido evaluar a gran escala los genes implicados.

En las tablas 10 y 11 presentamos los marcadores moleculares usados habitualmente en la clínica, los marcadores evaluados en ensayos clínicos y los evaluados en estudios clínicos de forma experimental.

MARCADORES MOLECULARES EN EL CARCINOMA PULMONAR					
Marcador	Muestra	Histología	Utilidad	Acción	Mecanismo
MARCADORES IMPLEMENTADOS EN LA CLÍNICA					
EGFR	Tumor	Adenocarcinoma	Predictiva	Oncogén	Mutación
ALK-EML4	Tumor	Adenocarcinoma	Predictiva	Oncogén	Translocación
PD1*	Tumor	CPNCP (CE)	Predictiva	Inmunomodulador	Inmunomodulación
MARCADORES EVALUADOS EN ENSAYOS CLÍNICOS					
PDL1	Tumor	CPNCP	Predictiva y pronóstica	Inmunomodulador	Inmunomodulación
KRAS	Tumor	Adenocarcinoma	Control enfermedad	Oncogén	Mutación
ERBB2	Tumor	Adenocarcinoma	Predictiva	Oncogén	Mutación
BRCA1	Tumor	CPNCP	Pronóstica y predictiva	Reparación DNA	Expresión
ROS1	Tumor	Adenocarcinoma	Predictiva y pronóstica	Oncogén	Translocación
RET	Tumor	Adenocarcinoma	Predictivo	Oncogén	Fusión

Tabla 10. Principales marcadores moleculares evaluados en el carcinoma pulmonar (93-95, 109-113 y Sánchez Torres, *Plenary Session & VII Educational Symposium of the Spanish Lung Cancer Group*, 2014).*: en fase de implementación.

Driver oncogenes

Los *driver oncogenes* son genes que presentan mutaciones, translocaciones u otras modificaciones génicas que le confieren a la célula una ventaja proliferativa respecto al resto; por tanto, estas alteraciones ocurren en genes que codifican proteínas de señal cruciales para la proliferación y supervivencia celular. Estas mutaciones pueden presentarse en oncogenes o en genes supresores de tumores; a este fenómeno se le denomina la adicción oncogénica. Los driver genes pueden localizarse en más de 12 vías intracelulares que regulan el ciclo celular y la supervivencia.

EGFR, epidermal growth factor receptor

Como ya hemos apuntado previamente, EGFR es un receptor de membrana tipo tirosina quinasa que activa unas vías intracelulares que finalizan en la promoción de la proliferación celular, la angiogénesis, la apoptosis y la migración celular.

Las alteraciones moleculares del *EGFR* han sido ampliamente estudiadas, tanto

MARCADORES MOLECULARES EN EL CARCINOMA PULMONAR					
MARCADORES EVALUADOS DE FORMA EXPERIMENTAL					
Marcador	Muestra	Histología	Utilidad	Acción	Mecanismo
BRAF	Tumor	Adenocarcinoma	Pronóstica	Oncogén	Mutación
Ki-67	Tumor	Escamoso	Pronóstica	Proliferación	Sobreexpresión
HIF1A	Tumor	Cáncer Pulmón	Pronóstica	Oncogén	Sobreexpresión
PIK3CA	Tumor	Escamoso	Pronóstica	Oncogén	Sobreexpresión
FOXO3	Tumor	CPNCP	Predictiva	Apoptosis	Sobreexpresión
BCL2L11	Tumor	CPNCP	Predictiva	Apoptosis	Sobreexpresión
HES1	Tumor	CPNCP	Predictiva	Oncogén	Sobreexpresión
ERCC1	Tumor	CPNCP	Pronóstica	Reparación DNA	Sobreexpresión
RRM1	Tumor	CPNCP	Pronóstica	Supresor tumor	Sobreexpresión
p53	Tumor	CPNCP	Pronóstica	Supresor tumor Oncogén	Mutación
REG1A	Tumor	CPNCP	Pronóstica	Oncogén	Sobreexpresión
PIM1	Tumor	CPNCP	Pronóstica	Supresor tumor	Infraexpresión
DYRK2	Tumor	CPNCP	Pronóstica y predictiva	Supresor tumor	Expresión
BCL2	Tumor	CPNCP	Pronóstica	Apoptosis	Infraexpresión
β-tubulina	Tumor	CPNCP	Pronóstica	-	Expresión
E-selectina	Suero Tumor	CPNCP	Pronóstica	Supresor tumor	Infraexpresión
MET	Suero Tumor	CPNCP	Pronóstica	Oncogén	Expresión
Osteopontina	Suero Tumor	CPNCP	Pronóstica	Oncogén	Sobreexpresión
CD44	Suero Tumor	CPNCP	Pronóstica	Oncogén	Expresión
SFTPA	Suero	CPNCP	Pronóstica	Oncogén	Sobreexpresión
TPA (KRT8, 18, 19)	Suero	CPNCP	Pronóstica/Resecabilidad	Oncogén	Sobreexpresión
VEGFC	Suero	CPNCP	Pronóstica	Oncogén	Sobreexpresión
TK1	Suero	Cáncer pulmón	Pronóstica	Oncogén	Sobreexpresión

en los puntos donde se producen las mutaciones en el gen, como en su conformación resultante tras las mutaciones como proteína transmembrana, en su repercusión en la cascada intracelular y en el análisis de alteraciones moleculares asociadas a sensibilidad o resistencia a las drogas que se han diseñado contra el *EGFR* mutado.

EGFR puede estar activado de tres maneras: por una sobreexpresión de la proteína *EGFR* (40-80% de los CPNCP), por un aumento de las copias de *EGFR* y por mutaciones. *EGFR* es el tercer gen más mutado en los adenocarcinomas, después de *p53* y *KRAS*, habitualmente se presenta en un 5-20% de la po-

Tabla 11. Principales marcadores moleculares evaluados en el carcinoma pulmonar de forma experimental (51,114-126).

blación occidental, llegando al 60,5% en los pacientes coreanos. La mutación se produce entre el exón 18 y el 21, afectando a la región tirosina quinasa; específicamente, las mutaciones con sensibilidad a drogas se localizan en el exón 19 (pequeñas deleciones que afectan a 3 aminoácidos) y en el exón 21 (mutación puntual L858R).

Los pacientes con *EGFR* mutado presentan una tasa de respuesta del 70% a los inhibidores de la tirosina quinasa específicos para *EGFR* (principalmente erlotinib o gefitinib), los cuales se unen a los sitios de unión ATP (*adenosine triphosphate*) del *EGFR*. Es por ello que ya está aceptado como primera línea de tratamiento en pacientes con estadio avanzado. Como era de prever, han aparecido resistencias adquiridas a los TKIs, basadas en mutaciones del exón 20 [pequeñas inserciones en T790M(metionina), representando el 3-5% de todas las mutaciones del *EGFR* y el 60% de las resistencias por mutación, asociada como L(leucina)858R(arginina) a activación de β -catenina y ***AXIN2***], ampliificaciones de *MET*, transformación de CPNCP en CPCP, pérdida del alelo mutado de *EGFR* o la activación de AXL (90,113,127-129). Se han propuesto fármacos de segunda línea (afatinib, dacomitinib) y de tercera línea (AZD9291, C01686, HM61713) para superar estas resistencias, mejorando el acoplamiento del fármaco al receptor.

El análisis molecular de este marcador predictivo es actualmente de rutina en la asistencia clínica de pacientes con neoplasia pulmonar no célula pequeña en estadio avanzado.

El *EGFR* no es el único receptor tirosina-quinasa implicado en la neoplasia de pulmón, otros receptores también están implicados, en muchas ocasiones con señales autocrinas, pudiendo servir también como marcadores moleculares.

ALK, anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

ALK es un receptor tipo tirosina quinasa que no se encuentra expresado normalmente en el pulmón normal. Este enzima se encuentra originalmente en los linfomas de células grandes anaplásicos como una proteína quimérica producida después de translocación cromosómica. En 2007 se descubrió la fusión de *ALK* con *EML4* en el CPNCP. Esta fusión es el resultado de pequeñas inversiones en el brazo corto del cromosoma 2 y se detectan con FISH en el 3-7% de los CPNCP, fundamentalmente adenocarcinomas. Estas fusiones se transcriben como una proteína que se oligomeriza y se activa de forma constitutiva.

Este marcador predictivo es más frecuentes en varones jóvenes, no o poco fumadores y sin mutación de *EGFR* y *KRAS* y presentan una diana terapéutica, el crizotinib, con excelentes resultados.

La *American Society of Clinical Oncology* recomienda evaluar la mutación de *EGFR*, la translocación de *ALK* o la mutación de *KRAS* en pacientes con estadio avanzado

y adenocarcinoma. Por tanto, el *ALK* está instaurado en la práctica clínica diaria como marcador predictivo y diana terapéutica. Salvo casos con sospecha clínica fundada, el test molecular empieza con la evaluación de *EGFR*, sobretodo, o *KRAS* y si son negativas, se evalúa *ALK*(128).

KRAS, kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

KRAS es un oncogén y está mutado en el 20-30% de los casos de CPNCP, siendo el segundo gen más mutado en adenocarcinomas. En los carcinomas escamosos, las mutaciones llegan al 6%. Las mutaciones se localizan en 3 codones, pero sobretodo en el codón 12 y 13 y son mutuamente excluyentes con las del *EGFR*.

Los pacientes mutados suelen ser fumadores (*KRAS* 25% mutado vs 6% en no fumadores), presentan peor pronóstico y son resistentes a quimioterapia y a TKIs. Las mutaciones de *KRAS* se pueden tratar con la combinación de los inhibidores de **MEK** (*mitogen-activated protein kinase kinase*) y con los inhibidores de *PIK3CA* o **AKT1** (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*). El tratamiento se asocia a un mejor control de la enfermedad pero no mejora el tiempo libre de enfermedad ni la supervivencia global. Los inhibidores de *PIK3CA* o *AKT1* más el inhibidor de **MAP2K** (*mitogen-activated protein kinase kinase*) selumetinib interfieren en las vías derivadas de *KRAS*; **FOXO3** (*forkhead box O3*) y *BCL2L11* podrían ser marcadores predictivos de respuesta a estos inhibidores. **HES1** (*hes family bHLH transcription factor 1*) también podría ser un marcador de respuesta a fármacos versus *KRAS*(113,127).

ERBB2, HER2, erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

ERBB2, *HER2* es un receptor tirosina quinasa y está sobreexpresado en el 20% de los pacientes con CPNCP, aunque la amplificación génica sólo está presente en el 2% de los casos. Suelen presentarse en mujeres no fumadores, asiáticas y con adenocarcinomas. Las mutaciones de *HER2* están presentes en pacientes sin mutación de *EGFR* o *KRAS*. Varios fármacos antiHER2 se han usado en CPNCP, con resultados discretos(130).

ROS1,

ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase

ROS1 es un receptor tirosina quinasa que se ha evidenciado como marcador pronóstico en neoplasia de pulmón. Las translocaciones cromosómicas que engloban *ROS1* se están utilizando en ensayos clínicos como marcador de respuesta a fármacos como el crizotinib(131).

BRCA1, breast cancer 1, early onset

BRCA1 está implicado en la reparación de DNA. La sobreexpresión de *BRCA1* está asociada a peor pronóstico(111). El Grupo Español de Cáncer de Pulmón ha diseñado un estudio (SCAT, *Spanish Customized Adjuvant Treatment*) en el que el esquema de quimioterapia se ha basado en los niveles de *BRCA1*, en

pacientes tratados mediante cirugía radical y estadio II y III. Por tanto, se ha utilizado utilizando BRCA1 como marcador predictivo, además del valor pronóstico ya conocido.

ERCC1, excision repair cross-complementation group 1

ERCC1 también está implicado en la reparación de DNA. Inicialmente se observó que la sobreexpresión de ERCC1 estaba asociada a mejor supervivencia (mediana de 94,6 meses vs 35,5 meses, $p=0,01$) pero posteriormente Rosell y colaboradores evidenciaron ERCC1 asociado a peor pronóstico.

RRM1, ribonucleotide reductase messenger 1

RRM1 es el componente regulador de la ribonucleótido-reductasa y cataliza la formación de desoxiribonucleótidos a partir de nucleótidos. RRM1 también induce PTEN e impide así la migración celular y la diseminación a distancia. La sobreexpresión de RRM1 se ha asociado a mayor tiempo libre de enfermedad (>120 meses vs 54,5 meses, HR *-hazard ratio-* 0,46, $p=0,004$)(113).

PIK3CA, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PIK3CA se encuentra mutada en menos del 5% de los adenocarcinomas y los carcinomas escamosos y pueden presentarse concomitantemente con la mutación del *EGFR*. Las amplificaciones de *PIK3CA* se asocian a varones, fumadores y con carcinoma escamoso. La sobreexpresión de *PIK3CA* se asocia a peor pronóstico. *PIK3CA* está regulado por **PEA15** (*phosphoprotein enriched in astrocytes 15*), favoreciendo su acción.

p53

El gen supresor de tumores más mutado en las neoplasias y en el CPNCP (32% de los casos), sobretodo en los adenocarcinomas, ha sido ampliamente estudiado. *p53* presenta tres funciones principales: regula el ciclo celular, induce la apoptosis y estabiliza el genoma mediante la reparación de DNA. La mutación y la sobreexpresión de *p53* confiere mal pronóstico(113), aunque mayor respuesta a quimioterapia. Esta aparente contradicción en torno a *p53* se debe a que existen dos tipos de mutación: las disruptivas, que provocan un truncado de la proteína o un cambio conformacional que no permite la unión al ligando (región L2-L3), mediana de supervivencia 26 meses, y las no disruptivas, que provocan un aumento de función y paradójicamente activan la progresión tumoral(132), asociadas a menos supervivencia mediana: sólo 13 meses(133).

Ki-67

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear implicada en la regulación de la proliferación celular que sólo se expresa en células en fase de proliferación o mitosis, sobretudo en células epiteliales. Está presente en varias neoplasias, entre ellas el CPNCP y su detección se realiza por inmunohistoquímica. Los pacientes con carcinoma escamoso, mayores de 4 cm pero pT2, poco diferenciados (G3-4) y SUVmax del PET-TC >17 g/mL se asocian a Ki-67 $\geq 25\%$. Los pacientes con Ki-67 $\geq 25\%$ tienen el doble de riesgo de recidiva y que ésta se produzca en menos de 6 meses y el triple de riesgo de mortalidad por neoplasia y una esperanza de vida 4 meses menor que los pacientes con Ki-67 bajo(51).

Marcadores embrionarios

La hipótesis que los mecanismos implicados en la organogénesis se presentan también en la carcinogénesis ha sido presentada en varias ocasiones. Esto es debido a que se han evidenciado similares características y firmas genéticas compartidas entre ambos procesos, con ejemplos varios, entre ellos, el cáncer de pulmón. Borczuk y colaboradores realizaron un interesante estudio basado en *microarrays* comparando los genes expresados por el cáncer de pulmón versus los genes expresados por el pulmón en desarrollo murino, determinando previamente dos *clusters* de genes del desarrollo, los correspondientes a la fase pseudoglandular y canalicular y los correspondientes a la fase de los sacos terminales y alveolar. Estudios previos han evidenciado que los genes relevantes en el desarrollo pulmonar se mantienen conservados entre las especies. Así, los adenocarcinomas expresan patrones de genes de la etapa de los sacos terminales y alveolar, mientras que el carcinoma indiferenciado de célula grande expresan genes de la época pseudoglandular y canalicular. El carcinoma escamoso, por su parte, expresaba genes de ambos *clusters*(134,135).

Navarro, Marrades, Monzó y colaboradores han realizado estudios sobre el patrón de expresión de miRNA durante la embriogénesis pulmonar, el pulmón normal adulto y el tumor, evidenciando que diversos marcadores, de la familia let-7, miR-17-92, miR-221 o *PIWIL1* (*piwi-like RNA-mediated gene silencing 1*) comparten expresión entre etapas concretas de la embriología pulmonar y la neoplasia. Algunos de estos marcadores, como *PIWIL1*, se han mostrado como factores independientes de peor pronóstico en pacientes con neoplasia de pulmón(136-138).

Liu y colaboradores compararon la expresión génica de tumores pulmonares humanos y de pulmones de ratón durante el desarrollo, evidenciando coincidencias en algunos genes. Se evidenció que, en relación con los genes, la neoplasia de pulmón era similar al pulmón murino en desarrollo, hecho ya reportado previamente. El metabolismo de las pirimidinas está acentuado en el pulmón en desarrollo y en el cáncer de pulmón. De un grupo de 100 genes implicados en el desa-

rollo, 48 están también implicados en carcinogénesis o metástasis, 6 genes están asociados con inhibición de la apoptosis y 9 con la disminución de la adhesión celular. **RRM1** (*ribonucleotide reductase M1*) es un ejemplo de gen implicado en ambos procesos (embriogénesis y metástasis) en el cáncer de pulmón(139).

La expresión tumoral de genes expresados en las épocas iniciales del desarrollo pulmonar se asocia a peor supervivencia, sobretodo en adenocarcinomas(139). Además, estos genes están frecuentemente expresados en tumores indiferenciados o tumores de tipo célula pequeña. Por tanto, es posible que células madre pulmonares o células progenitoras pulmonares, estén implicadas en el desarrollo de neoplasia pulmonar(140) y expresen patrones moleculares del desarrollo, los cuales nos pueden aportar información de cara a la progresión tumoral y la evolución clínica del paciente. Esta relación, en neoplasias hematológicas, está bien establecida. Las células madre y progenitoras pulmonares expresan p63, las citoqueratinas 5 y 14, CD133 (*prominin 1*, **PROM1**) y aldehído deshidrogenasa 1(128). En cambio, genes infraexpresados a nivel tumoral se expresaban en el desarrollo tardío del pulmón.

Durante la embriogénesis, los perfiles de expresión génica difieren entre tejidos, lo que hace específicos estos genes analizados y así puedan servir como marcadores moleculares embriológicos de estadiaje o recurrencia en el cáncer de pulmón. Los principales hallazgos de los marcadores embrionarios de interés se resumen en las tablas 12-14.

CEA, carcinoembryonic antigen (CEACAM5, CEA-related cell adhesion molecule 5)

El CEA ha sido un marcador bastante estudiado en neoplasia de pulmón, sobretodo en suero. También se ha estudiado en tumor, aunque menos; los datos más relevantes para esta tesis se exponen en la tabla 12.

Se ha apreciado elevación sérica preoperatoria del CEA en el 37% de los pacientes, así como la utilidad del CEA sérico para ayudar a predecir la reseccabilidad de la neoplasia(116,142). Se ha evidenciado disminución de sus valores tras la cirugía y un peor pronóstico en aquellos pacientes que presentaban CEA preoperatorio o postoperatorio elevado en suero, mostrándose como un marcador de recurrencia y progresión. Estos estudios estaban realizados fundamentalmente con adenocarcinomas. En cambio, otros estudios no evidenciaron CEA como factor pronóstico; significativamente, en algunos de estos estudios el tipo histológico más frecuente no era el adenocarcinoma. El CEA elevado en suero también presenta una mayor tendencia a la afectación ganglionar(186).

Recientemente, Yamazaki y colaboradores realizaron un interesante estudio donde apreciaron que una alta ratio de desaparición de la sombra tumoral (ratio entre el diámetro en la ventana pulmonar y en la mediastínica en el TC) presentaba menos riesgo de CEA preoperatorio elevado en suero, mientras que la presencia de bullas o panal en el TC se asociaban a un riesgo relativo 3 veces

MARCADOR	RESULTADOS	ESTUDIO
CEACAM5	<p>Elevación sérica del CEA preoperatorio, mal pronóstico (CEA elevado: 5 años OS 45%; CEA no elevado: 70-75%)</p> <p>CEA y CYFRA21-1 (índice de marcador tumoral: ≤ 1, 5 años OS 72%; > 1, 37%)</p> <p>Expresión en tumor primario: 70-100% (IH)</p> <p>Expresión en ganglio afecto: 74%</p>	<p>Grunnet 2012; Buccheri 2001; Okada 2004. Tomita 2010</p> <p>D’Cunha 2002; Maeda 2006. Bugalho 2013</p>
FGFR2b	<p>FGFR2b expresado en tumor primario: 50% (IH)</p> <p>La expresión confiere menor supervivencia</p> <p>FGFR2 mutación (D283N y W290C) y amplificación: 3% de los pacientes (carcinoma escamoso y CIGG)</p> <p>Expresión de FGFR2b, mejor supervivencia en carcinoma escamoso.</p> <p>FGFR2 mutado, asociado a activación o inhibición de MYC Promueve la quiescencia celular</p> <p>Fusiones FGFR2-KIAA 1967 en carcinoma escamoso Sobreexpresión induce proliferación celular</p> <p>Activación de la vía de FGFR, en carcinoma escamoso y CIGG</p> <p>Amplificación de FGFR1 en el 6,2% de carcinoma escamoso (muestras tumorales y líneas celulares)</p> <p>Amplificación y sobreexpresión tumoral de FGFR1</p> <p>Sobreexpresión de MYC en el 40% de pacientes con FGFR1 amplificado</p> <p>Amplificación de FGFR1 en el 18% de ganglios afectados Correlaciona con el tumor</p> <p>Fármacos antiFGFR: PD173074, ponatinib, dovitinib</p> <p>Otros (AZD4547, BGJ398, LY2874455, JNJ-42756493, FP-1039, ENMD-2076, brivanib, lenvatinib, nintedanib, lucitanib)</p>	<p>Behrens 2008</p> <p>Ota 2009</p> <p>Wu 2013</p> <p>Marek 2009 Weiss 2010</p> <p>Pros 2013 Malchers 2014</p> <p>Göke 2012</p> <p>Weiss 2010; Wynes 2014; Gozgit 2012; Kim 2013.</p>
FRS2	<p>Amplificación en neoplasia de pulmón</p> <p>Amplificación en carcinoma escamoso en 12p15</p> <p>FRS2, CCNI, EGFR, FGF19 y GREB1 en saliva Diferencian neoplasia de pulmón de controles sanos Sensibilidad: 94%, especificidad: 82%.</p> <p>FRS2 más expresado en saliva de paciente con neoplasia pulmón Sensibilidad: 59%, especificidad: 84%</p> <p>FRS3 regula a la baja la vía del EGFR</p>	<p>Chen 2014 Malchers 2014 Zhang 2012</p> <p>Sato 2009</p>

superior de CEA elevado. Estos resultados concordaban con el estudio de Okada, donde también el vidrio deslustrado tenía menos riesgo de CEA elevado. Por tanto, parece que los tumores sólidos por TC se asocian a CEA elevado y si los tumores están asociados a bullas pequeñas suelen ser más indiferenciados, como reporta Kaneda y colaboradores(187,188). A pesar de todos estos estudios, el CEA en suero no se usa habitualmente en clínica como marcador. Por otra parte, CEA presenta una baja expresión a nivel del ganglio normal y una moderada expresión en el pulmón normal.

Tabla 12. Visión global de los marcadores embrionarios CEACAM5, FGFR2b y FRS2 en la neoplasia de pulmón (66,116,141-159).

FGFR, fibroblast growth factor receptor

Las señales autocrinas y rutas FGFR dependientes están implicadas en el crecimiento de los CPNPC. En líneas celulares y muestras tumorales de cáncer de pulmón se expresan con frecuencia los ligandos **FGF2** (*fibroblast growth factor 2*) y **FGF9** (*fibroblast growth factor 9*). En cuanto a FGFR1, se han encontrado mutaciones somáticas que confieren aumento de función. En un estudio muy relevante de Weiss et al, se evidenció amplificación de *FGFR1* en el 22% de los carcinomas escamosos(147) a nivel de 8p12, en muestras tumorales y líneas celulares de carcinoma broncogénico. No obstante, esta región cromosómica presenta varios centros de amplificación, con una importante heterogeneidad genética, de manera que FGFR1 sólo está en el centro del amplicón en el 28% de los casos. Hay evidencia en líneas celulares que la expresión de FGFR1 regula al alza MYC y que la expresión de MYC podría ser un marcador de sensibilidad de FGFR1 a dianas terapéuticas(149). En el estudio de Weiss y colaboradores, la aplicación de un inhibidor de FGFR1, PD173074, inhibía el crecimiento e inducía apoptosis en aquellas líneas celulares con amplificación de *FGFR1*. También se ha demostrado la presencia de FGFR1 en líneas celulares con insensibilidad a gefitinib. En cuanto a los subtipos de FGFR1, tanto en líneas celulares como en muestras tumorales, el subtipo aislado fue el IIIc. Algunos estudios han relacionado la expresión de FGFR1 con peor evolución, mientras que otros evalúan el número de copias de *FGFR1* sin unos resultados concluyentes.

FGFR2, por su parte, es más frecuente en el carcinoma escamoso y en el CIGC; menos frecuentemente se ha encontrado en adenocarcinomas y carcinoma de célula pequeña(147). La expresión de FGFR2 se ha visto independiente de la sensibilidad o insensibilidad de las líneas celulares al gefitinib, expresando tanto el subtipo IIIb como del subtipo IIIc. A pesar de su rol durante la embriogénesis, no se ha encontrado coexpresión de FGF7, FGF10 y FGFR2-IIIb en células tumorales(146), mientras que FGFR2-IIIc se coexpresa frecuentemente con FGF2 y FGF9.

Teniendo en cuenta todos los datos anteriores, se ha postulado que la vía FGF-FGFR podría ser un camino alternativo al EGFR que utilizara la célula tumoral y que explicara la resistencia de algunos tumores y líneas celulares a los inhibidores de la tirosina quinasa versus EGFR, principalmente en carcinomas escamosos y carcinomas indiferenciados de célula grande. Otros estudios han contradicho estos resultados, pero las series utilizadas eran fundamentalmente de adenocarcinomas. Se ha postulado también que algún tipo de célula epitelial pulmonar o progenitor podría expresar FGFs y FGFRs y que estas células fueran el precursor de células tumorales con este fenotipo. En este sentido, algunos estudios han demostrado que células neoplásicas epiteliales transformadas guardan similitud con sus células epiteliales precursoras(189).

Las proteínas FGFR también se han asociado y estudiado en otras neoplasias, como en la neoplasia de próstata, vejiga, tiroides, cabeza y cuello, piel, mama, estómago, endometrio o en las neoplasias hematológicas(190). Los polimorfismos de un nucleótido (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) o las mutaciones sin sentido (*missense*) de FGFR están asociadas a cáncer de mama(11). Las

mutaciones en *FGFR2* también se asocian a cáncer gástrico, cáncer de ovario y cáncer de endometrio. Las mutaciones en el tercer dominio *Ig-like* activan *FGFR2* creando una señal en bucle autocrina, mientras que las mutaciones en el dominio tirosina quinasa eliminan la autoinhibición. La amplificación génica y la sobreexpresión de *FGFR2* también se ha detectado en cáncer gástrico, cáncer de mama y endometrio(191).

La transición epitelial-mesenquimal en nuestro caso se cristaliza en el cambio de *FGFR2b* a *FGFR2c*. Este cambio está asociado a progresión tumoral (mayor tendencia a la invasión y a la metástasis) en la neoplasia de próstata y de vejiga(10,11). También se ha visto este cambio de *FGFR2b* a *FGFR2c* en la neoplasia de ovario. El descenso de *FGFR3b* se ha asociado también a neoplasia de colon(10) y la infraexpresión de *FGFR2b* se ha asociado a peor pronóstico en pacientes con neoplasia de vejiga(192).

FRS2, fibroblast growth factor receptor substrate 2

No existe una abundante literatura sobre *FRS2* en neoplasia de pulmón, los principales hallazgos se resumen en la tabla 12. En estudios exploratorios para encontrar nuevos marcadores, se ha evidenciado amplificación del número de copias (10-20) de *FRS2* en neoplasia en general y en neoplasia de pulmón en particular(156).

FRS2 presenta dos subunidades, α y β . **FRS2B** (*fibroblast growth factor receptor substrate 2 beta*, *FRS3*) está infraexpresado en líneas celulares de neoplasia de pulmón, regulando a la baja las vías *EGFR*. Este papel de *FRS2B* como gen supresor de tumores está pendiente de nuevos y específicos estudios(158). A pesar de no existir abundante literatura, hay algunos grupos estudiando el efecto inhibitorio de *PD173074* sobre *FRS2*.

FRS2 se ha evaluado en modelos murinos de cáncer de mama, probando inhibidores de la cascada *FGFR-FRS2-ERK* y también en líneas celulares, donde la expresión de un determinado dominio de *FRS2* inactivaba la proteína y el crecimiento celular. También se ha estudiado en neoplasia de próstata con modelos *knockout* murinos, inhibiendo la carcinogénesis y aumentando la supervivencia; en glioblastomas, se ha evidenciado la presencia de sobreexpresión de *FRS2* ligado a la presencia de células madre del cáncer y en liposarcomas está sobreexpresado por la amplificación de 12q11-21. Otros tumores donde también se ha evaluado son el mieloma y la neoplasia de vejiga.

MYCN, v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog

Los genes *MYC* se han relacionado con neoplasia y neoplasia de pulmón, sobre todo carcinoma de célula pequeña, expresando mayor agresividad. No obstante, *MYC* también tiene un papel regulador negativo, pues activa la proteína quinasa **AMP**-activada (*adenosine monophosphate*) que provoca la acumulación de *p53* en la mitocondria, la liberación de **BAK1** (*BCL2-antagonist/killer 1*) y la

apoptosis. Así, **FBXW7** (*F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase*) causa resistencia a imatinib en la leucemia mieloide crónica reduciendo MYC y manteniendo las células leucémicas iniciadas.

A MYCN se han asociado genes supresores de tumores, como **BRG1** (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4*, **SMARCA4**), el cual es un componente central del complejo **SWI** (*switching*)/**SNF** (*sucrose non-fermenting*). Este complejo remodela la cromatina y así activa o reprime según convenga. MYC se heterodimeriza con MAX para activar la transcripción celular y BRG1 regula MAX a través de su promotor, de manera que actúan sinérgicamente. MAX está inactivado en algunos CPCP y esta inactivación se asocia a inactivación de **BRG1**. La restitución de MAX o de BRG1 en cultivos celulares provoca un descenso de la población celular tumoral. La reducción de factores asociados a MYCN, como *N-myc downstream regulated 1* y *NDRG family member 2* (**NDRG1 y 2**), también se asocia a neoplasia y de peor pronóstico en pacientes con adenocarcinoma pulmonar(193). *Omomyc*, **BET** (*bromodomain and extraterminal*) *Bromodomain inhibitor* y los *aurora kinase inhibitors* son inhibidores de MYC.

Hoang y colaboradores realizaron un estudio basado en *microarrays* comparando los perfiles de expresión en tumor y ganglio linfático afectado apareado (11 casos). Se apreció que los ganglios metastásicos podían tener dos patrones: ser diferentes a los tumores primarios por unos pocos genes o ser genéticamente similares a los tumores primarios. Se detectaron 27 marcadores con diferente expresión en tumor y ganglio afectado. Algunos marcadores estaban elevados en tumor respecto al ganglio, mientras que otros estaban disminuidos. Entre los primeros, se encontraba MYCN, en una proporción 5,19 veces superior en el tumor que en los ganglios(165).

En otras neoplasias, MYCN está típicamente sobreexpresado: en el meduloblastoma, en neuroblastomas (30% de ellos presentan amplificación o sobreexpresión y se asocian a peor pronóstico con progresión más temprana), en el glioblastoma, en el retinoblastoma, y en ciertos tumores embrionarios(194).

C-MYC regula el crecimiento celular y se asocia a neoplasia de pulmón con peor pronóstico. C-MYC está implicado con **CRAF** (*Raf-1 proto-oncogene, serine threonine kinase*, **RAF1**) en la afectación ganglionar y la producción de metástasis hepáticas en ratón y en líneas celulares de CPNCP. C-MYC no puede actuar sólo, si no que precisa de la cooperación de RAF1, KRAS o **LKB1** (*serine/threonine kinase 11*, **STK11**)(195). La acción de C-MYC está mediada por el miRNA184 o el miRNA29b.

SFTPC, surfactant protein C

SFTPC está más expresado en adenocarcinomas bien diferenciados, no en vano, se ha detectado que los neumocitos tipo II producen hiperplasias adenomatosas atípicas y adenocarcinomas(197). Otros estudios relacionan la pérdida del SFTPC habitual segregado por el neumocito tipo II como un evento asociado a estadios más avanzados. El **PLAGL2** (*pleiomorphic adenoma gene-like 2*),

que se encuentra en la cascada del SFTPC se ha asociado a enfisema y a neoplasia pulmonar. FGF también interviene en la producción de adenocarcinomas positivos para SFTPC.

La SFTPC en el CPCP se asocia a transición mesenquimal-epitelial, con un fenotipo de menor motilidad y mayor estabilidad celular en el estroma (171).

Otras proteínas similares a SFTPC se han evaluado en plasma de pacientes con y sin neoplasia de pulmón. Los pacientes con determinados niveles de **proSpB** (*precursor surfactant B*) en plasma tenían un riesgo relativo 2,2 veces superior de presentar neoplasia de pulmón con un VPN del 98%. ProSpB también se asociaba a estadios tempranos y preveía más de un año antes el diagnóstico posterior de neoplasia(198). ProSpB podría relacionarse con entidades inflamatorias que ayudaran al desarrollo de la neoplasia, como el EPOC. A su vez, SFTPB se ha asociado a adenocarcinoma.

Tabla 13.

Visión global de los marcadores embrionarios MYCN, SFTPC y SHH en la neoplasia de pulmón (26,118,160-177).

MARCADOR	RESULTADOS	ESTUDIO
MYCN	Mayor agresividad en CPCP Amplificación de MYC en 10-33% de CPCP (más que en CPNCP) Sobreexpresión y fusión de <i>MYC-PVT1</i>	De Cássia 2014; Collison 2014; Iwakawa 2013.
	BRG1 regula a la baja MYCN BRG1 inactivado en el 12-15% de las líneas celulares BRG1 ausente, tumores más agresivos	Romero 2014; Romero 2014.
	MYCN elevado 5 veces en el tumor respecto ganglios afectos	Hoang 2005
	C-MYC Amplificado en 2,4% y aumento de copias en 20% de los tumores Menor TLE y OS en adenocarcinomas y en EGFR mutados Promueve afectación ganglionar y metástasis hepáticas (ratón)	Seo 2014
SFTPC	Expresión tumoral en adenocarcinoma lepidico: 100% (IH) Deleción de SFTPC en tumor: 71% Expresión sérica de SFTPC en un 14% de neoplasias pulmón Mayor tendencia a T3, N3 y/o M1	Zhang 2010 Li 2007; Kim 2005. Yamamoto 2005
	Asociada a células madre del cáncer en un 91% de los adenocarcinomas SFTPC en CPCP: menor agresividad, mayor diferenciación	Zhang 2009 Chen 2007
	Expresión tumoral en neoplasia pulmón: 87-97% (IH), 63% (RT-qPCR). Expresión tumoral en carcinoma escamoso: 90-95% (IH) Expresión tumoral en adenocarcinomas: 95% (IH) GLI1: 32-87% (IH) y 44% (RT-qPCR) de las neoplasias; 61-91% (IH) de los carcinomas escamosos.	Gialmanidis 2009 Hong 2014
	La inhibición de SHH/GLI en líneas celulares disminuye la migración celular (vismodeglib y un inhibidor de GLI) Expresión de SHH por IH asociado a CPCP Regula al alza MYCN, aumenta la proliferación celular	Yue 2014; Raz 2012; Bermúdez 2013. Watkins 2003 Kato 2009

SHH, sonic hedgehog

La expresión de SHH se ha apreciado durante las primeras fases del desarrollo embrionario, en células madre en el adulto y en el desarrollo de neoplasia pulmonar. En los últimos años, se ha estudiado de forma creciente. SHH activa a **PRKCI1** (*protein kinase C iota lambda*), que activa a su vez la vía de GLI y transloca a esta proteína al núcleo para activar la transcripción de los genes asociados a SHH: SOX2, **SOX9** [*SRY (sex determining region Y)-box 9*], **CXCR4** [chemokine (C-X-C motif) receptor 4] y FGF19. SOX2 y 9 son dos factores de transcripción nuclear asociados al destino proliferativo de células madre. GLI1 también interacciona con EGFR, con la vía RAS-MAPK y PIK3CA-AKT1 y también con TGF β . La cooperación entre SHH y GLI1-EGFR inducen la transformación maligna de la célula(26) y la regulación negativa de SHH puede evitar o minimizar esa transformación.

SHH es un marcador más asociado a carcinoma escamoso y a CPCP, a este último por la capacidad de SHH de activar la proliferación de células neuroendocrinas(26). SHH y GLI se expresan asociados, así como SHH y **FOXM1** (*forkhead box M1*) y todos ellos están implicados en la proliferación neoplásica. A pesar que la sobreexpresión del SHH y de los receptores PTCH1 y SMO se asocia a afectación ganglionar, esta activación SHH-SMO-cascada GLI no se asocia a peor tiempo libre de enfermedad (TLE) ni peor supervivencia global (OS) en estadios I y II. Además, se ha visto que la sobreexpresión de SHH en neoplasia de pulmón puede iniciarse antes que la sobreexpresión de otras moléculas de la cascada; eso implica que el impacto clínico de SHH, mediado por GLI1, 2 ó 3, estaría más presente en estadios avanzados. En otras neoplasias en estadios avanzados, también se ha asociado SHH y peor pronóstico: vejiga, adenocarcinoma pancreático o meduloblastoma.

Respecto la transición epitelial-mesenquimal, en carcinoma escamoso de pulmón, parece que SHH se asocia a migración celular, recurrencia y metástasis a través de la regulación a la baja de las E-cadherinas. En cambio, en neoplasia pancreática no queda claro si SHH/GLI activa la EMT o la inhibe.

Las vías intracelulares dependientes de SHH, así como la de WNT (comparten GLI1), EGF y NOTCH pueden estar asociadas con la resistencia a EGFR-TKIs y parece que **MED12** (*mediator complex subunit 12*) ejerce de centro de conexión integrativo.

SHP2, Shatterproof 2, o PTPN11, Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11

SHP2 es una proteína que tiene un papel activador y también inhibidor del crecimiento tumoral. Los hallazgos en uno u otro sentido se exponen a continuación y en la tabla 14, primero de la neoplasia de pulmón y luego de otras neoplasias.

SHP2 interviene en la vía del FGFR y del EGFR(180,181), siendo el punto compartido crucial la activación de STAT3. En caso de inhibición por gefitinib de la cascada del EGFR, ésta se activa a través de FGFR2 e **IL6** -*interleukin 6*- (en estudios *in vitro*, tras 9 días de tratamiento con gefitinib, aumenta el mRNA de **BIM** -*BCL2-like 11 apoptosis facilitator*, **BCL2L11**-, disminuye SHP2, pero STAT3 continúa aumentando). Esta interrelación FGFR-EGFR permite la resistencia al tratamiento con inhibidores de TKs. Así, se ha propuesto el tratamiento con EGFR TKIs e inhibidores de STAT3 [TPCA1 -2-[(*aminocarbonyl amino*]-5-(4-*fluorophenyl*)-3-*thiophenecarboxamide*- o, niclosamida] o EGFR TKIs e inhibidores de AXL/**MER** (*MER proto-oncogene, tyrosine kinase*, **MER-TK**). El gefitinib disminuye SHP2 y el descenso de SHP2 aumenta la actividad del gefitinib.

Por otra parte, también en la línea celular de cáncer de pulmón H292, se ha evidenciado una regulación tumoral por parte de SHP2, de forma que las células *knockdown* de *SHP2* se encuentran más en la fase celular G1 (*gap 1*, crecimiento celular) y menos en la S (*synthesis*, replicación de DNA). Así mismo, presentan aumento de p27, paxilina (*paxilin*, **PXN**), GAB1 y **CDK1** (*cyclin-dependent kinase 1*) **T**(treonina)**14/Y**(tirosina)**15** y disminución de C-MYC, SRC y ERK. En la misma línea, las células Ki-67 positivas eran menos frecuentes y más esporádicas. De hecho, los patrones de C-MYC y Ki-67 son superponibles por inmunohistoquímica(17). La expresión de SHP2 se correlaciona con la de C-MYC, tanto en líneas celulares como en xenotumores.

No obstante, el aumento de GAB1 tirosina-fosforilada con la inhibición de SHP2, que se encuentra en la cascada FGFR2-FRS2-GAB-PI3K/AKT podría indicar una acción supresora de tumores. En este sentido, existe literatura contrapuesta, dado que también se ha evidenciado que la *SHP2* mutada presenta una unión prolongada y activadora con GAB1(17). A favor de la acción supresora de tumores, recordar que la ausencia de SHP2 en células madre está asociada a persistencia del patrón de indiferenciación celular y un aumento de la capacidad de autorenovación celular(21).

En relación con los tumores sólidos, SHP2 se ha relacionado con el cáncer de mama, con el cáncer gástrico, con el melanoma, el cáncer de colon y de tiroides, con el hepatocarcinoma, el neuroblastoma o el glioblastoma(19,22). El mecanismo por el cual SHP2 está implicada puede ser un aumento o descenso de la proteína normal (*wild-type*) o una mutación. Lo más habitual es una sobreexpresión de la proteína nativa(17), ya que la prevalencia de mutaciones en los tumores sólidos es baja. La mayor parte se encuentran en el N-SH2 o en el dominio PTP y son mutaciones que implican una actividad importante de SHP2(18).

En estudios en ratón y cáncer de mama, se ha asociado SHP2 como un promotor del mantenimiento tumoral, de la capacidad de invasión celular, de la pérdida de polaridad celular o de la capacidad de realizar metástasis pulmonares(22). Por otra parte, también en cáncer de mama, se ha evidenciado la activación de **GAB2** -*GRB2 associated binding protein 2*- (10-15% de los casos) y, por ende,

de SHP2. En muchos casos coopera con las PTKs para regular positivamente las ya conocidas cascadas de SRC y ERK.

No obstante, un estudio en ratones con hepatocitos *knockdown* de *SHP2* ha puesto de manifiesto la actividad como gen supresor de tumores. La delección de *SHP2* de los hepatocitos activaba la cascada proinflamatoria de STAT3, la inflamación y necrosis de los hepatocitos, una hiperplasia regeneradora y la producción de hepatocarcinomas. Si a los ratones *knockdown SHP2* se les administraba un carcinógeno, los tumores eran de mayor tamaño y número. Si se realizaba un doble *knockdown* de *SHP2* y *STAT3*, la capacidad de generar hepatocarcinomas disminuía. Se han analizado hepatocarcinomas humanos y se ha constatado que un 11,5% presentan SHP2 ausente o reducida. Este rol dual de SHP2 (activador-inhibidor) es similar al que presentan otras moléculas de rutas como la **IKK** (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase*)/NFKB. Por otra parte, este estudio pone de manifiesto la importancia de las señales inflamatorias del ambiente en la carcinogénesis(20).

En relación con neoplasias hematológicas, SHP2 se ha relacionado con la leucemia mielomonocítica juvenil (35% de los casos). Este tipo de alteración hematológica cursa con proliferación de células mieloides y un aumento de producción de la hemoglobina fetal. La mutación que origina esta leucemia implica un cambio conformacional que impide la autoinhibición propia de la proteína normal en reposo(17). Otros síndromes hematológicos asociados son el síndrome mielodisplásico en la infancia, el linfoma de célula grande, la leucemia aguda linfoblástica y la leucemia aguda mielogénica pediátrica y del adulto.

SHP2 mutada también se ha detectado en patología no neoplásica, como el síndrome LEOPARD, con el síndrome de Noonan o con la metocondromatosis.

SOX17, sry-related HMG box transcription factor

La infraexpresión o la regulación a la baja de *SOX17*, produce neoplasia. Esta pérdida de expresión, en la neoplasia de pulmón, se produce por metilación de la región promotora de *SOX17*. La metilación está asociada a mujeres y tumores poco diferenciados. Además, la carcinogénesis, en modelos *in vitro*, se reduce añadiendo *SOX17*. Con estos datos, la metilación de *SOX17* podría ser una buena candidata a marcador de neoplasia pulmonar. La metilación de *SOX17* está relacionado también con el hepatocarcinoma, los tumores gastrointestinales como el carcinoma colorrectal y las neoplasias pancreáticas(37,196). En cambio, en el ratón adulto, *SOX17* está relacionado con la promoción de la angiogénesis tumoral mediante la proliferación endotelial y la ramificación vascular.

Otros genes de la misma familia están alterados en la neoplasia de pulmón: *SOX2*, **SOX3** [*SRY (sex determining region Y)-box 3*], **SOX4** [*SRY (sex determining region Y)-box 4*](196), *SOX9*, **SOX11** [*SRY (sex determining region Y)-box 11*]. A destacar que hay estudios que han asociado *SOX2* a la proliferación ce-

lular y a la capacidad metastásica de los carcinomas escamosos, mientras que otros estudios asocian SOX2 sobreexpresado a buen pronóstico en carcinoma escamoso y mal pronóstico en el adenocarcinoma estadio I(128).

Decir también que los genes de SOX están relacionados con la formación del sistema nervioso central y en enfermedades nerviosas.

MARCADOR	RESULTADOS	ESTUDIO
SHP2	Expresión tumoral en CPNCP: 71% (IH) Moderada o alta en el 50% de los CPNCP Leve en el 80% del epitelio bronquial normal	Tang 2010
	Expresión tumoral en carcinoma escamoso: 73% (IH) Expresión tumoral en adenocarcinoma: 75% (IH) Mayor expresión tumoral en pacientes con afectación ganglionar La expresión tumoral condiciona peor pronóstico	Tang 2013
	Existe mutaciones de <i>SHP2</i> en líneas celulares El mutante doble negativo de <i>SHP2</i> o la inhibición mediante shRNAs disminuye crecimiento tumoral (líneas celulares)	Bentires-Alj 2004 Ren 2010
	Ausencia de SHP2: indiferenciación y autorenovación celular	Wu 2009
	SHP2 presente en la vía del EGFR Punto crítico: STAT3. En caso de inhibición por gefitinib, se activa la cascada de FGFR, explica la resistencia a gefitinib.	Karachaliou 2014; Lazzara 2010; Sithanandam 2005.
	Inhibidor de SHP2 en líneas celulares	Yu 2013
SOX17	Metilación de la región promotora de SOX17 en CPNCP: 50-60% (pulmón normal, metilado el 27%) Infraexpresión tumoral en neoplasia de pulmón: 86% (IH) (26% de las muestras de pulmón normal, menos expresado)	Yin 2012
	SOX2 - Carcinoma escamoso Especificidad del 95% para distinguir entre carcinoma escamoso y adenocarcinoma SOX2 sobreexpresado: adenocarcinoma, mal pronóstico; carcinoma escamoso, buen pronóstico. Amplificación de <i>SOX2</i> asociada a amplificación de <i>MYC</i>	Nana-Sinkam 2013

Tabla 14.

Visión global de los marcadores embrionarios SHP2 y SOX17 en la neoplasia de pulmón (17,21,23,128,178-185).

Marcadores epigenéticos

Los marcadores epigenéticos se han estudiado en muestras tumorales (tabla 15) y también en ganglios torácicos, con porcentajes de metilación génica variables.

Tabla 15. Frecuencia de metilación de marcadores epigenéticos en muestra tumoral de neoplasia pulmonar (199,201,204-211).

Metilación de marcadores epigenéticos en tumor			
RUNX3	100%	CDH13	39-48%
NPY	100%	miRNA 34b/c	46%
HOXA11	95%	IGFBP3	23%
HOXA5	75%	DAPK	17%
APC	30-72%	MGMT	16%
ASCL2	67%	KRAS	15%
RASSF1A	22-50%	GSTP1	8%
p16	17-91%	TMS1 (ASC, PYCARD)	7%

Harden et al evaluaron 90 pacientes con cáncer de pulmón estadio I encontrando que el 81% de los tumores primarios presentaban metilación del promotor de alguno de los siguientes genes: *p16* (**CDKN2A**, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), **GSTP1** (*glutathione S-transferase pi 1*), **APC** (*adenomatous polyposis coli*), **DAPK** (*death-associated protein kinase 1*, **DAPK1**) y **MGMT**. **FHIT** (*fragile histidine triad*) y **RARB** (*retinoic acid receptor, beta*) son genes supresores de tumores que también se encuentran metilados en neoplasia. **CDH13** (*cadherin 13*) se encuentra metilado preferentemente en adenocarcinomas, p16 en carcinomas escamosos y RASSF1A se distribuye aproximadamente por igual entre adenocarcinomas y carcinomas escamosos(199,200). La metilación de **RASSF1A** se ha asociado a peor supervivencia en algunos estudios(199,201,202), aunque en otros no(203). No obstante, un metanálisis de Wang en 2011 evidenció que los pacientes presentaban un 87% más de riesgo de recidiva y un 34% más de riesgo de mortalidad si presentaban **RASSF1A** metilado.

Los estudios a gran escala mediante el análisis de *microarrays* también han relacionado la expresión de miRNA con neoplasia de pulmón y riesgo de recidiva o supervivencia. Determinados miRNA se asociaba a evolución favorable (miRNA 181, 198, 206, 221, 374a, 377, 451, 512, 572, 588, 615-5p, 662, 934, 1248, Mirlet7a-1 y Mirlet7a-2), mientras que otros se han asociado a peor pronóstico (miRNA 21, 92b, 98, 103, 107, 137, 155, 182, 222, 372 y 449), de forma significativa (tabla S9 suplementaria(212)). El miRNA 221, miRNA 7 y miRNA 3a infraexpresados así como el miRNA155 sobreexpresado se ha asociado a recurrencia(107,213). Los miRNA 30, 140-3p, 182, 210 y 486-5p nos permiten distinguir entre carcinoma escamoso y pulmón normal y la sobreexpresión de miRNA31 se asocia a peor supervivencia entre los pacientes con carcinoma escamoso(214).

La metilación de miRNA también se ha asociado a neoplasia de pulmón. La metilación de miR-34b/c en muestras tumorales de adenocarcinoma se ha asociado a un estadio más avanzado dentro de los precoces (estadio II), a recurrencia

y a exitos. Se han estratificado los pacientes en función de una baja o media frecuencia de metilación versus una alta metilación: los pacientes con alta metilación de miRNA 34b/c se asocian a menor tiempo libre de enfermedad. El análisis multivariante reveló este marcador como un factor pronóstico de recidiva en estadios tempranos de adenocarcinomas(105). Landi y colaboradores también asociaron la metilación de miRNA 34b/c a peor pronóstico(215) y Lu asoció la expresión a buen pronóstico(216).

En la tabla 16 exponemos la frecuencia de las alteraciones moleculares más importantes conocidas en neoplasia de pulmón.

Alteraciones moleculares en el CPNCP		
Marcador	Adenocarcinoma	Carcinoma escamoso
p53	46%	90%
p40	ND ¹	89%
CDKN2A	43%	72%
p16 delección; <i>skip</i> exón 2; mutación	ND	30%; 4%, 17%
KRAS	32%	3-5%
PTEN mutación y delección	3%	10-28%
FGFR1 amplificación	0,5-1%	20-25%
SOX2	ND	8-21%
KEAP1	19%	12%
NFE2L2	3%	9-19%
STK11	17%	2%
TP63	ND	16%
AKT3	ND	16%
PIK3CA	4-5%	4-16%
EGFR mutación y amplificación	5-15%	<5-9%
ALK fusión	1,3-15%	<5%
NF1	8,3-11%	11%
PDGFRA amplificación y mutación	2%	1-9%
ATM	9%	ND
RBM10	9%	ND
SETD2	9%	ND
ROS1	1,7-8,5%	ND
RET mutación; fusión	8,5%; 0,9%	ND
NOTCH1	ND	8%
MDM2	8%	ND
BRAF	<1-7%	0-4%
HER2 mutación y amplificación	0,7-5%	0-4%
FGFR2 mutación y amplificación	0%	3%
FGFR3	ND	2%

Tabla 16. Frecuencia de mutaciones, principalmente *driver mutations*, amplificaciones y otras alteraciones moleculares en muestras tumorales (90,148,153,161,217-219). 1, ND: no disponible.

Firmas genómicas

Varios autores han elaborado y testado firmas de genes o paneles de marcadores a nivel *tumoral* que tuvieran carácter pronóstico, utilizando habitualmente *microarrays* y RT-PCR. Estas firmas nos permiten estratificar los pacientes con CPNPC y son particularmente útiles en pacientes con estadios I y II.

Firmas tumorales

Zhu y colaboradores elaboraron una firma genética de 15 componentes tras el análisis de expresión con *microarrays*. En función de la expresión tumoral de la firma, se establecieron dos grupos de pacientes, un grupo de bajo riesgo con excelente TLE y OS y uno de alto riesgo. Sólo los pacientes con alto riesgo se beneficiaban de tratamiento con quimioterapia adyuvante. Los 15 genes se validaron por RT-qPCR y la firma genética continuaba siendo factor pronóstico, con un RR (riesgo relativo) de 1,95 para los pacientes de alto riesgo (220).

Hoang y colaboradores analizaron muestras tumorales mediante *microarrays*, determinando un panel de 75 genes con expresión diferente según el tumor no tuviera afectación ganglionar, presentara micrometástasis ganglionares (histológicamente o a través de estudio molecular, para obtener mediante RT-qPCR una concentración de CEA que equivalga a >1000 células neoplásicas) o presentara metástasis ganglionar franca. La osteopontina, por ejemplo, estaba más elevada en pacientes con metástasis o micrometástasis(221).

Lee y colaboradores, tras detectar 6 genes interesantes e incorporar la información del pT y del grado de diferenciación, establecieron unos modelos con curvas pronósticas del TLE con un prometedor 72% de sensibilidad y 90% de especificidad(222).

Chen y colaboradores, en 2007, publicaron los primeros resultados en estadios tempranos de CPNPC. Se eligieron 5 marcadores (tabla 17) que proporcionaron una sensibilidad del 98%, especificidad del 93%, VPP 95%, VPN 98% y exactitud del 96%. Los pacientes con alto riesgo en base a esta firma genética tenían una mediana del TLE de 13 meses y OS de 20 meses, respecto los de bajo riesgo (TLE 29 meses; OS 40 meses). Aplicado al estadio I, la OS a 5 años fue de 15% vs 90%. El análisis multivariado confirmaba que la firma genética se asociaron a peor pronóstico(223).

La Dra. Sanmartín y colaboradores evidenciaron que la infraexpresión de VEGFD tumoral se asocia a los pacientes con afectación ganglionar y esto confiere una tendencia a menor TLE y OS ($p > 0,05$)(224).

El grupo de Kratz y Jablons de San Francisco desarrollaron una firma genética de 14 marcadores evaluados por qPCR a partir de muestras de parafina de tumores no escamosos de 361 pacientes (San Francisco, USA), validado en 433 pacientes estadio I no escamosos (California Norte, USA) y posteriormente en

otros 1006 pacientes diferentes (China), aquí radica su potencia. Se estratificaron los pacientes en bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo. Los pacientes con alto e intermedio riesgo fueron factores pronóstico de mortalidad (OS a 5 años de 71-74% vs 57-58% y 45-49%). La supervivencia específica de neoplasia a 5 años fue de 84% (bajo riesgo), 70% (intermedio) y 63% (alto riesgo). Esta capacidad de discriminación se replica cuando se analizan de manera aislada los tumores pT1aNO. Esta firma genética está disponible comercialmente (Perenio Lung TS Test, Life Technologies, Inc.) y actualmente se está desarrollando un ensayo clínico en el cual se les ofrece a los pacientes con estadio I y alto riesgo por esta firma, observación o quimioterapia con cisplatino y vinorelbina(225-227).

La construcción de firmas genéticas pronósticas también se ha realizado con genes metilados. Cabe destacar un estudio basado en 577 pacientes de Sandoval y colaboradores, donde se inició la construcción del modelo también a partir del análisis de *microarrays*. Se eligieron 5 marcadores metilados, los de peor evolución. La estratificación en 0-1 marcador metilado vs 2-5 evidenció peor evolución para este último grupo.

Nadal y colaboradores han evaluado 151 adenocarcinomas y establecieron tres *clusters*, analizando 750 miRNA concomitantemente con características clínicas del tumor bien diferenciadas (estadio tumoral, diferenciación, estirpe tumoral, supervivencia). En el *cluster 3*, de genes asociados a los tumores más agresivos, acinares y sólidos, se expresaban marcadores relacionados con MYC. Los tumores lepidícos se asociaban al *cluster 1*. Se apreció, además, que 22 miRNA se asociaron a peor pronóstico y que la mitad estaban en el cromosoma 14q32. Los más relevantes fueron miRNA370, 376a y 411 y se validaron en 60 tumores por RT-PCR, determinado esta firma como un factor de peor pronóstico independiente. Estos tres genes se asociaron a migración celular, a adhesión celular, a transición epitelial mesenquimal y recurrencia a distancia (sobrexpresión de miRNA 411), pudiendo estar implicados en los procesos de diseminación a distancia. Finalmente, los miRNA de la región 14q32 están relacionados con las células madre embrionarias y con el desarrollo y diferenciación pulmonar, pues se han encontrado en pulmones de ratón recién nacido y disminuyen drásticamente en las primeras semanas de vida(212).

Aunque existe una abundante literatura, todavía no se ha establecido ninguna firma que definitivamente prediga la supervivencia mejor que otros factores incluidos en la clasificación TNM. Muchos estudios presentan buenos resultados tras la estratificación con firmas en el estadio I, pero no en el estadio II, lo que hace necesario evaluar el porqué de esas diferencias. Algunos estudios utilizan líneas celulares para elegir los genes candidatos y muchos otros presentan series cortas. Aunque algunos estudios agrupan unos pocos marcadores en una firma, lo habitual es que las firmas incluyan muchos marcadores y esto puede dificultar la implantación en la clínica. Todo estas limitaciones están presentes en los estudios realizados hasta la fecha(228).

Firmas genómicas tumorales					
Autores	n ¹	Genes	Histología	Estadio	OS a 5 años (bajo vs alto riesgo)
Microarrays y RT-qPCR ó RT-PCR					
Nadal 2014 (212)	151	miRNA 370, 376a y 411	ADK	I-III	76% vs 42%
Sanmartin 2014 (224)	175	Alto VEGFA, bajo VEGFB y VEGFD	CPNCP	I-III A	58% vs 8%
Gallegos 2013 (52)	56	miRNA 34 b/c y 148a	ADK	I-II	ND ²
Kratz 2012 (225)	1800	BAG1, BRCA1, CDC6, CDK2AP1, ERBB3, FUT3, IL11, LCK, RND3, SH3BGR, WNT3A, ESD, TBP y YAP1	CPNCP No CE	I-IV	71-74% vs 45-49%
Okayama 2012 (229)	226	Fase I: firma de 174 genes Fase II: firma de 9 genes FOSL2, KRT16, DEPDC1, DIAPH3, MCM4, UBE2S, SLITRK4, SIGLEC9 y CD300A.	ADK	I-II	85% vs 57% EGFR, ALK y KRAS <i>Wild type</i> 95% vs 55%
Zhu 2010 (220)	133	ATP1B1, TRIM14, FAM64A, FOSL2, HEXIM1, MB, L1CAM, UMPS, EDN3, STMN2, MYT1L, IK-BKAP, MLANA, MDM2 y ZNF236.	CPNCP	IB-II	Supervivencia específica de neoplasia 90% vs 20%
Hou 2010 (230)	187	Firma de 5 genes distinguen tumor vs normal: AGER, CA4, FAM107A, GKN2, TOP2A Firma de 17 genes pronósticos DGKH, 1557638_at, EIF5A, CPT1A, ADH1C, BNC1, HSD17B3, XPO7, ENPP2, 227115_at, COX8C, EXOSC6, EGFR, RNASE7, C12orf59 (TMEM52B) y MYNN.	CPNCP	I-IV	Grupo inicial 68% vs 19% Grupo validación 58% vs 15%
Raz 2008 (98)	120	WNT3A, RND3, LCK y ERBB3	ADK	I-IV	87 vs 38% (estadio I)
Skrzypski 2008 (231)	92	CSF1, EGFR y CAIX (CA9). S: 85%; E: 60%.	CE	I-III A	75% vs 45%
Shedden 2008 (232)	442	Firma de 100 genes	ADK	I-III	65% vs 42%
Lee 2008 (222)	253	CALB1, MMP7, SLC1A7, GSTA1, CCL19 e IFI44.	ADK y CE	I-III B	TLE 3 años 75% vs 53%
Chen 2007 (223)	185	DUSP6, MMD, STAT1, ERBB3, LCK, CPEB4, RNF4, STAT2, NF1, FRAP1 (MTOR), DLG2, IRF4, ANXA5, HMMR, HGF y ZNF264. DUSP6, STAT1, LCK, MMD y ERBB3	CPNCP	I-III	Grupo 5 genes OS 5 años 65 vs 30%

Tabla 17. Principales firmas genómicas tumorales evaluadas en la literatura mediante *microarrays* y RT-(q)PCR (2007-2014). 1, n: número de pacientes; 2, ND: no disponible.

Firmas genómicas tumorales					
Autores	n ¹	Genes	Histología	Estadio	OS a 5 años (bajo vs alto riesgo)
Microarrays y RT-qPCR ó RT-PCR					
Lau 2007(233)	290	STX1A, HIF1A y CCR7	CPNCP	I-III	60% vs 40%
Bianchi 2007(234)	80	NUDCD1, E2F1, E2F4, HOXB7, MCM6, SERPINB5, HSPG2, SF3B1, RRM2 y SCGB3A1	ADK	I	65 vs 30%
Potti 2006(235)	172	Firma de 133 genes, incluye MUC1	ADK y CE	I-IIIb	78-82% vs 0-18%
Lu 2006(236)	197	Firma de 64 genes	CPNCP	I	IA: 95% vs 58% IB: 82% vs 30%
Raponi 2006(237)	165	Firma de 50 genes de cada histología Genes del desarrollo epidérmico, alto riesgo: BNC1, COL7A1, COL17A1, KRT5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, PTHLH, SPRR1A, SPRR1B y SPRR2A.	CE y ADK	I-IV	OS 3 años 60% vs 30%
Blackhall 2004(238)	130	PRSS25, HPCAL4, RhoGDI (AR-HGDIA), PIK3R2, MMP2, TIMP3, HIF1A, SEMA6A, S100A10, DOC1 y CIT HIF1 α , RhoGDI, CIT pronósticos	CPNCP	I-III	TLE Grupo inicial 50% vs 0% Grupo validación 52% vs 40%
Tomida 2004(239)	50	Firma de 25 genes (incluye MYC y SFTPC)	CPNCP	ND ²	88% vs 30%
Beer 2002(240)	86	Firma de 50 y 100 genes	ADK	I y III	60% vs 30%
Bhattacharjee 2001(241)	186	C (<i>cluster</i>) 1, 3, 4: genes de división celular, proliferación y marcadores de neumocito II C2: marcadores neuroendocrinos	ADK	I-IV	No C2 45% vs C2 17%
Garber 2001(242)	57	Peor pronóstico: CD98 (SLC7A5), TRIM29, KIAA1201 (GRAMD1B), PTGES, CTSL, EST Hs. 11607 AA443569, DKK1, LTB4-12 <i>hydroxygehydrogenase</i> , VEGFC y ERO1L	ADK	I-IV	4 años G (grupo) 1 100% vs G2 42% vs G3 0%
Inmunohistoquímica					
D'Amico 1999(114)	408	p53, factor VIII, ERBB2, CD44 y RB	CPNCP	I	77% vs 49%
Pirosecuenciado					
Sandoval 2013(243)	577	HIST1H4F, PCDHGB6, NPBWR1, ALX1, HOXA9	ADK y CE	I	I: 70% vs 48%

Tabla 18. Principales firmas genómicas tumorales evaluadas en la literatura con las 4 principales técnicas (1999-2007). 1, n: número de pacientes; 2, ND: no disponible.

Restadificación molecular ganglionar

Desde el punto de vista del cirujano torácico, la afectación ganglionar es clave para determinar qué pacientes serán tributarios de tratamiento quirúrgico y cuáles serán merecedores de tratamiento con quimioterapia y radioterapia. Por tanto, un paso siguiente y consecutivo tras la revisión de la literatura sobre los marcadores moleculares en tumor, es poner encima de la mesa los hallazgos moleculares reportados a nivel ganglionar torácico. El estatus molecular ganglionar ha sido evaluado por varios grupos y con varios marcadores y firmas genéticas, en pos de, primero, comunicar los hallazgos y, segundo, restadificar los pacientes.

Muchos autores han estudiado los marcadores mediante inmunohistoquímica, como el grupo de Kubuschok, que detectaron EPCAM en los ganglios del 22% de los pacientes con CPNCP, con un riesgo relativo 2,7 veces mayor de recidiva y 2,5 veces mayor de éxitus(244-248). En esta tesis nos centraremos en los estudios de expresión mediante RT-PCR y metilación de DNA.

Marcadores y firmas que restadifican molecularmente

Los marcadores y las firmas que se han evidenciado en ganglios histológicamente negativos de pacientes pN0-1 y que su presencia se asocia a un aumento de recidiva, y por tanto, un peor pronóstico, son los que realmente permiten restadificar a los pacientes. Los resultados son variables, pero el panorama general muestra que un 30% de los pacientes probablemente presentan enfermedad ganglionar no detectada. Varios estudios documentan una prevalencia de afectación molecular ganglionar >50%, dato que es más difícil que concuerde con la realidad de la neoplasia, pudiendo explicarse un porcentaje de ellos como falsos positivos o como un reflejo que el punto de corte diagnóstico no es adecuado. No obstante, podría ser que existieran células tumorales en la mayoría de los ganglios torácicos y que las detectáramos mediante marcadores moleculares, pero que no sepamos qué significado asociado presentan. La revisión de la literatura se expone en la tablas 19-22 y a continuación.

KRT19, keratin 19, type I, citoqueratina 19

La KRT19 es un marcador que se expresa en el 88-94% de los tumores primarios de CPNCP. Es un marcador que ha sido ampliamente estudiado con RT-PCR en ganglios torácicos de pacientes con CPNCP(249-253). Se ha evidenciado la presencia de mRNA de KRT19 en el 2,4-67% de los ganglios torácicos pN0, lo que representa aproximadamente un 10-67% de estos pacientes clasificados como pN0. En pacientes con afectación histológica ganglionar, la presencia de KRT19 ganglionar ascendía al 59-100%, mientras que en los controles sin neoplasia fue del 0-32%.

CEA-CEACAM5

Con la RT-qPCR se ha evidenciado aumento de los niveles de CEA en más del 70% de las muestras de los tumores primarios y en 74-100% de los ganglios afectados histológicamente. También se ha puesto de manifiesto que un 13-25% de todos los ganglios analizados histológicamente negativos presentaban elevación del CEA y que entre un 36-64% de los pacientes con ganglios histológicamente negativos presentaban CEA elevado ganglionar. Los pacientes con elevación del CEA ganglionar presentaban un riesgo de recidiva 3 veces superior. En cambio, el porcentaje de pacientes sin neoplasia, con ganglios sanos o con enfermedad inflamatoria, y con elevación del CEA no sobrepasaba en 20%; en muchos casos no presentaban elevación significativa(66,144,145,254). El CEA se expresa poco en los ganglios afectados por carcinoma escamoso, mientras que la expresión era elevada en adenocarcinomas(145,251).

MUC1

Li et al estudiaron por RT-PCR 402 ganglios de 89 pacientes con CPNCP pN0, evidenciando la presencia de **MUC1** (*mucin 1, cell surface associated*) en el 9% de los ganglios y el 24% de los pacientes(256). Estos pacientes presentaban peor evolución y la presencia de MUC1 ganglionar se reveló como un factor pronóstico independiente. No obstante, este marcador sólo estaba presente en el 73% de los ganglios del grupo control positivo (ganglios con neoplasia). MUC1 había sido evaluado previamente por Salerno et al, estando en el 34% de los ganglios histológicamente negativos(257).

Firmas de genes

Benlloch et al analizaron un panel de marcadores que incluía **TACSTD2** (*tumor-associated calcium signal transducer 2*), CEACAM5, KRT19, **MAGEA10**

(*melanoma antigen family A10*) y otros, encontrando que únicamente CEA-CAM5 y PLUNC se expresaban en muestra tumoral y no se expresaban en ganglios linfáticos no neoplásicos. Se evaluaron los ganglios de pacientes con CP-NCP resecaado estadio I, detectando CEACAM5 en el 13% y PLUNC en el 16% de las adenopatías torácicas negativas por histología. En conjunto, el 75% de los pacientes era pN0(mol+). Los pacientes (21%) con alguno de estos marcadores moleculares positivos a nivel N2 presentaban menor intervalo libre de enfermedad y peor supervivencia, con un riesgo de mortalidad 6 veces superior. En este estudio destaca, además, que todos los pacientes pN0(mol+ N2) (N2 por marcadores moleculares positivos) eran pN0(mol+ N1)(258).

Mediante *survivin* y *livin* se reclasifican un 34% de los pacientes, con un riesgo de recidiva y de mortalidad 2,5 veces superior(259). Estos dos marcadores también se encuentran expresados en épocas fetales.

Marcadores metilados

Brock reportó que la metilación de unos determinados genes en ganglios linfáticos pN0 se asociaba a recurrencia de la neoplasia. Estos genes fueron *CDKN2A*, *CDH13*, *APC* y *RASSF1A*. Específicamente, fueron *CDKN2A* y *CDH13* metilados los que conferían un aumento del riesgo de recidiva, tanto en el análisis de los ganglios intrapulmonares/hiliares como de los mediastínicos, restadificando molecularmente los pacientes. *RASSF1A* se evidenció metilado en los ganglios hiliares o mediastínicos del 10-16% de los pacientes sin recidiva y entre el 13-21% en los pacientes con recidiva. *CDKN2A* metilado, por su parte, se presentaba entre un 14-17% en los no recidivados y entre uno 35-48% en los pacientes recidivados, mientras que *CDH13* se presentaba metilado entre el 19-25% de los pacientes libres de enfermedad y entre el 32-47% de los recidivados. Todo esto indica que la detección de genes metilados en ganglios podría ser una forma más de estadificación molecular del cáncer de pulmón.

Marcadores y firmas que no restadifican molecularmente

Mutaciones

Las mutaciones de KRAS y p53 (260,261) han sido estudiadas en ganglio torácico. Ahrendt y colaboradores no evidenciaron un impacto pronóstico en los pacientes que las presentaban, mientras que Hashimoto et al mostraban peor supervivencia en los pacientes mutados; sin embargo, estas diferencias

no se evaluaron en un análisis multivariante. Por tanto, su utilidad en la restadificación ganglionar debe ser confirmada.

Expresión

La expresión de **VEGFA** (*vascular endothelial growth factor A*), **VEGFC**, **VEGFD** (*vascular endothelial growth factor D*) y **VEGFR3** (*vascular endothelial growth factor receptor 3*) está ligada a la angiogénesis y es significativamente mayor en ganglios linfáticos torácicos considerados afectados molecularmente por KRT7, CEACAM5 o **PLUNC** (*BPI fold containing family A, member 1*, **BP1FA1**) (hasta un 60% de los pacientes), respecto los ganglios sin afectación ganglionar molecular(262,263). La peor supervivencia de los pacientes con afectación molecular ganglionar de KRT7, CEACAM5 o PLUNC no fue estadísticamente significativa respecto los molecular NO.

p53, AE1 y AE3 también se han evaluado a nivel ganglionar; aunque se han evidenciado diferencias francas en las curvas del tiempo libre de enfermedad entre los pacientes molecular positivo y molecular negativo, el análisis multivariante no ha evidenciado la afectación molecular como un factor pronóstico independiente.

Metilación

Harden, por su parte, vio que el patrón de metilación tumoral se repetía en los ganglios torácicos del 15% de los pacientes pNO y metilados a nivel tumoral. Desafortunadamente, estos pacientes con ganglios metilados no presentaban peor supervivencia, aunque sí un aumento de la tasa de éxito ($p > 0,05$). El 45% de los pacientes con pNO(mol+) habían fallecido durante el seguimiento en comparación con el 27% del grupo pNO(mol-)(204). Además, se evidenció que la presencia de metilación de *APC* y *DAPK* en el tumor primario se asociaba a un peor pronóstico. Safar reporta un mayor porcentaje de pacientes pNO con metilación ganglionar (67%).

Marcadores y firmas no evaluados pronósticamente

Otros marcadores se han evidenciado en ganglios pN0, pero no se ha evaluado su carácter pronóstico. Destacar el estudio de Betz y colaboradores, que analizaron en ganglios torácicos los marcadores SFTPA~D, evidenciando que el marcador SFTPB se expresa en tejido linfático y que los marcadores SFTPA, SFTPC y/o SFTPD se encontraban en el 85% de los ganglios afectados histológicamente y en el 55% de los ganglios no afectados (264). Nordgard y colaboradores evaluaron KRT19, CEACAM5, **DSG3** (*desmoglein 3*), SFTPA y SFTPC. El 71% de los pacientes presentaban algún marcador elevado en ganglio: el 55% para KRT19, 36% para CEACAM5, 35% SFTPA y 27% SFTPC. A pesar que el 75% de los ganglios neoplásicos presentaban afectación molecular, no encontraron ninguna asociación entre el estadio ganglionar histológico y el estadio ganglionar molecular. La limitación de este estudio es que han mirado pocos ganglios por pacientes (1,5 [1-3])(251).

MARCADORES MOLECULARES Y FIRMAS QUE RESTADIFICAN MOLECULARMENTE LOS PACIENTES										
Estudio	Técnica	Pacientes	Tumor primario		Ganglios		Ganglios		Pacientes pN0 Mol+	Pronóstico pN0 Mol+
			n	n Mol +	pN0	pN1-2	pN1-2 Mol+	pN0 Mol+		
Li 2008 (256)	RT-PCR	89	15	15 (100%)	402	15	11 (73%)	36 (9%)	21/89 (24%)	Peor OS HR 2.8 (1.5-5.2)
Nosotti 2012* (265)	RT-PCR	55	55	55 (100%)	609		100%	ND ¹	20/55 (36%)	TLE HR 0.8 (0.16-1.5) OS HR 1.02 (0.24-1.9)
Nosotti 2005* (254)	RT-PCR	44	60	60 (100%)	261	0	0	35 (13%)	16/44 (36%)	Peor TLE HR 3.3 (1.1-9.5)
Ge 2005 (266)	RT-PCR	40	40	40 (100%)	117	42	42 (100%)	25 (21%)	6/22 (27%)	Peor TLE HR 0.2 (0.12-0.26) Referencia Mol+
Pimpec-Barthes 2005 (253)	RT-PCR	33	0	0	223	31	25 (81%)	30 (14%)	16/33 (48%)	Peor TLE 2 años HR 5.6 (p=0,02); NS a 4 años
Melfi 2008 (252)	RT-PCR	10	0	0	6	5	5 (100%)	4 (67%)	4/6 (67%)	Peor 3/5 Mol+ N2 Recurrieron
Chanida 2014 (267)	Metilación MSP	23	0	0	198	ND	ND	ND	4/23 (17%)	Peor TLE HR 1.9 (1.4-243.2)
Beniloch 2009 (258)	RT-PCR	38	38	15 (100%)	344	19	ND	44 (13%) 54 (16%)	24 (63%) 8 (21%)	Peor pN0(mol+ N2) OS HR 6.1 (1.5-25.3)
Brock 2008 (205)	Metilación MSP	187	50	26 (52%) 19 (39%)	75	0	0	ND	32/75 (42%) 30/75 (40%)	Peor TLE Caso N2 4.3 (1.1-17.7) Val. ² N2 6.1 (0.8-45)
Li 2008 (256)	RT-PCR	44	44	44 (100%)	286	30	100%	79 (28%)	15/44 (34%)	Peor TLE HR 2.5 (1.1-4.8) OS HR 2.5 (1.1-4.5)

Tabla 19. Resultados de la revisión bibliográfica de los marcadores que restadifican molecularmente los pacientes a nivel ganglionar. Las firmas genómicas se separan de los marcadores aislados mediante una línea más gruesa. Si no se indica lo contrario, la peor evolución es de los pacientes pN0(mol+) respecto los pN0(mol-). 1, ND: no disponible; 2, Val: cohorte de validación. *Estos dos estudios comparten enfermos.

MARCADORES Y FIRMAS QUE NO RESTADIFICAN MOLECULARMENTE										
Estudio	Técnica	Pacientes	Tumor primario		Ganglios		Ganglios		Pacientes pNO Mol+	Pronóstico pNO Mol+
			n	n Mol+	pNO	pN1-2	pN1-2	pNO Mol+		
Qiu 2010 (268)	FQ-PCR IH	28	28	ND ¹	193	0	0	54 (28%) 32 (17%) CEA 19 (10%) p53 36 (19%) AEL1.3	17/28 (61%) 12/28 (43%) CEA 9/28 (32%) p53 13/28 (43%) AEL1.3	Menor TLE para Mol+ Cox p>0.05, TLE 5 a CEA 77% vs 0% p53 59% vs 11% AEL1.3 69% vs 13%
Harden 2003 (204)	Metilación MSP	90	90	73 (81%) 15 (17%) CDKN2A 14 (16%) OMDM ² 7 (8%) GSTP1 65 (72%) APC 15 (17%) DAPK	311	31	31 (100%)	ND ¹	11/73 (15%) 87/90 (97%) DAPK	Mayor tasa de éxitus 46% vs 27% p>0.05 Similar OS a 5 años pNO(mol+ vs -) 66% vs 63%
Ahrendt 2002 (260)	AL ² , OH ³	102	102	47 (46%) p53 26 (25%) KRAS	163 p53 90 KRAS	23 p53 24 KRAS	23 (100%) p53 24 (100%) KRAS	20 (12%) p53 3 (3.3%) KRAS	9/21(43%) p53 2/11 (1.8%) KRAS	No diferencias pNO(mol+) vs (mol-)
Safar 2007 (269)	Metilación MSP	180	0	0	180	0	0	121 (67%) 95 (53%) CDH1 34 (19%) ATM 27 (15%) hMLH1 20 (11%) MGMT 16 (9%) CDKN2A 16 (9%) DAPK 9 (5%) APC 7 (4%) RASSF1A	121 (67%) 95 (53%) CDH1 34 (19%) ATM 27 (15%) hMLH1 20 (11%) MGMT 16 (9%) CDKN2A 16 (9%) DAPK 9 (5%) APC 7 (4%) RASSF1A	No diferencias entre <2 y ≥2 genes hipermetilados
Nwogu 2013 (262)	RT-PCR IH	40	0	0	189	189	ND	ND	24/40 (60%) AEL, AE3, KRT7, CECAM5 y/o PLUNC	Menor OS para los Mol+ (p>0.05)

Tabla 20. Revisión bibliográfica de los estudios que han explorado la restadificación molecular ganglionar, a través de la evaluación pronóstica de la presencia o alteración genómica de marcadores a nivel ganglionar. Si no se indica lo contrario, la peor evolución es de los pacientes pNO(mol+) respecto los pNO(mol+). 1, ND: no disponible; 2: AL: *allele-specific ligation*; 3: OH: *oligonucleotide hybridization*.

MARCADORES NO EVALUADOS DE FORMA PRONÓSTICA										
Estudio	Técnica	Pacientes	Tumor primario		Ganglios		Ganglios		Pacientes pN0 Mol+	
			n	n Mol+	pN0	pN1-2	pN1-2 Mol+	pN0 Mol+		
Wang 2005(250)	RT-PCR	32	24	23 (96%)	94	6	6 (100%)	26 (28%) KRT19	19/32 (59%) KRT19	
Maeda 2006(66)	RT-PCR	28	28	28 (100%)	211	13	13 (100%)	52 (25%) CEA	14/22 (64%) CEA	
D'Cunha 2002(144)	RT-PCR	53	53	48 (91%)	232	1	1 (100%)	59 (25%) CEA	30/53 (57%) CEA	
Salerno 1998(257)	RT-PCR	23	18	16 (89%)	88	15	13 (87%)	13/38 (38%) MUC1	11/23 (48%) MUC1	
Dango 2010(255)	RT-PCR	32	32	24 (75%) MAGE1-6	94	6	4 (67%) MAGE1-6 6 (100%) KRT19	11 (42%) MAGE1-6 26 (28%) KRT19	6/23 (26%) MAGE-6 13/23 (56%) KRT19	
Nordgard 2013(251)	RT-PCR	55	55	55 (100%)	84	12	9 (75%)	ND ¹	30/55 (55%) KRT19 20/55 (36%) CEACAM5 9/55 (16%) DSG3 19/55 (35%) SFTPA 15/55 (27%) SFTPC	
Betz 1995(264)	RT-PCR	41	0	0	18	13	11 (85%)	10 (56%) SFTPA, SFTPC y/o SFTPD	21/31 (68%) 12/31 (39%) SFTPA 8/31 (26%) SFTPC 18/31 (58%) SFTPD	
Xi 2006(270)	RT-PCR	68	21	21 (100%) EPCAM 13 (62%) SFTPB 12 (57%) PVA	462	21	21 (100%) EPCAM 13 (62%) SFTPB 12 (57%) PVA	32 (7%) 3 (0.6%) EPCAM 7 (1.5%) PVA 26 (6%) SFTPB	20/68 (29%) 3/20 (1.5%) EPCAM 5/20 (2.5%) PVA 16/20 (80%) SFTPB	
Saintigny 2005(249)	RT-PCR	19	43	42 (98%) KRT19 40 (93%) KRT7	84	10	10 (100%)	2 (2.4%) KRT19 2 (2.4%) KRT7 2 (2.4%) KRT7+KRT19	2/19 (10%)	
Wallace 2005(271)	RT-PCR	87	0	0	100	27	25 (93%)	20 (20%) EPCAM 4 (4%) CEA, 4 PDEF 1 (1%) KRT19, 1 MUC1 3 (3%) LUNX	18/61 (30%) 15/61 (25%) EPCAM	
Helmbold 2009(272)	Metilación MSP	18	14	ND	0	4	CPCP 17/18 (94%) RASSF1A 10/18 (46%) CDKN2A	0	0	

Tabla 21. Revisión bibliográfica de los estudios que han explorado la presencia de marcadores moleculares a nivel ganglionar, pero que no los han evaluado de forma pronóstica. Las firmas genómicas se separan de los marcadores aislados mediante una línea más gruesa 1. ND: no disponible.

Premisas

- 1.- En ocasiones la estadificación clínica no coincide con la estadificación quirúrgico-patológica, que hasta la fecha es el *gold standard* para clasificar a los pacientes.
- 2.- La supervivencia de los pacientes con neoplasias en estadio I y resección completa quirúrgica es peor a la esperada.
- 3.- La expresión de determinados marcadores a nivel tumoral y ganglionar se ha asociado a recurrencia y a un peor pronóstico. La determinación en muestras ganglionares puede mejorar la estadificación de los pacientes con ganglios sin afectación patológica y resección completa.
- 4.- La presencia de marcadores moleculares de células epiteliales en ganglios linfáticos indica la presencia de dichas células en un territorio donde no existen en condiciones normales.
- 5.- Las células neoplásicas poseen mayor indiferenciación que las células no neoplásicas, expresando genes característicos de la época embrionaria, como CEACAM5, FGFR2b, FRS2, MYCN, SFTPC, SHH, SHP2 y SOX17.

Consideramos, pues, que un estudio robusto con una muestra amplia que evalúe dichos marcadores embrionarios puede ser de interés para determinar un panel de marcadores que nos ayude a estadificar, tratar y seguir mejor a los enfermos con neoplasia de pulmón.

El resultado ideal sería que los marcadores seleccionados fueran específicos de células de estirpe epitelial y que la sola detección del transcrito permitiera, en el caso del análisis ganglionar, la clasificación molecular del ganglio como afecto. Se medirá de forma cuantitativa la expresión tumoral para determinar si la carga aporta información.

Hipótesis de trabajo

En el carcinoma broncogénico, la estadificación clínica previa al tratamiento quirúrgico en muchas ocasiones no coincide con la estadificación quirúrgico-patológica.

La expresión en tejido tumoral de marcadores moleculares implicados en el desarrollo pulmonar, solos o en combinación, puede tener utilidad pronóstica en pacientes con CPNCP intervenidos quirúrgicamente con intención radical.

La expresión de dichos marcadores moleculares en ganglios linfáticos torácicos, sin afectación patológica ganglionar, indica la existencia de células tumorales en los citados ganglios linfáticos y se asocia a peor pronóstico.

Objetivos

- 1.-** Analizar la concordancia entre la estadificación clínica y la estadificación patológica en pacientes con carcinoma broncogénico intervenidos con intención radical.
- 2.-** Determinar el valor pronóstico de la presencia de marcadores embrionarios en muestras tumorales de pacientes con CPNCP tratado quirúrgicamente con intención radical.
- 3.-** Determinar el valor pronóstico adicional de la estadificación molecular ganglionar en pacientes con CPNCP tratado quirúrgicamente con intención radical.

Material y método

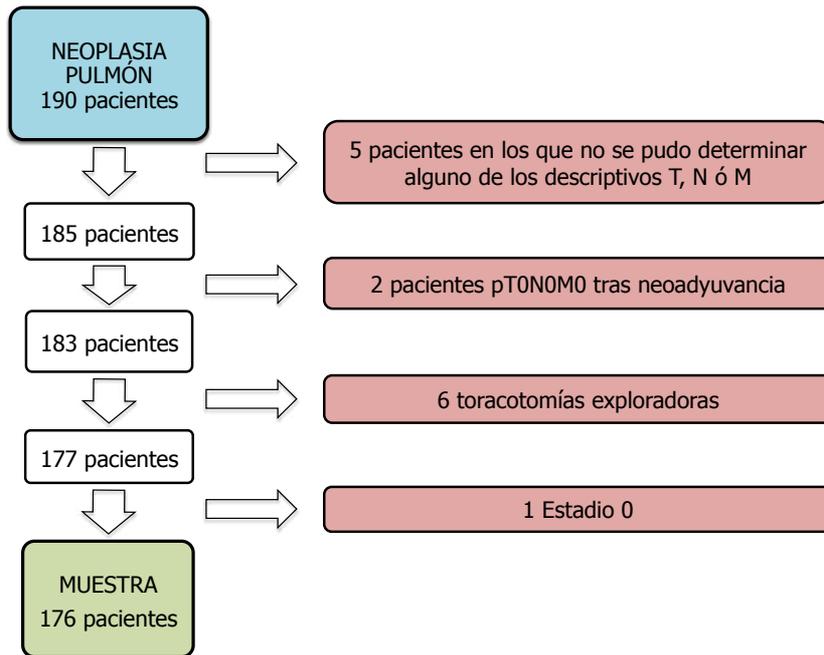
Poblaciones a estudio

Concordancia entre estadificación clínica y patológica

Este es un estudio descriptivo simple sobre una cohorte prospectiva para determinar el grado de concordancia entre la estadificación clínica y la estadificación patológica de los pacientes con carcinoma broncogénico intervenido con intención radical (ver artículo en el Anexo 1).

Tras aplicar los criterios de exclusión, quedó una muestra de 176 pacientes consecutivos diagnosticados de carcinoma broncogénico y tratados con cirugía con intención radical en los que se estudió la concordancia entre la estadificación clínica y la quirúrgico-patológica.

Figura 17. Diagrama de flujo mostrando los criterios de exclusión del estudio de concordancia entre estadificación clínica y patológica.



Estudio pronóstico tumoral y de restadificación ganglionar molecular

El estudio pronóstico tumoral y el estudio de restadificación ganglionar molecular son estudios analíticos observacionales basados en una cohorte predominantemente prospectiva de pacientes con CPNCP intervenidos con intención radical.

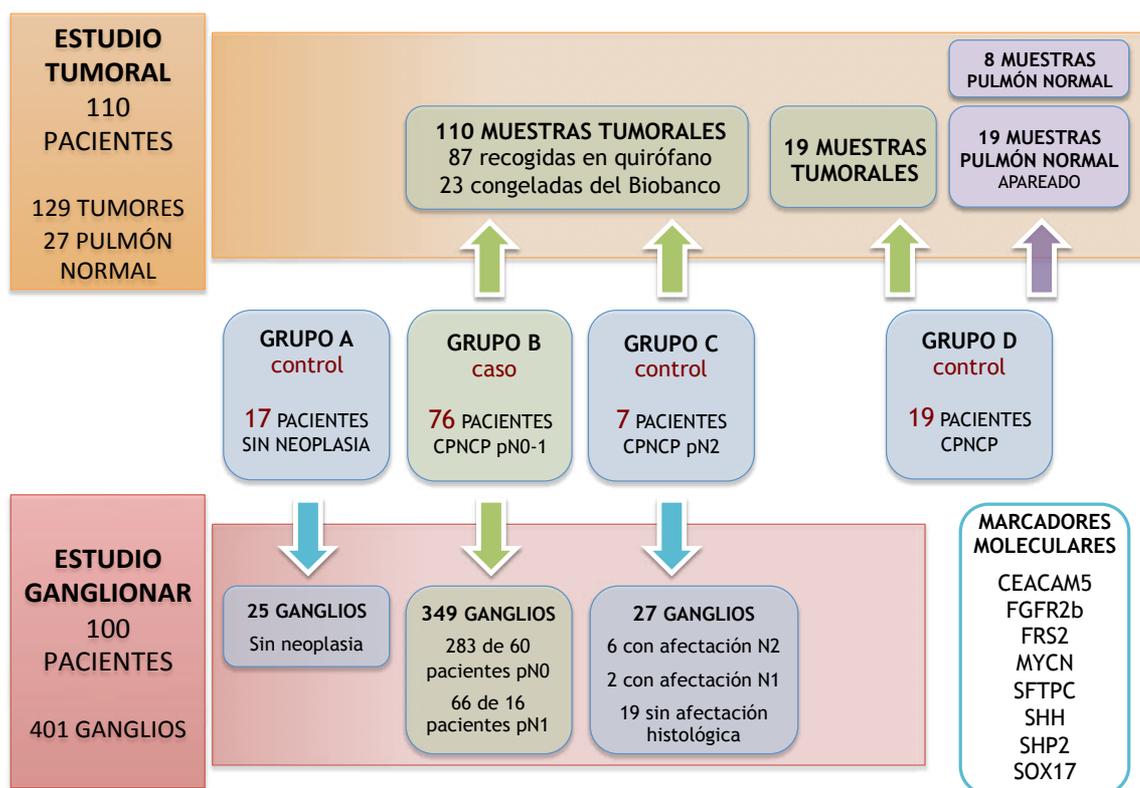
Entre enero de 2008 y junio de 2011 se trataron de forma consecutiva en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitari de Bellvitge, mediante cirugía con intención radical, 319 pacientes con neoplasia de pulmón. De estos pacientes, se intentaron reclutar 316 pacientes con carcinoma broncogénico no célula pequeña.

Según disponibilidad de los circuitos de recogida de muestras (los pacientes no recogidos tenían las mismas características que los recogidos), los pacientes no recogidos fueron 46. De los 270 pacientes restantes, se excluyeron antes de la recogida aquéllos que tenían antecedente de neoplasia previa (n=92), presencia de metástasis a distancia resecaadas (n=6) o tratamiento neoadyuvante con quimioterapia y/o radioterapia (n=23). Durante la cirugía, se excluyeron aquellos pacientes que sólo se pudo realizar toracotomía exploradora o resección incompleta macroscópica (n=8), los pacientes que no se pudieron estadificar

de forma completa (n=10) y los que no se pudo obtener muestras apareadas de tumor y ganglios torácicos (n=17). En total se recogieron muestras de 114 pacientes.

Con posterioridad, aquellos casos con resección incompleta microscópica (n=9) o mortalidad perioperatoria (n=3) fueron también excluidos. De los 102 pacientes restantes, las muestras de 19 pacientes no se pudieron analizar por pérdidas o por imposibilidad técnica en el laboratorio.

En total, la población final a estudiar fue de 83 casos: 60 pN0 (Grupo B), 16 pN1 (Grupo B) y 7 pN2 (Grupo C). Se añadió un tercer grupo (Grupo A) de 17 pacientes sin neoplasia, de los cuales fue posible obtener muestra ganglionar durante un procedimiento de Cirugía Torácica. El diagnóstico de estos pacientes fue hamartoma (n=3), neumotórax (n=1), enfisema pulmonar (n=1), nódulo fibroso o fibronecrótico (n=2), quiste broncogénico (n=1), broncocele (n=1), secuestro pulmonar (n=1), pleuropericarditis idiopática (n=1), amiloidosis (n=2), fibrosis pulmonar (n=1), neumonía organizativa (n=1), bronquiectasias (n=1) y tuberculosis (n=1).



Se estudió un cuarto grupo de pacientes cuyo protocolo de recogida de muestras fue totalmente diferente. Estos pacientes son parte del Biobanco HUB-ICO-IDIBELL (Hospital Universitari de Bellvitge, Institut Català d'Oncologia, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge), cuyas muestras recogieron los Doctores

Figura 18. Diseño del estudio y distribución de muestras.

Llatjós, Baixeras y Penín, en los períodos comprendidos entre 2001 y 2006 (Grupo D, n=19) y 2008-2011 (n=23). Estos pacientes fueron diagnosticados de CPNCP y tratados con cirugía con intención radical y se les pudo obtener muestra tumoral y de pulmón normal apareado. Del primer período se eligieron 9 muestras apareadas tumor-normal de adenocarcinoma de 9 pacientes diferentes y 10 muestras apareadas de carcinoma escamoso de 10 pacientes diferentes. Los pacientes fueron homogéneos y dentro de cada estirpe histológica presentaban una representación homogénea del estadístico pT (desde pT1a a pT3) y del estadio patológico (I-III). Del segundo período, se eligieron todos los pacientes (n=23) de los grupos B y C que tenían muestra tumoral congelada en el biobanco. Para los efectos de este estudio, sirvieron para confirmar la viabilidad de los marcadores seleccionados *in silico* y confirmar que las muestras tumorales a estudio presentaban resultados superponibles a los obtenidos con las muestras tumorales de este grupo.

Finalmente, se completó el pool de muestras de pulmón normal con 8 pacientes más (7 CPNCP y 1 paciente con bronquiectasias).

Aspectos éticos

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado conforme conocen y dan su aprobación para los estudios. El estudio pronóstico y de restadificación ganglionar molecular fue presentado y aprobado por el Comité Ètic d'Investigació Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge, referencia 247/07 (Anexo 3).

Protocolos de estudio

Protocolo del estudio de concordancia

Estadificación clínica

Cada caso se estadificó de forma clínica y patológica, siguiendo las directrices de la sexta edición de la clasificación TNM de los tumores malignos para el cáncer de pulmón, vigentes entre 1997-2009(273). No se utilizó la última clasificación TNM (séptima edición)(57) dado que en el período del estudio aún no estaba

vigente. Como mapa ganglionar se utilizó el de Mountain y Dresler, dado que el actual mapa de la IASLC tampoco estaba vigente(71). En este estudio, la estadificación clínica corresponde a la estadificación previa a la cirugía torácica con intención radical.

En la valoración del tumor primario (cT), fue especialmente útil el TC de tórax y abdomen superior con contraste(274). En cuanto a la estadificación ganglionar (cN), se complementaba con la PET y preferiblemente PET-TC. Se consideraron cN0 aquellos pacientes que presentaban una PET o PET-TC sin captación ganglionar torácica o supraclavicular y aquéllos que presentaban captación ganglionar a nivel mediastínico y biopsias por mediastinoscopia sin evidencia de neoplasia. En cuanto a la afectación ganglionar hiliar (cN1), bastaba con presentar una PET o PET-TC con captación a nivel hiliar. Finalmente, se consideraron cN2 aquellos pacientes con biopsias ganglionares mediastínicas positivas para neoplasia, salvo en casos de cN2 franco (*bulky* o multinivel) y casos seleccionados en los que se decidió tratamiento quirúrgico a pesar de presentar afectación ganglionar mediastínica; en estos casos, se consideró la captación de la PET o PET-TC suficiente para clasificarlo como cN2. La mediastinoscopia se realizó en aquellos pacientes que presentaban una PET o PET-TC con captación patológica a nivel ganglionar mediastínico, para confirmar o descartar la presencia de enfermedad neoplásica. Con este algoritmo, se realizó PET en 2 casos (1%), PET-TC en 135 casos (77%) y mediastinoscopia en 7 casos (4%). Respecto las metástasis a distancia (descriptivo M), se utilizó la PET o PET-TC. La resonancia magnética cerebral se practicó en los adenocarcinomas y/o por sospecha clínica de afectación encefálica.

Tratamiento quirúrgico

Todos los casos del estudio de concordancia, del estudio pronóstico y de reestadificación fueron tratados mediante toracotomía, resección pulmonar y linfadenectomía hiliar y mediastínica(79,82,275). Esta linfadenectomía implicó explorar las cisuras, los hilios de los pulmones y todas las zonas o estaciones ganglionares mediastínicas del hemitórax a intervenir y reseca en bloque todos los nódulos linfáticos con el tejido graso asociado, cuando fuere posible. El número de muestras debía ser, a ser posible, igual o superior a 6 ganglios de los niveles citados, incluyendo como mínimo 3 ganglios de 3 estaciones mediastínicas diferentes, una de ellas siempre la subcarinal. Idealmente, el número total debería ser igual o superior a 11 ganglios extirpados(77).

Estadificación patológica

Los patólogos examinaron de forma sistemática cada resección pulmonar, evaluaron el tamaño y características morfológicas de la pieza tumoral; los estudios inmunohistoquímicos se realizaron según indicación clínica. También se

individualizaron y examinaron cada nódulo linfático que encontraron. Cada nódulo alrededor del árbol bronquial, lobar o segmentario se disecó y se analizó. Además, cada nódulo interlobar, hilar o mediastínico resecado durante la cirugía fue individualizado del tejido adiposo y analizado. La estadificación patológica fue obtenida fundamentalmente a partir de este estudio, aunque también tuvo en cuenta la información obtenida durante el acto quirúrgico. Siguió las mismas directrices de la clasificación TNM que la estadificación clínica. El patólogo podía conocer los datos de estadificación clínica del paciente.

Análisis estadístico

Para comparar los resultados obtenidos de estadificación clínica y estadificación patológica se utilizó el porcentaje de concordancia y el índice kappa. El porcentaje de concordancia utilizó la siguiente razón:

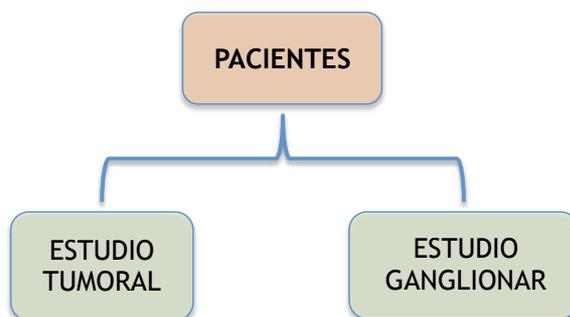
$$\frac{\text{número de casos con estadificación clínica igual a patológica}}{\text{número de casos}}$$

El índice de kappa se calculó global y para cada categoría, también llamado el índice de kappa balanceado por Cohen(276). Este análisis estadístico se realizó ayudándonos del programa informático SPSS® 12.0 (*Statiscal Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA*).

Protocolo del estudio pronóstico tumoral y de restadificación ganglionar molecular

El cómputo global de muestras de estos dos estudios fueron 557 muestras tumorales, ganglionares y de pulmón normal de 127 pacientes.

Figura 19. Los pacientes de la fase transaccional servirán para dos estudios, el estudio tumoral y el estudio ganglionar.



Estudio pronóstico tumoral

De los 110 pacientes y 156 muestras del estudio tumoral, se evaluó el valor pronóstico en 129 muestras tumorales de 102 pacientes.

GRUPO B Y C. 110 muestras de tumores primarios de 83 pacientes.

GRUPO D. 19 muestras de los tumores primarios de 19 pacientes.

Valores basales y patológicos

Los 8 pacientes y 27 muestras restantes son las que completan la serie para determinar los valores basales del pulmón.

- **VALORES BASALES. Pulmón.**
 - **Pulmón normal apareado** de pacientes con CPNCP, 19 muestras del grupo D.
 - **Pool de muestras de pulmón normal.** 19 muestras de pulmón normal apareado del grupo D y 8 muestras más de pulmón normal de 8 pacientes más, con y sin neoplasia de pulmón. El total serán 27 muestras que se replicaron 10 veces.
- **VALORES PATOLÓGICOS. Tumor.** 42 de las 129 muestras de tumores primarios, con confirmación de la presencia de tumor por estudio con hematoxilina-eosina.
 - 19 muestras tumorales del grupo D
 - 23 muestras tumorales de los grupos B y C, muestras congeladas que provienen del Biobanco HUB-ICO-IDIBELL.

Protocolo de estadificación clínica

El protocolo de estadificación clínica fue básicamente el mismo que el utilizado en el estudio de concordancia. No obstante, sobre ese protocolo, se han realizado algunas modificaciones entre 2007-2015 para progresivamente adaptarlo a las guías de la ESTS.

Desde 2007 se realiza la PET-TC de rutina en los pacientes potencialmente quirúrgicos y se ha ido incluyendo de forma gradual la exploración invasiva de los nódulos linfáticos mediastínicos mediante EBUS o EUS como primera opción, en los casos con aumento de captación de FDG y en determinados casos sin aumento de captación (figura 20). Además, desde 2010 se siguen la séptima edición del TNM para estadificar a los pacientes.

Tratamiento quirúrgico y estadificación patológica. Test de referencia.

El test de referencia fue la estadificación patológica teniendo en cuenta la información obtenida durante la cirugía. El protocolo quirúrgico y de estadificación patológica fueron los mismos que los utilizados en el estudio de concordancia. La evaluación patológica fue realizada por tres patólogos especializados en neoplasias torácicas, que tenían acceso a la estadificación clínica y al protocolo quirúrgico del paciente.

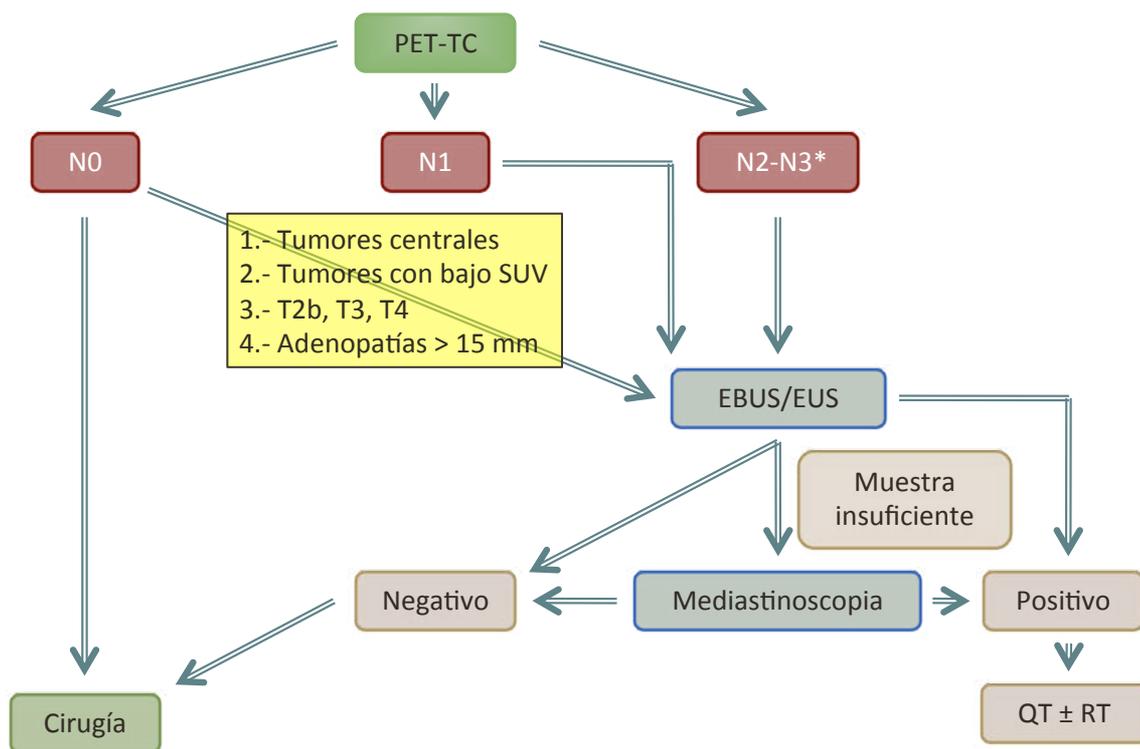


Figura 20. Protocolo de estadificación clínica ganglionar utilizado en los comités multidisciplinares de tumores en los que están presentes miembros del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitari de Bellvitge. *La sospecha por PET-TC de N2-N3 que se considera en este algoritmo es la dudosa o potencialmente quirúrgica en algún momento del tratamiento.

Recogida de datos

A los pacientes se les aplicó un protocolo estandarizado de recogida de datos que recogía las variables principales (expresión tumoral, recidiva, tiempo libre de enfermedad, mortalidad, tiempo de supervivencia e histología)(Anexo 4).

Seguimiento de los pacientes

Se realizó seguimiento a todos los pacientes incluidos en el estudio para poder determinar posibles recidivas/metástasis y éxitos. El seguimiento fue presencial al mes, tres/seis meses, 12, 18, 24, 30 meses y así sucesivamente, según la práctica habitual. Al mes y a los tres meses se complementó la visita con una radiografía de tórax. A los 6 meses y a partir de entonces, se realizó un seguimiento semestral con TC de tórax y abdomen superior, preferentemente. En casos seleccionados, se realizó al año una broncoscopia con recogida de broncoaspirado, cepillado bronquial o biopsia, según los hallazgos. Otras pruebas o periodicidades las determinaron la clínica, el estadio patológico y el tipo de resección obtenida. De forma complementaria, se utilizó el sistema informático del Hospital Universitari de Bellvitge -sistema SAP® (Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung)-, la conexión a la Historia Clínica del ICS (Institut Català de la Salut) y a la Historia Clínica Compartida de Catalunya para obtener los datos de la evolución de los pacientes.

En el caso de no tener datos con los anteriores métodos, se realizó una captura-recaptura de los pacientes por medio de llamadas telefónicas, hasta un máximo de tres en distintas franjas horarias. En el caso de no contacto en nin-

guno de los escenarios previamente definidos será considerado una pérdida del estudio. No hubo ningún paciente del que no se obtuviera ningún tipo de información del seguimiento a través de cualquier medio de los anteriores, por lo tanto, no hubo pérdidas. Sí hubo, no obstante, variabilidad en la fecha de último contacto. Los datos obtenidos con el seguimiento se correlacionaron con los resultados obtenidos del análisis de las muestras.

El último día de seguimiento fue el 29 de junio de 2013. La media de seguimiento fue de 39 ± 26 meses [3 días-129 meses]. Se calculó el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia.

Estimación del tamaño muestral y potencia estadística

Inicialmente se estimó el número de pacientes necesarios para detectar dos grupos de pacientes con expresión tumoral diferenciada, de manera que un grupo sería el que presentara en marcador alterado y el otro sería el grupo sin el marcador alterado. No obstante, apreciamos que el objetivo real del estudio era comparar el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia de un grupo de pacientes sin el marcador embrionario (o la firma genética) alterado a nivel tumoral versus un segundo grupo de pacientes con el marcador alterado. Esto nos hizo replantearnos la estimación del tamaño muestral.

El estudio incluyó 102 pacientes y asumimos 51 pacientes en el grupo experimental y 51 pacientes en el grupo control, con una mediana de seguimiento de 39 meses (mínimo 3 días, máximo 72 meses). La mediana de supervivencia observada en los pacientes sin el marcador alterado es de 38 meses. Con estos números, y fijado un error de tipo I del 5%, tendremos una potencia del 80% para detectar una asociación estadísticamente significativa entre un predictor y la supervivencia si el aumento del riesgo asociado presenta una *hazard ratio* de 2,4 o superior.

Procesamiento de las muestras

Grupos B y C

Las muestras tumorales del paciente se obtuvieron en quirófano justo después de la extracción habitual de la pieza quirúrgica. Se eligió un fragmento tumoral representativo por biopsia excisional o varios *tru-cuts*. Las piezas se colocaron justo después ya en quirófano en tubos eppendorf con RNAlater® - *RNA Stabilization Reagent* (Qiagen®, Valencia, USA) y se guardaron en hielo picado hasta su traslado al Laboratori de Recerca Translacional 1 del Hospital Duran i Reynals.

Una vez en el LRT-1, las muestras se mantienen durante 17h a 6-8°C, posteriormente se congelan una semana a -20°C y finalmente a -80°C en tubos eppendorf sin embeber en OCT (*optimal cutting temperature compound*). Como máximo pasaron 4 años desde el almacenamiento hasta la extracción del RNA y DNA.

En 23 de los 83 pacientes del grupo B y C se había guardado, a parte de este estudio, muestra tumoral congelada a -80°C en el biobanco HUB-ICO-IDIBELL. Se recuperaron y se obtuvo una muestra tumoral de unos 27-64 mm^3 . Las muestras se colocaron en sendos tubos de eppendorf por separado y se transportaron en hielo seco o nieve carbónica hasta el LRT-1. No se ha realizado macrodissección ni microdissección de las piezas tumorales.

Grupo D

Todas las muestras tumorales y de pulmón normal estaban congeladas a -80°C en el biobanco del HUB-ICO-IDIBELL. Se recuperaron y se obtuvo una muestra tumoral y de pulmón normal de cada paciente. Las muestras se colocaron en sendos tubos de eppendorf por separado. Dichas muestras se transportaron en hielo seco o nieve carbónica hasta el LRT-1. Allí se almacenaron a -80°C . Se comprobó mediante estudio con hematoxilina-eosina la presencia de neoplasia viable en todas las muestras tumorales y la ausencia de neoplasia en las muestras de pulmón normal.

Pool de muestras de pulmón normal

Las muestras de pulmón normal apareado de los pacientes con CPNCP del grupo D, siguieron el esquema del citado grupo. Las muestras de los 8 pacientes adicionales que se recogieron durante el período de reclutamiento, siguieron el esquema explicado para el grupo B y C.

Extracción de RNA

La extracción de RNA se ha realizado utilizando el reactivo trizol. La adición de cloroformo y la posterior centrifugación, separa la solución en una fase acuosa donde estará el RNA y una fase orgánica. Tras recoger la fase acuosa, se precipita el RNA utilizando isopropanolol y se aísla. En presencia de trizol, el RNA está protegido de las RNAsas que degradan el RNA. Se evitó al máximo la contaminación del RNA (ver protocolo en Anexo 5).

Una vez extraído el RNA, se leyó la cantidad obtenida en un espectrofotómetro (Nanodrop™, Thermo Scientific, Wilmington, USA) y se guarda a -80°C . El intervalo de tiempo entre el almacenamiento de las muestras y la extracción de RNA/DNA fue de 4-46 meses.

Extracción de DNA

Se ha extraído DNA de las muestras mediante el protocolo de trizol (Anexo 5). Para determinar la metilación del DNA, una vez extraídas las muestras de DNA, se les aplicó el protocolo de bisulfito (EZ DNA Methylation-Gold™ Kit, Zymo Research, Irvine, California, USA, ver Anexo 5) y posteriormente la PCR para determinar el estado de metilación. El análisis de los datos fue de carácter cualitativo.



Figura 21. Protocolo de procesamiento de muestras. Grupos A, B y C.

Diseño de los *primers*

Para poder diseñar los cebadores o *primers* acudimos a la base de datos Gene de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) y posteriormente GenBank y Consensus CDS para obtener las secuencias de DNA, mRNA y CDS (*coding sequences*, DNA que codifica para la proteína).

A partir del CDS se identificaron las secuencias de los exones y su posición en el gen. En la medida de lo posible, se eligieron secuencias que implicaran 10 nucleótidos de dos exones consecutivos, para estar seguros que realmente se amplificaba RNA CDS. La distancia en los exones entre el *primer forward* y el *primer reverse* fue de 150-230 bp (*base pairs*, pares de bases). Se usó el programa informático Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) para generar las secuencias de los *primers*, especialmente para aquellos marcadores con dificultad para ponerlos a punto.

Una vez diseñados los *primers* se analizó la secuencia mediante BLAST® (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), así como

el programa informático DNA Calculator® (Sigma Life Science®, <http://www.sigma-geosys.com/calc/DNACalc.asp>) para evaluar si las secuencias tenían temperatura de fusión similar, el porcentaje de GCs, la tendencia a formar bucles consigo mismo y la tendencia a realizar *primer dimer*. Con las secuencias se diseñaron los *primers* por la empresa Fisher Scientific® y se sintetizaron a una concentración de 10 µmol/µL.

Gen	Accession	Primer forward (5' - 3')	Primer reverse (5' - 3')	Exones	BLAST	
					F ¹	R ²
GENES PROBLEMA						
CEA	NT_011109	ACAATCACAGTCTCTGCGGA	TCCTGTTGCCATTGGACAGC	-	0	5
FGFR2b	NG_012449	GTCCCATCTGACAAGGGAAA	CACTGTAAACCTTGACAGACA	7 y 8	0	0
FRS2	NC_000012	GAACACCTACAACCTCCAGGA	TTCCTCAGCCACAAGCAAAG	-	0	0
MYCN	NG_007457	CACAAGGCCCTCAGTACCTC	AGGCATCGTTTGAGGATCAG	2 y 3	0	0
SHH	NC_000007	CCAATTACAACCCCGACATC	CTCTGAGTGGTGGCCATCTT	-	0	0
SHP2	NG_007459	TCGCTGTGAGAACTGAAAT	GCTTAGTTCTCGAACTCTGC	4-5 y 6	-	1
SOX17	NG_028171	ATCGGGGACATGAAGGTGAA	GACTTGCCAGCATCTTGCT	1-2	0	-
SFTPC	NG_016968	CTGGTTACCACTGCCACCTT	CTGGCCAGCTTAGACGTAG	2 y 4	1	0
GENES DE REFERENCIA						
Bactina	NG_007992	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTACGCACGAT	4	0	0
B2M³	NG_012920	CCCCTGAAAAAGATGAG	CCTCCATGATGCTGCT	2-3	0	2

Tabla 22. Primers elegidos y contruidos para realizar la RT-qPCR. 1, F: primer forward; 2, R: primer reverse; 3, B2M: β2microglobulina. Se exponen el número de otros genes con la misma secuencia reportadas in silico mediante BLAST®. En aquéllas en las que no se puede reportar homología es porque la secuencia implica dos exones.

Transcripción inversa

Posteriormente se transcribió el RNA extraído en cDNA para poder realizar la PCR; esta reacción se denomina transcripción inversa o RT (*reverse transcription*). El volumen total de la reacción fue de 20 µL. La RT se realiza en un termociclador; se colocaron todos los elementos a las concentraciones detalladas en la tabla 23, durante 60 minutos a 37°C y después 15 minutos a 75°C, obteniendo el cDNA. En caso que fuera preciso almacenar el cDNA, éste se almacenó a -20°C.

Volumen	Material
4 µL	Buffer
3 µL	dNTPs a 2 µmol/L
2 µL	DTI (estabilizante)
1 µL	Primers (hexámeros)
0,5 µL	RNAseOUT™
1 µL	MMLV RT (transcriptasa inversa).
5 µL	RNA a 100 µg/mL
3,5 µL	Agua bidestilada
20 µL	Volumen total

Tabla 23. Materiales utilizados y volumen en la RT.

Protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)

En el presente estudio se ha realizado PCR cuantitativa para evaluar la expresión de los marcadores, utilizando la plataforma LightCycler 480® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para más información acerca de la PCR, ver Anexo 6. Se utilizó el kit Light Cycler 480 SYBR Green I Master® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), que incluía la polimerasa FastStart Taq DNA *polimerase*, que es una polimerasa químicamente modificada de la polimerasa termoestable. De forma general, se preparó la mezcla para la qPCR según se expone en la tabla 24.

Volumen	Material
5 µL	FastStart Taq DNA <i>polimerase</i> , tampón de reacción, dNTPs, SYBR Green I
0,5 µL	<i>Primer forward</i> a 10 µL
0,5 µL	<i>Primer reverse</i> a 10 µL
0,8 µL	MgCl ₂
2,2 µL	H ₂ O
1 µL	cDNA
10 µL	Volumen total

Tabla 24. Materiales y volúmenes necesarios para la qPCR.

Los volúmenes de cada material se adaptaron a lo que precisaba cada *primer*, pero siguiendo las líneas maestras expresadas anteriormente. Se utilizaron las placas LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y se sellaron con plástico transparente de mínimo grosor (AB-0558, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Estados Unidos de América). Seguidamente se introdujeron las placas en el LightCycler 480® para realizar el protocolo detallado en la tabla 25.

Tabla 25. Protocolo de realización de la qPCR. 1, S/P: según *primer*.

PROTOCOLO DE qPCR					
Preincubación, desnaturalización. Modo de análisis: ninguno.					
Temperatura	Ciclos	Modo de adquisición	Tiempo	Velocidad de ascenso	Adquisiciones por °C
95°C	1	Ninguno	10 min	4,8 °C/s	-
Amplificación. Modo de análisis: cuantificación.					
95°C	40	Ninguno	10 s	4,8 °C/s	-
Variable S/P ¹		Ninguno	20 s	2,5 °C/s	-
72°C		Único	20 s	4,8 °C/s	-
Fusión. Modo de análisis: curvas de fusión.					
95°C	1	Ninguno	1 min	4,8 °C/s	-
65°C		Ninguno	1 min	2,5 °C/s	-
98°C		Continuo	-	0,11 °C/s	5
Enfriamiento. Modo de análisis: ninguno.					
40°C	1	Ninguno	30 s	2,5 °C/s	-

Para cada muestra, se realizaron dos determinaciones del gen problema y dos determinaciones para cada uno de dos genes de referencia. Se incluyó el agua como control negativo sin cDNA y dos puntos de la recta patrón de cada marcador, como control positivo. Se realizó una evaluación de la fosforescencia obtenida en cada qPCR y se comparó con la fosforescencia de la recta patrón del marcador correspondiente para confirmar que la técnica había sido adecuada. En los marcadores presentados, el C_T varía por lo general entre el ciclo 26-35.

El software utilizado para procesar los datos de la qPCR fue el LightCycler® 480 Software, versión 1.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) y nos obtuvo las curvas de fusión, las rectas patrón, las curvas de amplificación y los valores absolutos de expresión de los marcadores en las muestras (para más información, ver Anexo 6). Para determinar el C_T se utilizó el método de la segunda derivada y para determinar la concentración absoluta de RNA se utilizó el método de la curva estándar.

Puesta a punto de los primers

Antes de realizar el protocolo en todas las muestras del estudio, se pusieron a punto los primers para conseguir una amplificación óptima del cDNA. Se probaron los primers de los genes a estudio y los genes de referencia en varias muestras (tumor y ganglios torácicos) y se ajustaron las cantidades de los componentes hasta obtener la mejor amplificación. Se muestra como ejemplo las condiciones de la qPCR para el SHH y uno de los controles, la β actina. El resto de marcadores y gen de referencia se exponen en el Anexo 7.

Tabla 26. Volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de SHH.

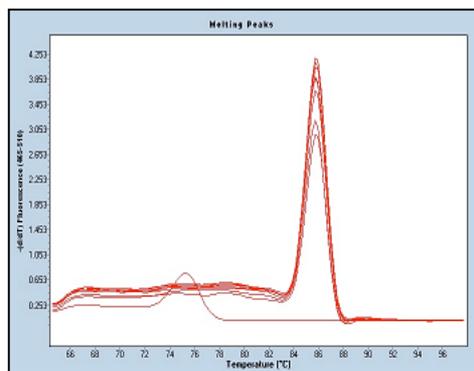


Figura 22. Curva de fusión de SHH.

Cantidad	Componente
4 μ L	SYBR Green
0,5 μ L	Primer SHH Forward
0,5 μ L	Primer SHH Reverse
0,8 μ L	Mg Cl ₂
3,2 μ L	H ₂ O
1 μ L	cDNA
TEMPERATURA: 65° C	

Tabla 27. Volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de β actina.

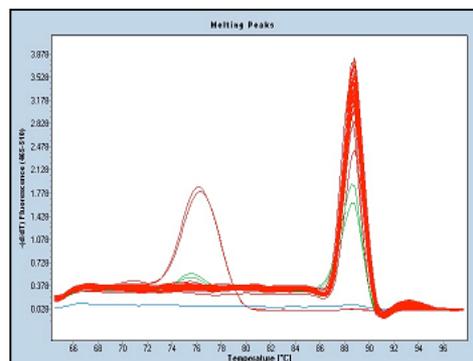
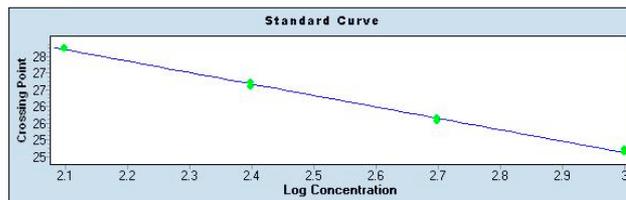


Figura 23. Curva de fusión de β actina.

Cantidad	Componente
4 μ L	SYBR Green
0,5 μ L	Primer β A Forward
0,5 μ L	Primer β A Reverse
0,8 μ L	Mg Cl ₂
3,2 μ L	H ₂ O
1 μ L	cDNA
TEMPERATURA: 59° C	

Obtención de las concentraciones absolutas. Recta patrón

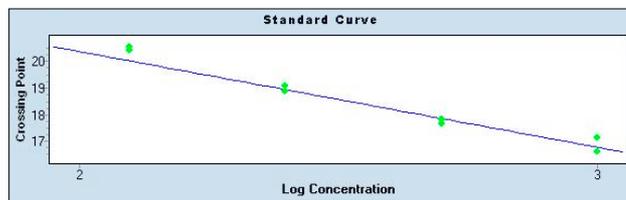
Se realizó la extracción de RNA de un ganglio mediastínico subcarinal, de pulmón normal y de tumor y se cuantificó la concentración inicial por espectrofotometría. Seguidamente, se realizaron las diluciones pertinentes para obtener las diferentes concentraciones: 1000, 500, 250, 125 y 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se realizó la RT y posteriormente la qPCR. Cada concentración estuvo relacionada con un determinado C_T . Los resultados generaron una recta donde el eje X fue el logaritmo de la concentración y el eje Y el C_T . Se realizó una recta patrón o curva estándar para cada uno de los genes problema y otra para cada uno de los dos genes de referencia. A partir de cada recta se obtuvieron los valores absolutos de concentración de RNA en cada muestra, tanto para el gen problema como para el gen de referencia. En las figuras 24-25 se expone la recta patrón para el CEACAM5, que es representativa del resto de curvas de los marcadores a estudio, y para la β actina (resto de rectas patrón en el Anexo 8). Cabe destacar que para la β 2microglobulina se utilizaron dos curvas; se usó una u otra según el momento de extracción de la muestra.



CEACAM5	Valor
Pendiente (m)	-3,41
Intersección y	34,87
Eficiencia	1,96
R ²	0,017

Tabla 28. Datos de la recta patrón del CEACAM5. R: error medio.

Figura 24. Recta patrón para el CEACAM5.



β actina	Valor
Pendiente (m)	-3,57
Intersección y	28,76
Eficiencia	1,91
R ²	0,034

Tabla 29. Datos de la recta patrón de la β actina. R: error medio.

Figura 25. Recta patrón para la β actina.

Las RT-qPCR de cada muestra, las rectas patrón y la obtención de las concentraciones absolutas fueron realizadas por dos técnicos de laboratorio que no conocían la información clínica de los pacientes, ni del tiempo libre de enfermedad ni de la supervivencia.

Normalización de las concentraciones absolutas por los genes de referencia

Los genes de referencia fueron la β actina (β A) y la β 2microglobulina (β 2M). Se eligieron éstos porque las bases de datos públicas muestran una expresión homogénea de estos genes en el pulmón normal y en el ganglio sano. Además, diversos estudios que analizan la expresión de marcadores moleculares de cáncer de pulmón en ganglio y pulmón, utilizan estos genes de referencia. Se eligieron dos para conocer la variabilidad intraensayo, comparando la expresión normaliza-

da según el gen de referencia, y así tener una visión más cercana a la expresión real del marcador en el tejido.

La concentración absoluta de cada determinación de los marcadores o genes problema en una muestra se dividió por la concentración de cada determinación de los dos genes de referencia.

$$x_A = \frac{\text{marcador, determinación}_A}{\text{gen de referencia 1, determinación}_A}$$

x_A : concentración normalizada de la muestra, primera determinación.

[marcador, determinación_A]: concentración absoluta del gen problema, primera determinación.

[gen de referencia 1, determinación_A]: concentración absoluta del gen de referencia, primera determinación.

$$x_B = \frac{\text{marcador, determinación}_B}{\text{gen de referencia 1, determinación}_B}$$

x_B : concentración normalizada de la muestra, segunda determinación.

[marcador, determinación_B]: concentración absoluta del gen problema, segunda determinación.

[gen de referencia 1, determinación_B]: concentración absoluta del gen de referencia, segunda determinación.

A partir de las dos concentraciones normalizadas, se realizó la media, obteniendo la concentración absoluta normalizada final (CAN). Se determinaron las desviaciones estándares.

$$CAN = \frac{x_A + x_B}{2}$$

CAN: concentración absoluta normalizada final.

Para cada marcador, se obtuvieron dos concentraciones absolutas normalizadas finales por cada muestra dado que se utilizaron dos genes de referencia. Se agruparon los resultados por pacientes.

Determinación del valor normal a través de un *pool* de muestras normales

Para determinar el valor normal del tejido pulmonar se construyó una muestra a través de la mezcla a iguales concentraciones de RNA de 27 muestras de tejido pulmonar normal. A esta nueva muestra de referencia se le realizó la RT y posteriormente una RT-qPCR de 10 alícuotas para cada marcador a estudio y de los 2 genes de referencias. Esto nos permitió validar la reproducibilidad de la técnica.

Se eligieron los valores más consistentes entre sí y se realizó la media aritmética para determinar el valor de concentración absoluta de cada marcador y el valor de los genes de referencia. Se normalizó la concentración absoluta del tejido pulmonar normal en relación al gen de referencia, para cada marcador.

Determinación de la concentración relativa

Para determinar la concentración relativa de las muestras tumorales respecto al pulmón normal, tenemos varias opciones (ver Anexo 6). Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, que se resume en la siguiente fórmula.

$$x = \Delta C_{T, \text{MUESTRA A ESTUDIO}} = C_{T, \text{GEN A ESTUDIO}} - C_{T, \text{GEN REFERENCIA}}$$

$$y = \Delta \bar{x} C_{T, \text{POOL NORMAL}} = \bar{x} C_{T, \text{GEN A ESTUDIO}} - \bar{x} C_{T, \text{GEN REFERENCIA}}$$

$$\text{Incremento relativo del gen (fold change)} = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(x-y)}$$

Dado que $2^0 = 1$. Este método nos permite obtener la concentración relativa del gen problema para cada muestra, y lo expresa como un incremento relativo a partir de los C_T .

Los valores extremos de concentración relativa no se eliminaron pero se tuvo en cuenta su carácter extremo en el análisis de los datos.

Determinación del punto de corte (*cutoff*) diagnóstico

Un *fold change* por encima de 2 se consideró como sobreexpresión, mientras que por debajo de 0,5 se consideró infraexpresión.

Análisis estadístico

Estudio descriptivo

Se procedió a un análisis descriptivo de la serie tumoral, también por marcador, según medidas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar y rango intercuartílico) según criterios de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk).

Análisis bivariantes y multivariantes

Se realizó un análisis de la concentración absoluta normalizada de cada marcador entre las series tumorales y de pulmón normal, mediante el test de ANOVA (*analysis of variance*, análisis de la varianza) o Kruskal-Wallis, según fue preciso. Seguidamente, se realizó un análisis de las variables clínicas asociadas a los marcadores moleculares según Chi-cuadrado o Fisher, según fue preciso, para variables cualitativas. Para variables cuantitativas se utilizó el test de ANOVA o Kruskal-Wallis, y t de Student o U de Mann Whitney. Aquellas variables que mostraron una asociación con p-valor $< 0,10$ o clínicamente relevantes y que no presentaron interacción entre ellas se consideraron en un modelo de regresión logística binaria u ordinal siendo la variable dependiente los niveles de marcadores moleculares (expresión binaria o con tres estratos de expresión -infraexpresión, expresión normal y sobreexpresión-).

Se realizó un análisis de Kaplan Meier para determinar el tiempo libre de enfermedad (TLE) y la supervivencia (OS). Se utilizó el test de log-rank para comparar las curvas de supervivencia en función de la expresión de marcadores

moleculares o de la combinación de marcadores y en función de las variables clínicas relevantes. Aquellas variables que mostraron una asociación estadísticamente significativa en el test de log-rank ($p < 0.05$) o clínicamente relevantes y sin interacción entre ellas se analizaron en un modelo de regresión de Cox para determinar los factores predictores.

La bondad de ajuste de los modelos multivariantes se estudió según Hosmer-Lemeshow para la regresión logística binaria, Pearson y desviación para la regresión ordinal y prueba ómnibus para la regresión de Cox. Se utilizó el paquete estadístico SPSS 20.0®, el valor estadísticamente significativo considerado fue de p -valor $< 0,05$ en todos los casos y el intervalo de confianza fue del 95% en aquellos casos en que fue preciso.

En la elaboración y la redacción del estudio se han tenido en cuenta las recomendaciones STARD (*standards for reporting of diagnostic accuracy*), las REMARK (*reporting recommendations for tumor marker prognostic studies*), las CONSORT (*consolidated standards of reporting trials*)(277-280) y las guías MIQE (*minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments*)(281).

Tratamiento de los casos sin determinación, *missing*, y *outliers*.

Se excluyeron del análisis aquellos casos cuyas muestras se analizaron como mínimo en 3 ocasiones y en ninguna de ellas fue técnicamente factible obtener curva de amplificación mediante RT-qPCR. En el diagrama de flujo se reflejan aquellos marcadores con casos *missing*.

En aquellas muestras tumorales con la determinación de concentración absoluta por cuadruplicado del gen problema o del gen de referencia, se eligieron los valores más constantes para realizar la media aritmética y obtener la CAN de cada caso, desechando excepcionalmente los valores extremos para cada muestra. En las muestras con dos determinaciones del gen problema o de referencia, en caso de un valor final de CAN o concentración relativa extrema, éste no se eliminó pero se tuvo en cuenta su carácter extremo en el análisis de los datos.

Estudio de restadificación ganglionar molecular

La serie ganglionar incluye 401 muestras ganglionares torácicas de 100 pacientes.

Grupo A (pacientes sin neoplasia). 25 muestras ganglionares hiliares pulmonares o mediastínicas de 17 pacientes intervenidos por patología no neoplásica.

Grupo B (CPNCP pN0-1). 349 muestras ganglionares hiliares pulmonares o mediastínicas de 76 pacientes intervenidos de CPNCP, con resección completa macroscópica y microscópica y sin metástasis.

- 283 muestras ganglionares de 60 pacientes pN0
- 66 muestras ganglionares de 16 pacientes pN1
 - 1 muestra recogida con afectación histológica de 1 paciente.
 - 65 muestras recogidas sin afectación ganglionar histológica de 16 pacientes.

De cada paciente se analizaron ≥ 3 ganglios, ≥ 1 ganglio hilar y ≥ 2 ganglios mediastínicos.

Grupo C (CPNCP pN2). 27 muestras ganglionares hiliares pulmonares o mediastínicas de 7 pacientes intervenidos de CPNCP con afectación ganglionar histológica y resección completa macroscópica y microscópica.

- 6 muestras ganglionares mediastínicas con afectación histológica
- 2 muestras ganglionares hiliares con afectación histológica
- 19 muestras ganglionares hiliares y mediastínicas sin afectación histológica

De cada paciente se analizaron ≥ 3 ganglios, ≥ 1 ganglio hilar y ≥ 2 ganglios mediastínicos.

Valores basales y patológicos

Para determinar los valores basales y patológicos de los marcadores, se eligieron las siguientes muestras.

- **VALORES BASALES.** Grupo A, 25 ganglios de 17 pacientes sin neoplasia.
- **VALORES PATOLÓGICOS.** Valores por encima del punto de corte diagnóstico.

Protocolo de estadificación, recogida de datos y seguimiento

El protocolo de estadificación clínica y el test de referencia (estadificación quirúrgico-patológica) fue el mismo que para el estudio pronóstico tumoral. La recogida de datos incluyó las variables clínicas del estudio pronóstico, la expresión tumoral de marcadores e información de expresión ganglionar. No incluyó la metilación de marcadores a nivel ganglionar. En el caso del grupo A, el protocolo fue menos extenso. Se siguió el mismo protocolo de seguimiento que para el estudio pronóstico tumoral.

Potencia estadística del estudio de restadificación ganglionar molecular

Inicialmente se calculó el tamaño muestral necesario para detectar diferencias de expresión a nivel ganglionar entre tres grupos de pacientes: los pacientes con ganglios sin neoplasia, los pacientes con CPNCP pN0 y los pacientes con CPNCP pN1-2. No obstante, el objetivo real del estudio es comparar el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia de los pacientes pN0-1 una vez restadificados a molecular N0, molecular N1 y molecular N2. Esto nos hizo replantearnos si estaba indicado estimar el tamaño muestral en este estudio.

Este estudio incluye 76 pacientes a restadificar con una mediana de seguimiento de 32 meses (mínimo 2 días, máximo 61 meses). La supervivencia documentada en la literatura, a los 5 años, de los pacientes pN0 es del 56%, de los pN1 es del 38% y de los pN2, 22%(73). Las necesidades de tamaño muestral fijando un error tipo I del 5% y una potencia del 80%, superan ampliamente los 50 pacientes por grupo, por tanto a este estudio se le debería asociar un cariz observacional o exploratorio. Los resultados obtenidos nos permitirán generar hipótesis que tendrán que ser verificadas en futuros estudios con un tamaño muestral adecuado para dicho objetivo.

Protocolo de procesamiento y procedimientos moleculares

Para todas las muestras ganglionares se siguió el mismo protocolo de procesamiento, transporte, extracción, diseño de los *primers*, RT-qPCR y determinación de la concentración absoluta y relativa que para el estudio pronóstico tumoral.

Determinación del punto de corte (*cutoff*) diagnóstico

Concentración absoluta. Curvas ROC. Área bajo la curva

Para determinar el *cutoff* diagnóstico que nos permita clasificar una muestra ganglionar como sobreexpresada, mediante la concentración absoluta, se utilizaron las curvas ROC (*receiver operating characteristic*) y el correspondiente AUC (*area under curve, área bajo la curva*). Se eligió preferentemente el punto de mínimo distancia ROC (punto que minimiza la distancia entre la curva ROC y la sensibilidad y especificidad del 100%) como punto de corte.

A partir de las concentraciones absolutas normalizadas de las 25 muestras ganglionares del grupo A y de 42 muestras tumorales (19 del grupo D y 23 casos de los grupos B y C de los cuales teníamos muestra congelada en el Banco de Tumores del HUB-ICO-IDIBELL), se estableció el punto de corte considerado como límite superior del valor normal para cada uno de los marcadores en ganglio torácico.

Se realizaron también las curvas ROC entre la concentración absoluta normalizada de todas las muestras ganglionares (376) de los pacientes con CPNCP

respecto la recidiva y la mortalidad de cada paciente, para determinar el mejor punto de corte de concentración que varía el pronóstico.

La presencia de un ganglio con expresión (CAN) por encima del *cutoff* fue suficiente para considerar el paciente molecular N1 ó N2, según la localización anatómica del ganglio. En el caso de combinación de marcadores, la presencia de cualquier marcador por encima del *cutoff* a nivel ganglionar era suficiente para considerar al paciente molecular N1 ó N2, según la localización anatómica.

Concentración relativa

Para la concentración relativa, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. El *cutoff* seleccionado fue un *fold change* de 2; por tanto, por encima de 2 se consideró como sobreexpresión. Las consideraciones sobre cómo se restadificaron los pacientes fueron las mismas que para la concentración absoluta.

Análisis estadístico

El estudio estadístico fue esencialmente el mismo. Se procedió a un análisis descriptivo de toda la serie. En la mayoría de los casos se utilizó la mediana o la media aritmética; dado que algunas muestras del grupo A tienen réplicas, cuando fue preciso, se utilizó la media geométrica como valor único para un paciente. El tratamiento de los casos sin determinación, *missing* y *outliers* fue el mismo que en el estudio pronóstico tumoral.

Resultados

Concordancia entre la estadificación clínica y la patológica

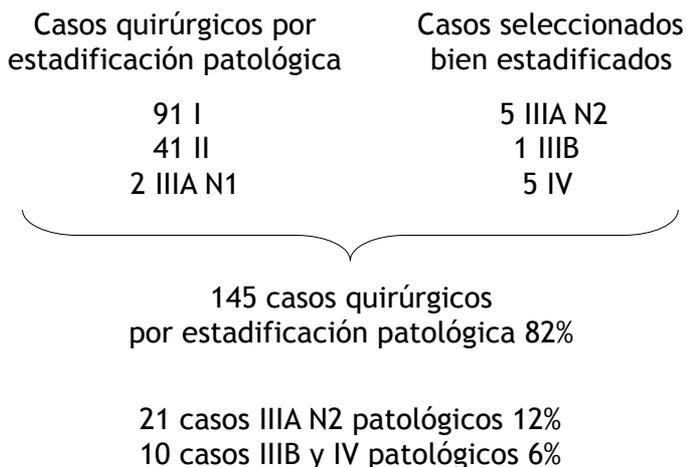
En el presente apartado resumimos los resultados publicados en el artículo que está en el Anexo 1. La estadificación clínica coincidió con la patológica en 102 de 176 casos (58%). Esto comporta un índice kappa global moderado (0,54; IC 95% 0,44-0,63). La mejor concordancia se obtuvo en el estadio IA (índice kappa 0,68; 0,53-0,82). De los 74 (42%) casos discrepantes, en 53 (30%) hubo infraestadificación clínica: 22 de los cuales (41% de este grupo) eran estadios con indicación quirúrgica tanto por estadificación clínica como por estadificación patológica, 21 (40%) eran estadios IIIA con afectación ganglionar mediastínica patológica y 10 (19%) eran estadios IIIB y IV. En 21 casos (12%) hubo supraestadificación y todos ellos eran quirúrgicos. Respecto a la estadificación ganglionar, fue concordante en 123 casos (69%), con un índice kappa bajo (0,34; IC 0,23-0,44).

El grupo de pacientes al que se le había realizado PET o PET-TC (137 casos; 78%) presentaba un porcentaje de concordancia similar al de la población total (57%) y un índice kappa de 0,56 (0,45-0,67). En contra, el grupo al que no se le había realizado (39 casos) presentaba un porcentaje de concordancia de 62% y un índice kappa más bajo, de 0,39 (0,21-0,56) ($p > 0,05$). Estos resultados no parecen confirmar la aparente utilidad clínica de la PET-TC. No obstante, este estudio no se diseñó para evaluar la concordancia según la presencia o no de la PET-TC, por lo que el tamaño muestral podría no ser suficiente para evidenciar diferencias.

Teniendo en cuenta los resultados de la estadificación patológica, se habían operado correctamente 145 casos (82%): 91 de estadio I, 41 de estadio II y

2 casos de estadio IIIA con afectación hilar. A estos, cabe añadir los 11 casos fuera de protocolo: 5 de estadio IIIA con afectación ganglionar mediastínica, 1 de estadio IIIB y 5 de estadio IV que confirmaron el estadio clínico. En total, en 31 casos la indicación quirúrgica no fue correcta: 21 casos de estadio IIIA con afectación ganglionar mediastínica (12% del total de casos) fueron operados sin recibir el tratamiento neoadyuvante que estaba indicado y 10 casos de estadio IIIB y IV (6% del total) no deberían haberse operado (figura 26).

Figura 26.
Distribución de los pacientes según el tratamiento que deberían haber recibido de forma inicial de acuerdo al estadio patológico.



Estudio pronóstico tumoral

Diagrama de flujo

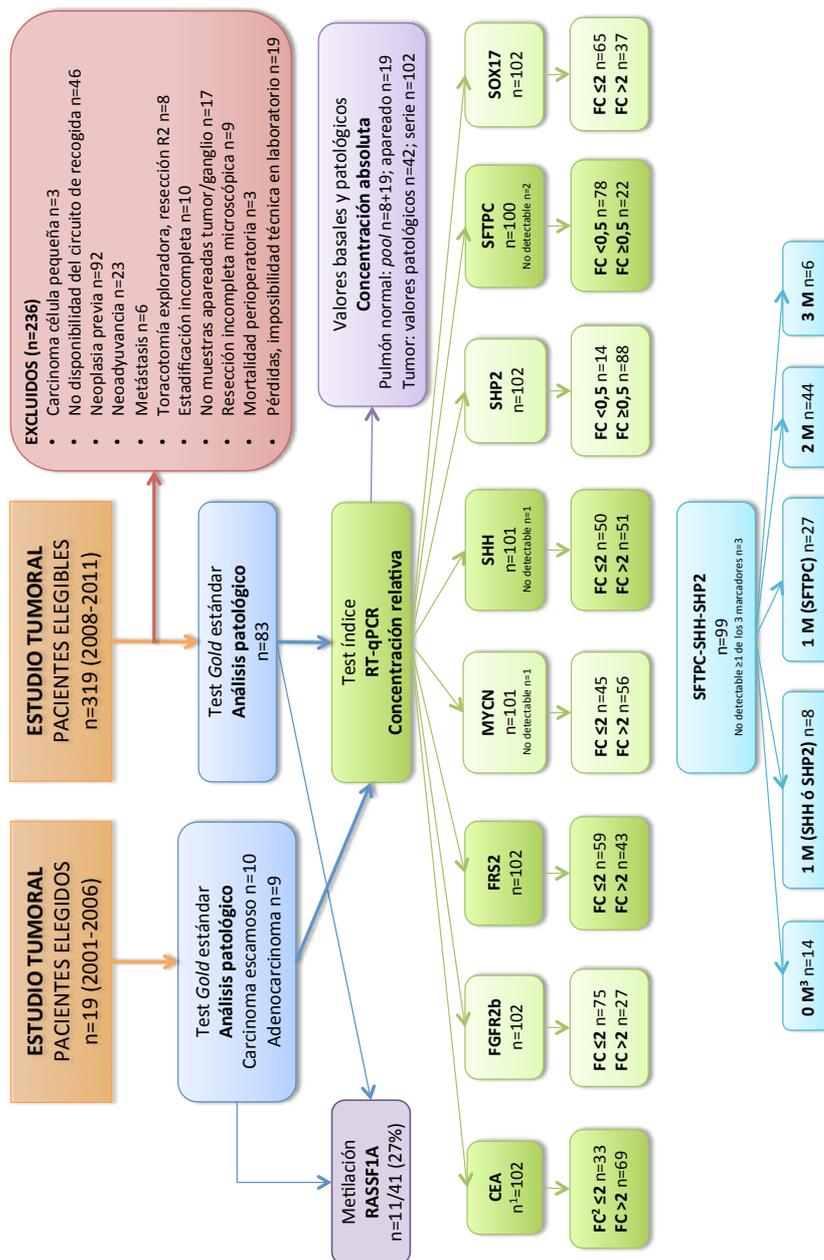


Figura 27. Diagrama de flujo del estudio tumoral. 1, n: número de pacientes; 2, FC: fold change; 3, M: marcador.

Descriptivo

Las principales características clínicas de los 102 pacientes a evaluar se detallan en la tabla 30. Con el término de recidiva local nos referimos a la recidiva a nivel del tórax, independientemente del hemitórax y e independientemente si es un nuevo primario o la misma neoplasia. Finalmente, exponemos la distribución de los pacientes por estadios según la anatomía patológica (tabla 31).

Tabla 30. Características clínicas de los pacientes de la serie tumoral (n=102). 1, n: número de pacientes; 2, %: porcentaje; 3, p/a: paquetes/año; 4, CE: carcinoma escamoso; 5, ADK: adenocarcinoma; 6, CCG: carcinoma de célula grande; 7, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande; 8, QT: quimioterapia; 9, RT: radioterapia.

Variable		n ¹	% ²	Variable	n	%	
Sexo	Hombre	87	85,3%	pN	pN0	77	75,5%
	Mujer	15	14,7%		pN1	16	15,7%
Edad	66,9 ± 7,6 años	102	100%		pN2	9	8,8%
Tabaquismo	50 (29) p/a ³	86	84,3%	pM	pM0	101	99%
Comorbilidad	Respiratoria	54	52,9%		pM1a, b	1	1%
	Cardíaca	20	19,6%	Estadio patológico	IA	31	30,4%
	Vascular	15	14,7%		IB	26	25,5%
	Hepática	14	13,7%		IIA	25	24,5%
Insuficiencia renal	5	4,9%	IIB		8	7,8%	
cT	cT1a	19	18,6%		IIIA	11	10,8%
	cT1b	20	19,6%		IIIB	0	0%
	cT2a	38	37,3%		IV	1	1%
	cT2b	9	8,8%	Tamaño tumoral	32 (28,5) mm	102	100%
	cT3	15	14,7%	Invasión intratumoral	Vascular	22	21,6%
	cT4	1	1%		Linfática	17	16,7%
cN	cN0	91	89,2%		Perineural	5	4,9%
	cN1	9	8,8%	Total	33	32,4%	
	cN2	2	2%	Histología	CE ⁴	50	49%
cM	cM0	101	99%		ADK ⁵	44	43,1%
	cM1	1	1%		CCG ⁶ /CNCG ⁷	5	4,9%
Estadio clínico	IA	38	37,2%		Otros	3	3%
	IB	35	34,3%	Cirugía realizada	Segmentectomía	5	4,9%
	IIA	11	10,8%		Lobectomía	81	79,4%
	IIB	12	11,8%		Bilobectomía	0	0%
	IIIA	5	4,9%		Neumonectomía	16	15,7%
	IIIB	1	1%	Adyuvancia	QT ⁸	18	17,6%
	IV	0	0%		RT ⁹	1	1%
pT	pT1a	22	21,6%		QT y RT	7	6,9%
	pT1b	18	17,6%	Ganglios resecaados	11 ± 4	102	100%
	pT2a	32	31,4%	Recidiva	Local	12	11,7%
	pT2b	14	13,7%		Distancia	11	10,8%
	pT3	16	15,7%		Local y distancia	6	5,9%
	pT4	0	0%		Total	29	28,4%

Estadio patológico	Carcinoma escamoso		Adenocarcinoma		CCG ³ /CNCG ⁴ Tumores mixtos		Total n	p
	n ¹	% ²	n	%	n	%		
I	22	44%	31	70,4%	4	50%	57	0,10
II	23	46%	7	15,9%	3	37,5%	33	
III (IIIA)	5	10%	5	11,4%	1	12,5%	11	
IV	0	0%	1	2,3%	0	0%	1	
TOTAL	50	100%	44	100%	8	100%	102	

Expresión tumoral

Selección de los marcadores tumorales

Tras la revisión de la literatura existente sobre las proteínas y genes implicados en el desarrollo pulmonar y escoger aquéllos que podrían ser potenciales candidatos a marcadores moleculares embrionarios, se realizó el análisis de los resultados existentes en bases de datos de *arrays -Gene Expression Omnibus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) y *Proyecto Oncomine® Research Edition* (www.oncomine.org)- y en *SAGE (Serial analysis of gene expression) Genie* para confirmar que eran buenos candidatos como marcadores moleculares. Fruto de esta búsqueda, se observó que los marcadores moleculares embrionarios que ofrecían resultados más homogéneos fueron CEACAM5, FRS2, SFTPC, SHH y SOX17. Por otra parte, FGFR2b, SHP2 y MYCN eran más variables pero mantenían una tendencia bastante marcada a estar sobreexpresados o infraexpresados a nivel tumoral, por lo que también los consideramos buenos candidatos. FRS2, MYCN y SHH se expresaban muy poco tanto en el pulmón normal como en la neoplasia de pulmón (<2 tags por 200.000). En referencia al tipo histológico, FGFR2b, MYCN y SHH se expresan más en carcinomas escamosos, mientras que CEACAM5, SFTPC y SOX17 se expresan más en adenocarcinomas. Finalmente, FRS2 y SHP2 se expresan de forma similar entre los dos tipos histológicos mayores. Los resultados se presentan en la tabla 32.

Tabla 31. Distribución de los pacientes por estadios según la anatomía patológica (excluidos los segundos primarios sincrónicos en un mismo paciente, dado que estos datos se utilizarán con las concentraciones absolutas normalizadas y relativas de los marcadores tumorales). 1, n: número de pacientes; 2, %: porcentaje; 3, CCG: carcinoma de célula grande; 4, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande.

Expresión tumoral respecto el pulmón normal

Se evaluaron los 8 marcadores moleculares de expresión propuestos. Además, se estudió el patrón de metilación del promotor del gen RASSF1A, que nos sirvió como control de calidad, en función de la proporción de casos positivos de la serie analizada.

En primer lugar se estudiaron las muestras para determinar la mediana de expresión en tejido tumoral [42 muestras tumorales confirmadas histológicamente: 21 pacientes (50%) carcinoma escamoso, 19 (45%) adenocarcinoma, 2 (5%) carcinoma de célula grande]. Para la evaluación de la expresión en pulmón normal se utilizaron 19 muestras de pulmón normal apareado de 19 pacientes con CPNCP y una muestra *pool* creada a partir de 27 muestras de pulmón. Posteriormente, se estudió la serie de interés (129 muestras tumorales de 102 pacientes afectados de cáncer de pulmón). Los datos de expresión de cada paciente se exponen en el Anexo 9.

Concentración absoluta

Se determinó la concentración absoluta normalizada por los dos genes de referencia, para cada marcador, se exponen los datos más relevantes en la tabla 33. Dado que había 3 grupos con menos de 30 pacientes y que los grupos no presentaban una distribución normal, se utilizaron tests no paramétricos casi de forma exclusiva (test de Kruskal Wallis).

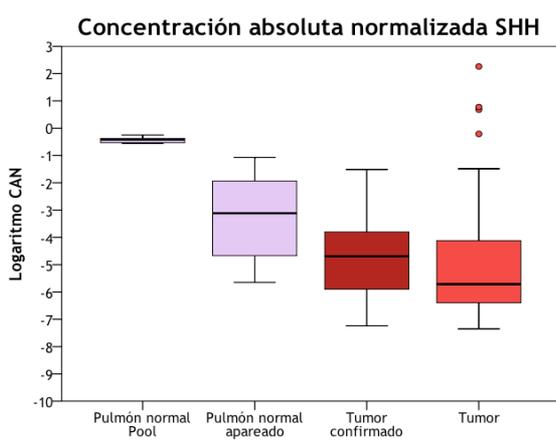
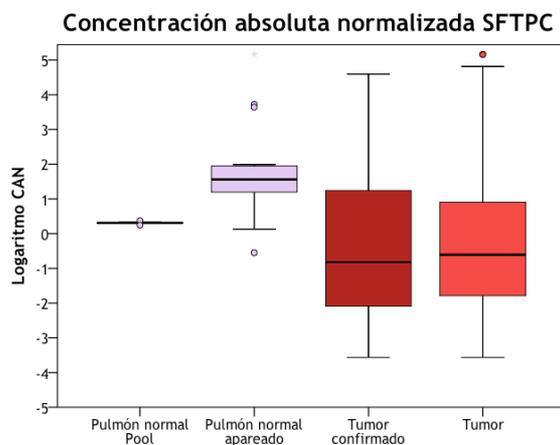
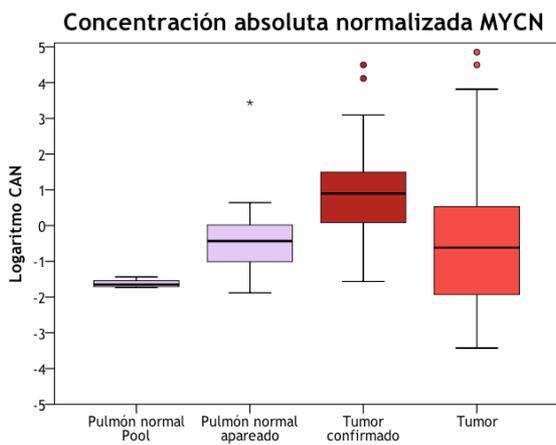
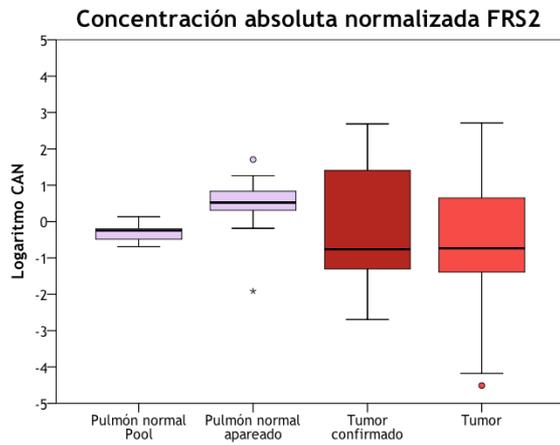
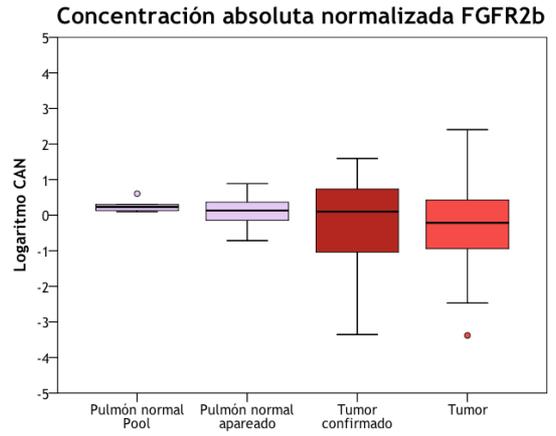
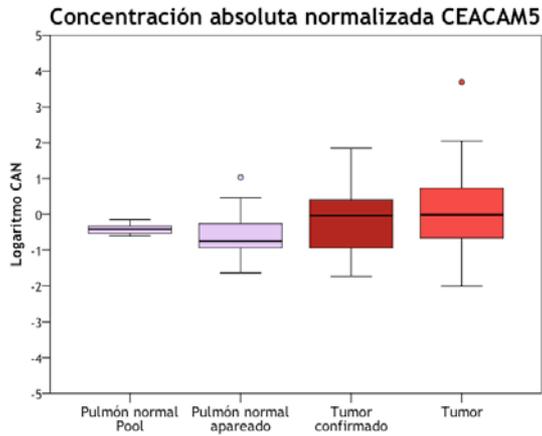
Todos los marcadores, excepto FGFR2b, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre la expresión tumoral y del pulmón normal. CEACAM5 y MYCN presentaban mayor expresión en el tumor que en el pulmón normal y esto era concordante con los datos revisados de la literatura. Las diferencias significativas de expresión de MYCN vienen dadas por la comparación entre las muestras tumorales confirmadas y la expresión del *pool* y en menor medida del apareado.

FRS2, SFTPC, SHH, SHP2 y SOX17 presentaban mayor expresión en el pulmón normal respecto el tumor. Todos estos presentaban resultados concordantes con la literatura, salvo SHP2, cuya expresión era variable en las bases de datos revisadas.

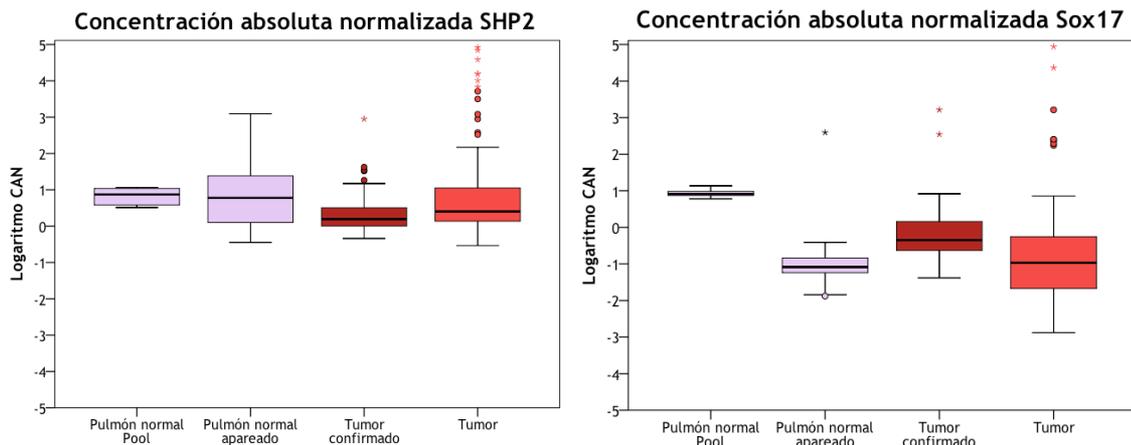
Sólo SHP2 y SHH presentaron diferencias relevantes entre la expresión de las dos series tumorales, ambos con mayor expresión en los tumores confirmados ($p=0,03$, $p=0,053$)

Tabla 33. Expresión tumoral y en pulmón normal de los marcadores moleculares embrionarios, medida como concentración absoluta normalizada. 1, n: número de muestras.

MARCADOR	EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES EMBRIONARIOS										P	
	Pulmón normal					Tumor						
	Concentración absoluta normalizada					Concentración absoluta normalizada						
	Pool (n ¹ =27)		Apareado (n=19)			Valores patológicos (n=42)			Total (n=129)			
	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	
CEACAM5	0,41	0,19	0,18	0,52		0,92	2,45	0,97	5,15		0,04	
FGFR2b	1,83	0,65	1,35	2,1		1,3	5,49	0,62	2,57		0,26	
FRS2	0,57	0,36	3,33	5,12		0,17	26,23	0,18	4,49		0,02	
MYCN	0,022	0,01	0,37	1,02		7,95	38,53	0,24	4,1		<0,05	
SFTPC	2,03	0,12	36,53	79,06		0,15	17,94	0,25	8,22		<0,05	
SHH	0,38	0,2	7,64·10⁻⁴	1,53·10 ⁻²		2,02·10⁻⁵	1,74·10 ⁻⁴	1,93·10⁻⁶	9,38·10 ⁻⁵		<0,05	
SHP2	7,77	7,25	6	26,32		1,56	2,29	2,52	10,13		0,01	
SOX17	8,13	3,58	0,082	0,095		0,45	1,23	0,11	0,54		<0,05	



Figuras 28-33. Expresión tumoral y de pulmón normal de los marcadores CEACAM5, FGFR2b, FRS2, MYCN, SFTPC y SHH, expresada como concentración absoluta normalizada. Las series de pulmón normal son dos: una de pulmón sano apareado de pacientes con CPNCP y otra un *pool* de muestras normales. La expresión tumoral se documenta para toda la serie (tumor) y para una serie de 42 muestras tumorales confirmadas (tumor confirmado).



Figuras 34-35. Expresión tumoral y de pulmón normal de los marcadores SHP2 y SOX17, expresada como concentración absoluta normalizada.

Concentración relativa

Seguidamente exponemos los resultados de expresión tumoral como concentración relativa respecto los valores basales que són el pulmón normal. Se han evaluado con los dos genes de referencia. El 20% del total de pacientes presenta infraexpresión de algún marcador embrionario, mientras que la sobreexpresión asciende hasta el 52% de los pacientes.

Los marcadores con mayor infraexpresión tumoral son FGFR2b, SHH y SOX17, mientras que los marcadores con mayor sobreexpresión son CEACAM5, MYCN y SHH.

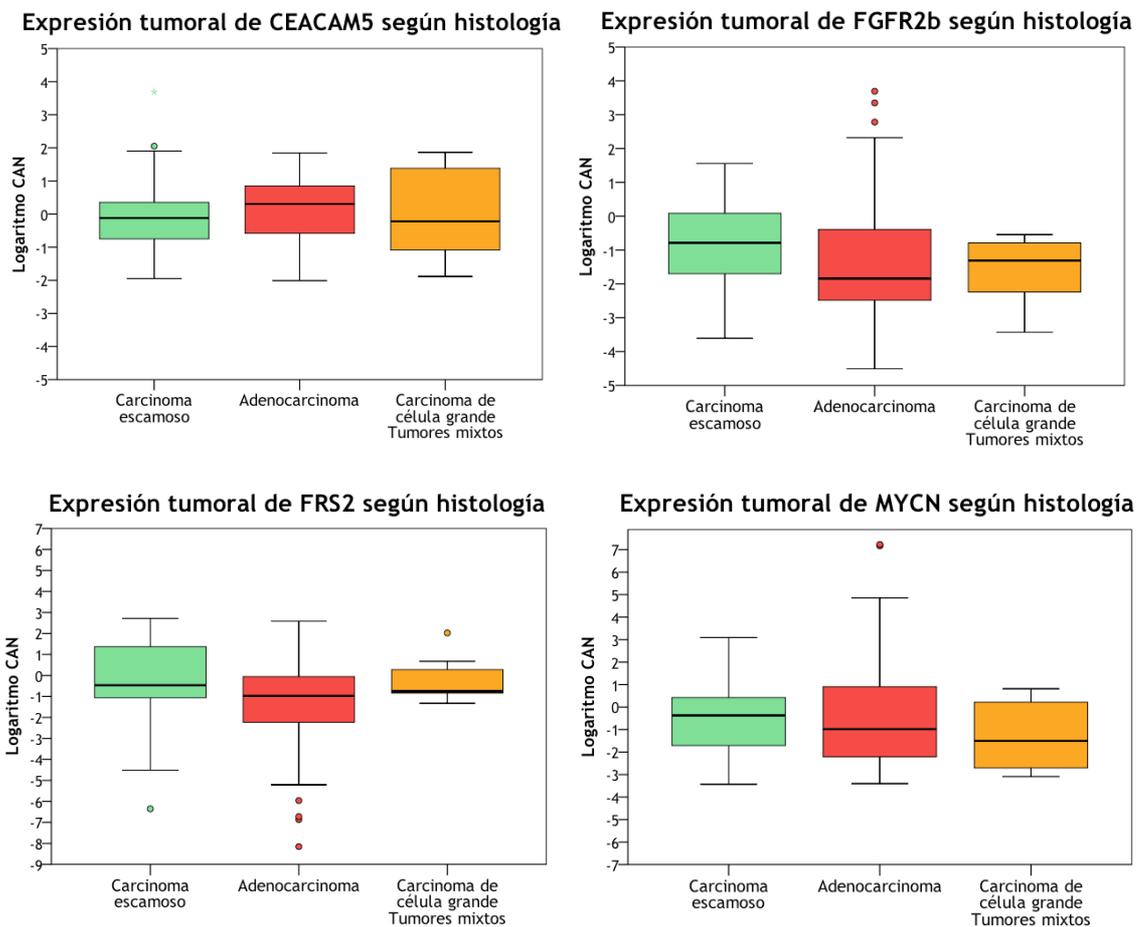
Marcador	Infraexpresión		Sobreexpresión		Concentración relativa (ng/ μ L)		C_T Pulmón (ciclos)
	n	%	n	%	Mediana	Q3-Q1	
CEACAM5	17	16,7%	69	67,6%	7,15	35,21	29,8
FGFR2b	51	50%	27	26,5%	0,51	1,97	26,7
FRS2	19	18,6%	43	42,2%	1,27	3,91	27,5
MYCN	14	13,9%	56	55,4%	2,6	21,07	33,4
SFTPC	13	13%	78	78%	0,014	0,29	18,8
SHH	24	23,8%	51	50,5%	2,12	15,98	33,2
SHP2	14	13,8%	49	48%	0,96	2,89	25,5
SOX17	20	19,6%	37	36,3%	1,3	2,9	28,1

Tabla 34. Concentración relativa tumoral respecto el pulmón normal, según los marcadores.

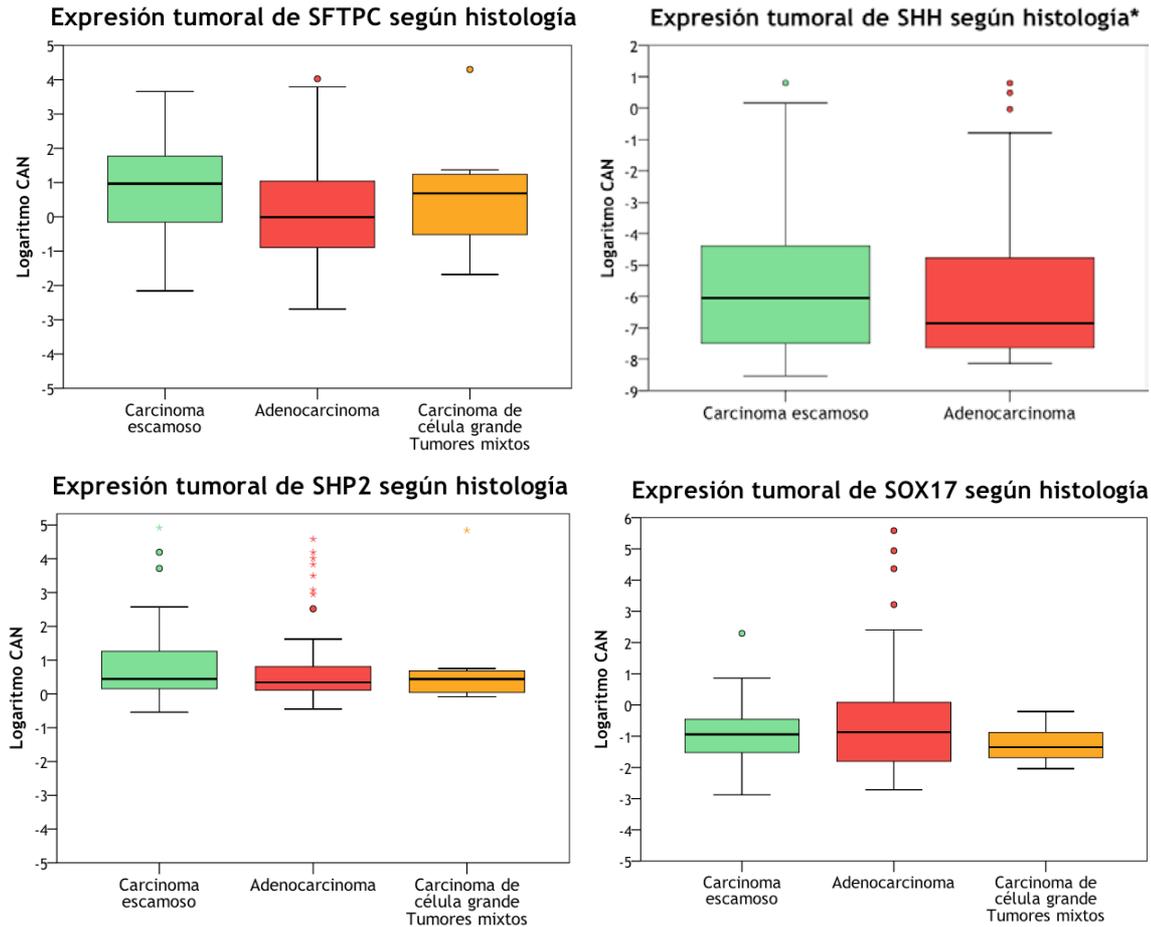
El C_T para la βA fue de 21,8 ciclos y para la $\beta 2M$ de 19,49 ciclos.

Expresión tumoral según histología

Se exploró el tipo histológico más frecuente para cada marcador, mediante la concentración absoluta (más información en el Anexo 10). Los carcinomas escamosos expresan más FGFR2b ($p=0,04$), FRS2 ($p=0,08$) y SFTPC ($p=0,09$) y presentan una tendencia a expresar más SHH ($p=0,13$) y MYCN ($p=0,5$) que otros tipos histológicos. CEACAM5 tiende a expresarse más en los adenocarcinomas ($p=0,24$). Por su parte, SHP2 y SOX17 presentaba similar expresión entre los tres principales tipos histológicos, aunque SOX17 se expresaba un poco menos en los carcinomas de célula grande, carcinomas neuroendocrinos de célula grande y en los tumores mixtos.



Figuras 36-39. Expresión tumoral de CEACAM5, FGFR2b, FRS2 y MYCN según histología. En el tercer grupo se incluyen tres tipos histológicos diferentes: los carcinomas de célula grande, los carcinomas neuroendocrinos de célula grande y los tumores mixtos.



Figuras 40-43. Expresión tumoral de SFTPC, SHH, SHP2 y SOX17 según histología. El percentil 25 del logaritmo de la CAN de SHH de los CCG, CNCG y TM es -70,84 ng/μL; se han omitido para poder representar adecuadamente las dos histologías más frecuentes. En el tercer grupo se incluyen tres tipos histológicos diferentes: los carcinomas de célula grande, los carcinomas neuroendocrinos de célula grande y los tumores mixtos.

Análisis de correlación. Factores asociados a expresión molecular tumoral.

Se analizaron los factores asociados a la expresión tumoral de los marcadores, mediante el análisis de los niveles de concentración relativa y mediante la tasa de sobreexpresión e infraexpresión. Se asumió que probablemente daría más información el análisis según el grado de expresión (infraexpresión, sobreexpresión) que no los niveles de concentración relativa. Este es el motivo por el que la tabla 35 (y Anexo 11) resume los resultados según del grado de expresión. No obstante, adjuntamos el análisis de correlación según los niveles en el Anexo 11.

MARCADOR		CEACAM5		FGFR2b		FRS2		MYCN		SFTPC		SHH		SHP2		SOX17	
Variable	n ¹	FC <0,5/>2	P	FC <0,5/>2	P	FC <0,5/>2	P	FC <0,5/>2	P	FC <0,5/>2	P	FC <0,5/>2	P	FC <0,5/>2	P	FC <0,5/>2	P
Sexo	Hombre	17/60	0,09	40/25	0,29	17/36	0,88	11/50	0,41	65/12	0,88	21/39	0,07	12/43	0,6	17/31	1
	Mujer	0/13		11/2		2/7		3/6		13/1		3/12		2/6		3/6	
Tabaco	Sí/pasivo	16/61	0,37	45/23	0,33	17/36	0,88	12/51	0,098	68/10	0,41	22/41	0,52	12/44	0,27	20/30	0,08
	No	1/12		6/4		2/7		2/5		10/3		2/10		2/5		0/7	
pT	pT1a	6/14	0,9	12/6	0,27	8/7	0,03	2/11	0,4	15/4	0,22	9/9	0,41	3/9	0,85	7/7	0,38
	pT1b	3/13		8/4		2/9		15/2		3/8		2/7		5/7			
	pT2a	3/24		16/12		4/16		6/19		24/5		8/17		3/18		6/13	
	pT2b	2/11		5/4		0/10		0/10		9/1		1/10		3/7		1/6	
	pT3	3/11		10/1		3/7		4/7		15/1		3/7		3/8		1/4	
	pN0	10/58		35/23		15/33		9/46		56/10		13/45		10/37		14/29	
pN	pN1	4/10	0,37	9/4	0,31	4/5	0,55	3/8	0,19	14/2	0,65	9/5	<0,05	2/8	0,95	5/6	0,5
	pN2	3/5		7/0		0/5		2/2		8/1		2/1		2/4		1/2	
	Sí	8/13		16/4		4/9		3/11		17/3		7/10		1/10		3/6	
Invasión vascular	No	9/60	0,02	35/23	0,047	15/34	1	11/45	0,84	61/10	1	17/41	0,6	13/39	0,28	17/31	0,31
	Sí	0/4		3/1		1/3		1/4		4/1		2/3		2/3		2/2	
Invasión perineural	No	17/69	0,6	48/26	1	18/40	0,72	13/52	0,33	74/12	0,72	22/48	0,35	12/46	0,07	18/35	0,34
	Sí	6/19		18/4		6/9		5/14		26/3		12/10		6/12		6/10	
Recidiva	No	11/54	0,69	33/23	0,16	13/34	0,34	9/42	0,61	52/10	0,09	12/41	0,02	8/37	0,39	14/27	0,97
	Sí	6/19		18/4		6/9		5/14		26/3		12/10		6/12		6/10	

Tabla 35. Factores asociados a expresión molecular tumoral. El análisis de SFTPC se realizó en base a 100 pacientes; el de SHH, en base a 101. Se muestran las variables que correlacionan con algún marcador con $p < 0,05$. Se han analizado también edad, histología, estadio patológico, invasión linfática intratumoral, tipo de resección y tipo de recidiva sin detectar ninguna variable asociada/con tendencia a asociarse a la expresión tumoral ($p < 0,1$) (Anexo 11). 1, n: número pacientes; 2, FC: fold change.

Los pacientes con recidiva se correlacionaban con una mayor tasa de infraexpresión tumoral de SFTPC, SHH (90% vs 73%, $p=0,09$; 41% vs 17%, $p=0,02$) o SHP2 ($p=0,39$). Así mismo, la invasión vascular intratumoral se asociaba a una mayor infraexpresión tumoral de CEACAM5 y FGFR2b (36% vs 11% y 73% vs 44%, respectivamente, $p<0,05$). Los pacientes pN1-2 se asocian a mayor infraexpresión tumoral de SHH ($p<0,05$) y los pacientes pT2 y pT3 a mayor sobreexpresión de FRS2 ($p=0,03$).

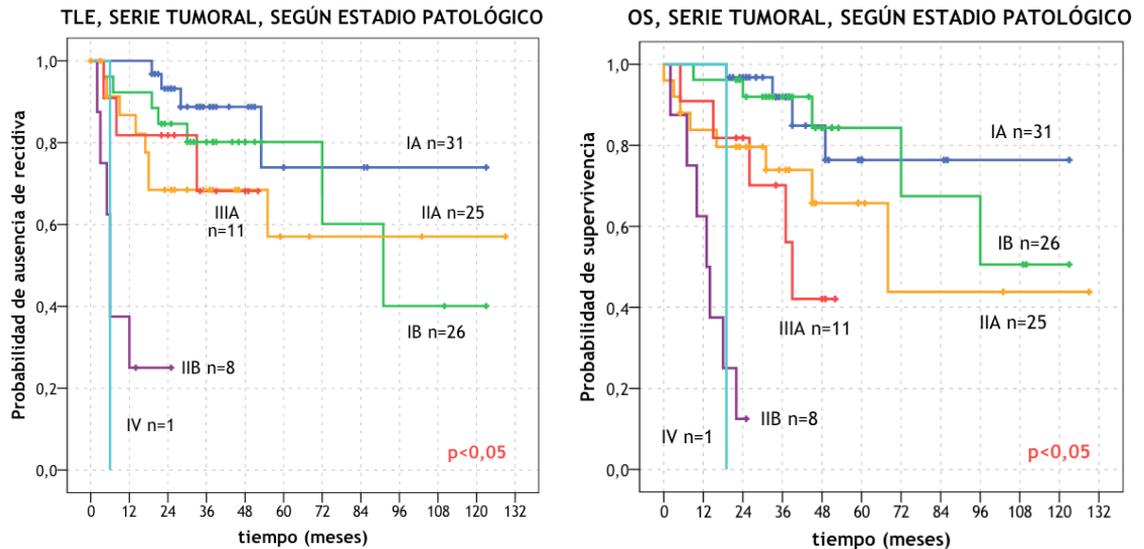
Los pacientes con adenocarcinoma presentaban mayor concentración relativa y mayor sobreexpresión de CEACAM5 que los carcinomas escamosos (CR $p=0,03$; SE $p=0,054$). Por su parte, los pacientes con carcinoma escamoso presentaban mayor concentración relativa de MYCN ($p=0,04$) y mayor sobreexpresión de FGFR2b ($p=0,1$). MYCN presentaba una tendencia a mayor sobreexpresión en los pacientes con invasión linfática intratumoral ($p=0,1$). En cambio, SHP2 estaba más infraexpresado en los pacientes con invasión linfática o perineural intratumoral ($p=0,26$; $p=0,07$) y SOX17 presentaba cifras de concentración relativa bajas en los pacientes con invasión intratumoral ($p>0,05$).

El análisis multivariante de los factores asociados a expresión tumoral de los marcadores se expone en el Anexo 12.

Factores asociados al tiempo libre de enfermedad y supervivencia global

La media del TLE de la serie tumoral fue de $84 \pm 7,5$ meses, con un TLE a 1 año de 86%, a 5 años del 65% y 10 años del 48%. La media global de supervivencia fue de $83,8 \pm 6,9$ meses, con una supervivencia al año de 91%, a los 5 años del 66% y a los 10 años de 46%. Ciento-un pacientes presentaban resección macroscópica y microscópica completa, mientras que 1 paciente presentó resección incompleta macroscópica.

Se realizó un análisis del tiempo libre de enfermedad y supervivencia global en función de variables clínicas relevantes. La distribución según estadios muestra que, salvo el estadio IIB, la serie era comparable con los resultados publicados en la literatura por la IASLC(56) y la serie global de carcinoma broncogénico del Servicio de Cirugía Torácica del HUB.

**Figuras 44-45.**

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de la serie tumoral según estadio patológico.

En esta serie, los pacientes con IB y IIA presentan mejor evolución, así como los pacientes con estadio IIIA (70% a los 3 años vs un 38% en la serie de la IASLC) y esto es así porque nuestra serie recoge sólo casos quirúrgicos seleccionados, mientras que la serie de la IASLC incluye más tipos de pacientes IIIA. En cambio, nuestra serie presenta peor evolución de los pacientes en estadio IIB (<20% a los 2 años vs el 57% de la IASLC, aproximadamente). Las diferencias en el tamaño muestral entre las dos series (102 vs 15.952 pacientes) seguramente también explican estas diferencias de supervivencia.

Entre los factores anatómicos y de tamaño de los tumores, se evidenció menor TLE y supervivencia en los pacientes pT3 ($p < 0,05$). Así mismo, la media de OS de los pacientes con tumores > 3 cm era significativamente menor ($72 \pm 9,5$ meses) que la de los pacientes con tumores ≤ 3 cm ($93,5 \pm 8,6$ meses). Estas diferencias eran más evidentes en los tumores de > 5 cm. También presentaban menor TLE y OS los pacientes con invasión linfática y perineural ($p < 0,05$).

No existieron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes pN0-2, aunque se evidenció una peor supervivencia a medida que se extendía anatómicamente la afectación ganglionar. Tampoco influyó el número de ganglios linfáticos extirpados.

VARIABLE		n ¹	TLE			OS		
			Media ²	SD ²	p	Media ²	SD ²	p
Sexo	Hombre	86	84	7,7	0,94	84,5	7,2	0,8
	Mujer	16	38	4,4		38,6	4	
Edad	< 70 años	62	82,5	8,4	0,83	88,6	7,4	0,36
	≥ 70 años	40	82,2	12,3		74,6	10,7	
Tabaquismo	Sí y pasivo	86	80,3	7,4	0,99	79,9	7	0,77
	No	16	94,7	14,4		80,6	19,4	
pT	pT1a	22	76	5,3	0,03	69,1	7,7	<0,05
	pT1b	18	76,6	15,5		106,1	10,5	
	pT2a	32	79,9	10,6		90,9	9,9	
	pT2b	14	97	15,9		70,7	17,1	
	pT3	16	29,9	5,8		26,8	4,6	
Tamaño tumoral	≤2 cm	23	73,1	5,9	0,27	69,3	7,6	0,001
	(2-3] cm	25	80,2	12		95,6	10	
	(3-5] cm	29	72,3	11,8		79,4	10,1	
	(5-7] cm	20	72,8	14,7		52,4	13	
	>7 cm	5	33,8	10,5		27	9,6	
pN	pN0	77	90,2	8	0,23	87,7	7,6	0,52
	pN1	16	41,6	5		45,5	4,4	
	pN2	9	36,7	7,2		39	6,2	
Ganglios resecaados	<11	41	87,9	11,1	0,51	97,7	10,2	0,03
	≥ 11	61	77,7	9,2		71,7	8,1	
Estadio patológico	IA	31	101,5	10,9	<0,05	103,1	9,1	<0,05
	IB	26	85,3	11,1		95,3	10,1	
	IIA	25	83,8	12,9		78,2	14,6	
	IIB	8	10,5	3,1		13,9	2,5	
	IIIA	11	41	5,5		37,4	5	
	IIIB/IV	1	6	0		19	0	

Tabla 36. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de la serie tumoral según variables clínicas relevantes (1). 1, n: número de pacientes; 2: meses. Se analizó el TLE y OS según la comorbilidad respiratoria, cardíaca y vascular sin evidenciar diferencias a considerar.

Como era de prever, se evidenció menor TLE y OS de forma estadísticamente significativa en los estadios IIB, III y IV. En el análisis por estadios globales, se constató que existían diferencias estadísticamente significativas ($p=0,01$) entre los estadios I ($91 \pm 8,6$ meses), II ($70,1 \pm 11,7$ meses) y III-IV ($38,1 \pm 5,8$ meses) y entre el estadio I y II ($p=0,003$), en cuanto al TLE. Esta situación se repetía en el análisis de la supervivencia: estadio I (media: $96,7 \pm 7,6$ meses), estadio II ($64,3 \pm 12,4$ meses) y estadio III-IV ($35,9 \pm 4,8$ meses) $p<0,005$, y entre el estadio I y II ($p<0,005$). La quimioterapia adyuvante estaba asociada a mejor supervivencia en el estadio II ($p=0,06$), concretamente para el estadio IIB.

VARIABLE	n ¹	TLE			OS			
		Media ²	SD ²	p	Media ²	SD ²	p	
Histología	Adenocarcinoma	44	84,7	9,8	0,66	78,3	8,9	0,38
	Carcinoma escamoso	50	88,3	9,3		86,9	9,5	
	CCG ³ /CNCG ⁴ /Mixto	8	41,5	8,6		52,2	6,3	
Invasión vascular	Sí	22	69,5	6,5	0,63	68	6,9	0,54
	No	80	82,5	8		82,4	7,5	
Invasión linfática	Sí	17	28,5	5	<0,05	34,7	4,6	0,02
	No	85	90,9	7,9		88,5	7,3	
Invasión perineural	Sí	5	17,6	3,7	0,02	26,1	7,1	0,002
	No	97	85,8	7,6		87	7,7	
Invasión intratumoral	Sí	33	60,5	6,3	0,22	87	7,9	0,27
	No	69	87,1	8,4		59,8	6,4	
Tipo de resección	Segmentectomía	5	25,6	5,6	0,33	31,4	5	0,03
	Lobectomía	81	86	8,3		89,4	7,7	
	Neumonectomía	16	74,8	14,8		56,1	13,3	
Localización	LSD ⁵	32	88,5	18,4	0,08	85,9	17,9	0,02
	LM ⁶	2	-	-		-	-	
	LID ⁷	17	33,5	6,4		33,6	5,2	
	LSI ⁸	30	87,8	10,4		79,4	10,7	
	LII ⁹	17	60,8	11,7		84,6	10,3	
	Bronquios principales	4	94,2	24,9		71,7	25,7	
QT adyuvante	Sí	18	56,7	12,4	0,79	75	11,8	0,06
Estadio II	No	15	72,9	15,8		46,8	13,6	
QT y RT adyuvante	Sí	7	38,8	7,9	0,91	40	7,2	0,28
Estadio III	No	4	36	2,1		34	4	
Tipo de recidiva	Local	12	18,2	5,1	0,03	60,2	13,8	0,06
	Distancia	11	11,2	2,7		20,5	4,8	
	Local y a distancia	6	41,5	13,4		48	12,9	

Tabla 37. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de la serie tumoral según variables clínicas relevantes (2). 1, n: número de pacientes; 2, meses; 3, CCG: carcinoma de célula grande; 4, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande; 5, LSD: lóbulo superior derecho; 6, LM: lóbulo medio, TLE y OS 100% a 5 años; 7, LID: lóbulo inferior derecho; 8, LSI: lóbulo superior izquierdo; 9, LII: lóbulo inferior izquierdo.

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según la expresión tumoral de los marcadores

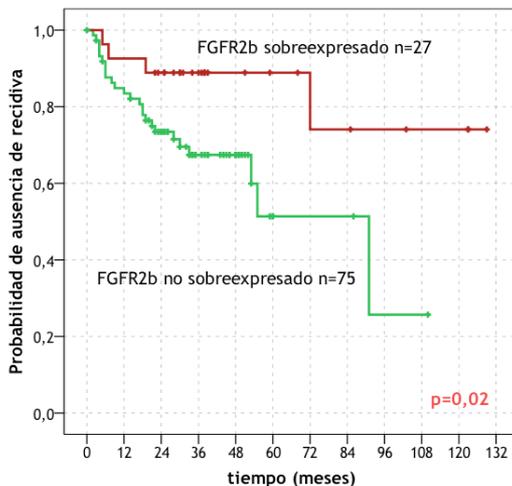
Tabla 38. Resumen del análisis univariante del tiempo libre de enfermedad y supervivencia global en función de la expresión de los marcadores moleculares aislados o en combinación. Se añade el control de calidad (metilación del promotor de RASSF1A). 1: n, número de pacientes; 2: meses.

Los 8 marcadores embrionarios se estratificaron en tres estratos: sobreexpresión (*fold change*, FC >2), sin diferencias en la expresión (FC 2-0,5) e infraexpresión (FC <0,5) (Anexo 13). Observadas las diferencias entre estratos, se colapsaron los estratos sin diferencias para obtener dos curvas de expresión claramente interpretables.

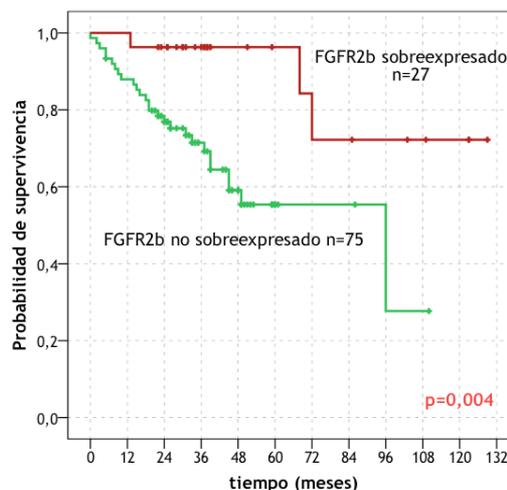
MARCADOR			TLE			OS		
EXPRESIÓN	<i>Fold change</i>	n ¹	Media ²	SD ²	p	Media ²	SD ²	p
FGFR2b	≤2	75	64,9	7,2	0,02	68,3	6	0,004
	>2	27	107,4	10,2		110,5	9,4	
SHH	≤2	50	61,6	7,9	0,03	68,2	6,9	0,07
	>2	51	100,6	8,7		95,4	9	
SFTPC	<0,5	78	49,4	3,8	0,006	51,8	3,3	0,009
	≥0,5	22	112	8,9		108,7	8,9	
SHP2	<0,5	14	75,7	16,4	0,056	65,4	20,4	0,055
	≥0,5	88	83	7,4		83,1	6,8	
CEACAM5	≤2	33	43,1	3,8	0,23	44,8	3,8	0,22
	>2	69	91,7	7,9		89,4	7,7	
FRS2	≤2	59	68,3	9,5	0,12	79,3	8,8	0,85
	>2	43	98,8	9,3		86,4	9,3	
MYCN	≤2	45	64,3	7,9	0,26	71,6	7,5	0,39
	>2	56	92,4	9		88,4	9	
COMBINACIÓN	Marcadores	n	Media	SD	p	Media	SD	p
SFTPC-SHH-SHP2	0	14	114,1	8,6	0,001	115,1	7,3	0,002
	1 (SHH ó SHP2)	8	103,5	15		90,4	17,8	
	1 (SFTPC)	27	57,9	6,5		54,6	6,2	
	2	44	43,6	3,4		46,9	3,2	
	3	6	13,7	3,4		21,8	4,7	
METILACIÓN	Status	n	Media	SD	p	Media	SD	p
RASSF1A	No metilado	30	73,3	8,4	0,37	73,1	8,5	0,76
	Metilado	11	71,4	16,5		90,5	15,5	

FGFR2b

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE FGFR2b



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE FGFR2b



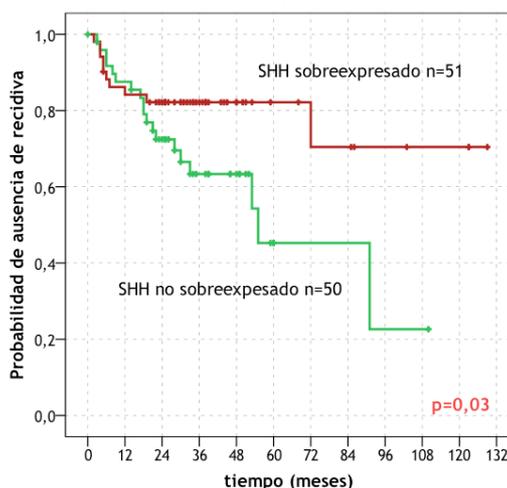
El análisis del tiempo hasta la recidiva y la supervivencia en función de la expresión tumoral de FGFR2b, evidenció que los pacientes con sobreexpresión tumoral presentan la mejor evolución ($p < 0,05$). Las curvas de los pacientes sin diferencias en la expresión o con infraexpresión son similares y tienen peor evolución.

Figuras 46-47.

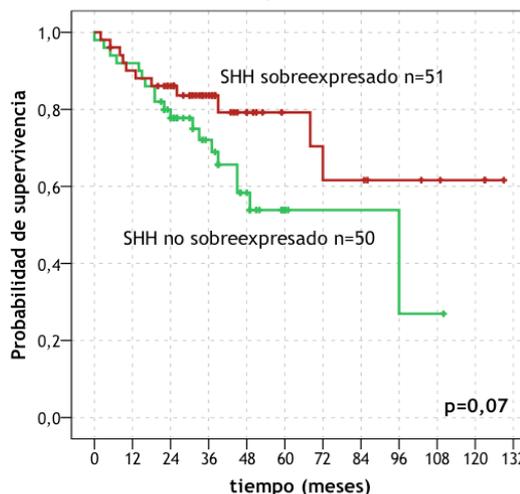
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de FGFR2b.

SHH

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHH



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHH



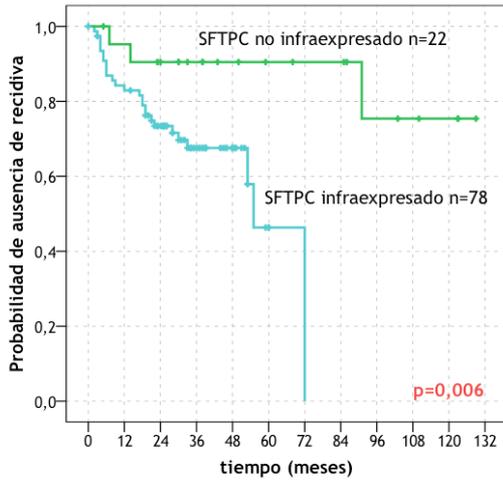
Los pacientes con sobreexpresión tumoral de SHH presentaban la mejor evolución, mientras que los pacientes con infraexpresión presentaban un menor tiempo libre hasta la recidiva ($p = 0,03$). Al analizar la supervivencia, las diferencias se reducen, aunque sigue existiendo una tendencia a mayor supervivencia en los sobreexpresados.

Figuras 48-49.

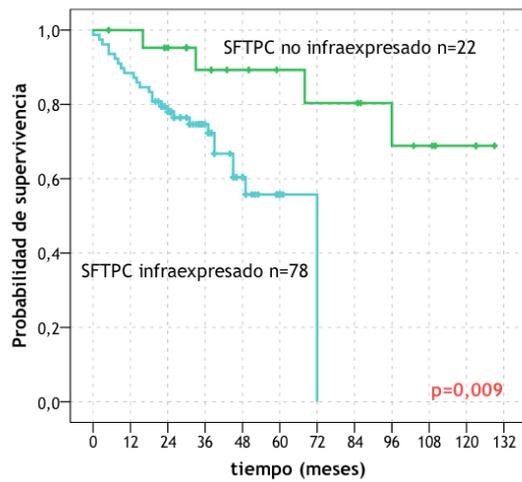
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de SHH.

SFTPC

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE SFTPC



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE SFTPC

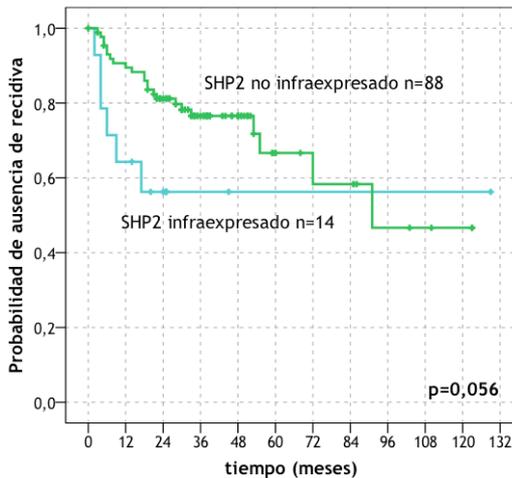


Figuras 50-51.
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de SFTPC.

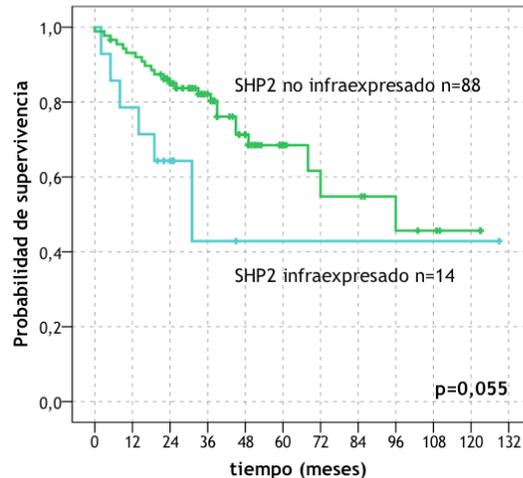
Los pacientes con baja expresión de SFTPC presentan la peor evolución ($p < 0,05$); esto ya fue significativo cuando se separaban los pacientes en tres estratos de expresión, pero se hace especialmente significativo al comparar infraexpresados versus no infraexpresados.

SHP2

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHP2



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHP2



Figuras 52-53.
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de SHP2.

A pesar de que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar los tres estratos de expresión, el TLE y OS de los pacientes infraexpresados fue el menor de los tres grupos. Al comparar infraexpresados con no infraexpresados, este menor TLE y OS de los infraexpresados tendía a la significación estadística (TLE $p = 0,056$; OS $p = 0,055$).

CEACAM5, FRS2, MYCN y SOX17

Los pacientes con sobreexpresión tumoral de CEACAM5 y FRS2 presentaban mayor tiempo libre de enfermedad ($p > 0,05$). No hubo diferencias remarcables en el tiempo hasta la recidiva según la expresión de MYCN, aunque parece que los sobreexpresados presentaban una discreta mejor evolución. La sobreexpresión tumoral de CEACAM5, además, se asociaba a mejor supervivencia, mientras que no había diferencias en la supervivencia según la expresión de FRS2 ni de MYCN. El análisis en función de la expresión de SOX17 puso de manifiesto resultados dispares entre los dos genes de referencia, por lo que no se muestra en los resultados.

Combinación de marcadores Firma genética embrionaria tumoral

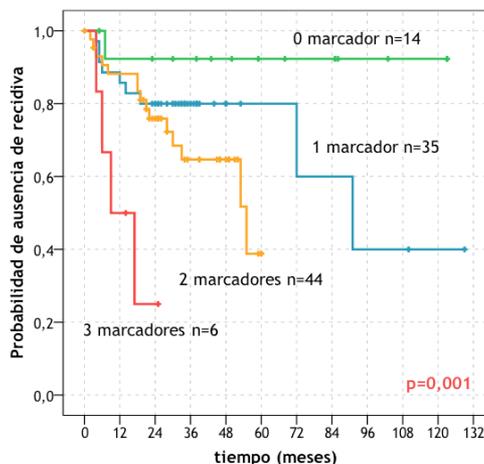
Se analizaron entre sí -mediante regresión de Cox- los marcadores con diferencias relevantes en tiempo libre de enfermedad y supervivencia (FGFR2b, SFTPC, SHH y SHP2). El marcador más potente y que mantenía su efecto a pesar de la combinación con el resto era SFTPC. SHP2 seguía manteniendo una tendencia a la significación estadística, SHH mitigaba su efecto y FGFR2b perdía su efecto al analizarlo conjuntamente. No obstante, cada uno de ellos aportaba información relevante por separado.

Se generó una firma que agrupó los pacientes según el número creciente de marcadores con signo adverso, ya estuvieran infraexpresados o no sobreexpresados. Dado que en la literatura la evolución de los pacientes según la expresión de FGFR2b es motivo de controversia, no se consideró en la firma para evitar distorsionar los resultados. La suma progresiva de estos 3 marcadores infraexpresados o no sobreexpresados se asoció a un progresivo menor tiempo libre de enfermedad y supervivencia.

Figuras 54-55.

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según el número de marcadores de la firma SFTPC-SHH-SHP2 con signo adverso; 99 fueron los pacientes con la determinación molecular de los 3 marcadores.

TLLE SEGÚN EL NÚMERO DE MARCADORES CON SIGNO ADVERSO



OS SEGÚN EL NÚMERO DE MARCADORES CON SIGNO ADVERSO

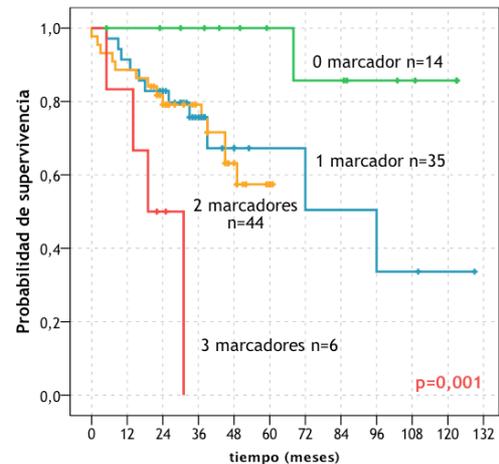


Tabla 39. Características de las posibles agrupaciones del número de marcadores con signo adverso de la firma SFTPC-SHH-SHP2. El *gold* estándar fue la recidiva (primer valor de cada ítem) y la supervivencia (segundo valor).

Número de marcadores con signo adverso SFTPC-SHH-SHP2	Sensibilidad	Especificidad	FN	VPN	VPP
0 vs 1-3	97-81%	19-3%	3-19%	93-7%	33-66%
0-1 vs 2-3	66-46%	56-40%	36-54%	80-25%	38-64%
0-1 (SHH ó SHP2) vs 1 (SFTPC)-3	90-74%	27-13%	10-26%	86-18%	34-66%

Los resultados entre las dos primeras agrupaciones no eran muy satisfactorios y dado que el SFTPC se había evidenciado como el marcador más determinante, se dividieron los pacientes con un solo marcador según presentaran infraexpresión o no de SFTPC. Las curvas Kaplan Meier se presentan a continuación.

TLE SEGÚN EL NÚMERO DE MARCADORES CON SIGNO ADVERSO OS SEGÚN EL NÚMERO DE MARCADORES CON SIGNO ADVERSO

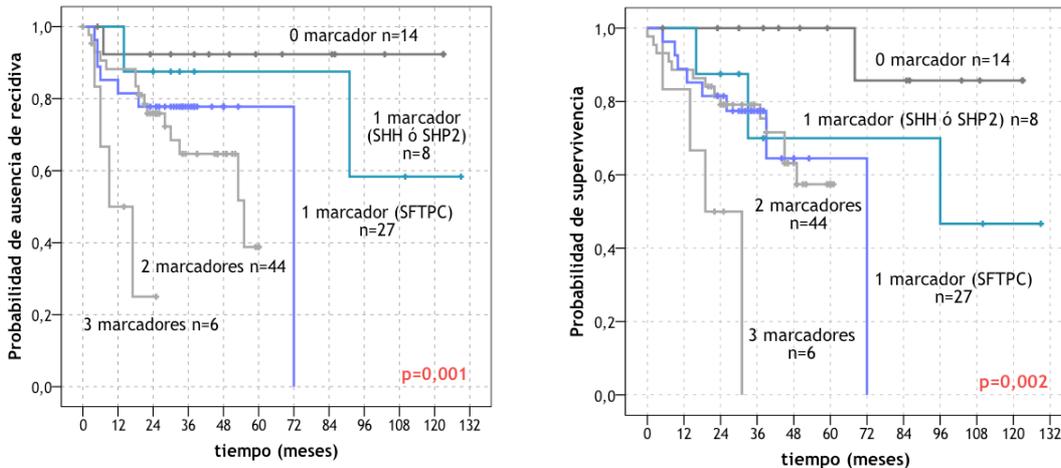


Figura 56-57. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según el número de marcadores de la firma SFTPC-SHH-SHP2 con signo adverso, teniendo en cuenta si un solo marcador negativo es SFTPC o no; 99 fueron los pacientes con la determinación molecular de los 3 marcadores.

Al dicotomizar los resultados [0-1 (SHH ó SHP2) vs 1 (SFTPC)-3] se evidenció que la curva de los pacientes con mala evolución era muy similar a la curva de la infraexpresión de SFTPC. Esto nos indica que probablemente los efectos son superponibles y que la firma no nos aporta mayor información.

A medida que aumentaba el estadio patológico, aumentaba el número de pacientes con más marcadores adversos; eso significa que la firma genética podría tener un efecto superponible al del pTNM.

Estadio patológico	Firma SFTPC-SHH-SHP2				
	0 Marcador	1 Marcador		2 Marcadores	3 Marcadores
		SHH ó SHP2	SFTPC		
I	10 (71%)	4 (50%)	16 (59%)	23 (52%)	1 (17%)
II	4 (29%)	3 (37%)	8 (30%)	15 (34%)	3 (50%)
III	0 (0%)	1 (13%)	3 (11%)	6 (14%)	2 (33%)

Tabla 40. Distribución de los pacientes según el número de marcadores infraexpresados o no sobreexpresados, estratificados por el estadio patológico.

Análisis multivariante

Se realizaron dos modelos, uno incluyendo el factor pronóstico más importante hasta el momento (el estadio patológico) y los marcadores moleculares aislados y otro incluyendo el estadio patológico y la firma. En ninguno de los dos modelos, se incluyó el pT y pN porque los integra el estadio patológico ni tampoco la invasión linfática intratumoral porque presentaba interacción con el estadio patológico. No se incluyó la invasión perineural dado que uno de los grupos presentaba sólo 5 casos. En el análisis del tiempo libre de enfermedad, tampoco se incluyó el tipo de recidiva porque el análisis se hubiera circunscrito a sólo 29 pacientes. En el análisis de la supervivencia, no se incluyó el número de ganglios resecaados porque interaccionaba con el estadio patológico ni tampoco el tipo de resección y la localización porque no aportaban información relevante.

Las diferencias del tiempo libre de enfermedad y supervivencia entre los pacientes con FGFR2b sobreexpresado y no sobreexpresado eran significativas, pero no se incluyó en el multivariante porque enmascaraba el efecto de SFTPC, el marcador que aportaba más información en todos los análisis.

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD (n ¹ =98)						
Variable		Error típico	p valor	Hazard ratio	Intervalo de confianza 95%	
Edad		0,02	0,22	0,97	0,92	1,02
Sexo		0,59	0,48	0,66	0,21	2,2
Estadio patológico ²	I	0,6	0,25	0,5	0,15	1,64
	II	0,59	0,53	1,44	0,46	4,55
SFTPC infraexpresado		0,88	0,02	7,33	1,31	40,93
SHH sobreexpresado		0,44	0,16	0,54	0,23	1,27
SHP2 infraexpresado		0,48	0,13	2,09	0,81	5,4

Tabla 41. Análisis multivariante de factores asociados a la recidiva en la serie tumoral, incluyendo los marcadores por separado (n=98; 3 casos perdidos por imposibilidad técnica de la determinación de algún marcador de la firma y 1 caso censurado antes del evento más temprano del estrato). Prueba ómnibus: p=0,004. -2 log de la verosimilitud inicial: 238,44, final: 215,05. 1, n: número de pacientes; 2: referencia, estadio III-IV.

SUPERVIVENCIA (n ¹ =99)						
Variable	Error típico	p valor	Hazard ratio	Intervalo de confianza 95%		
Edad	0,03	0,63	1,01	0,96	1,06	
Sexo	0,59	0,38	0,59	0,18	1,9	
Estadio patológico ²	I	0,54	0,03	0,31	0,11	0,89
	II	0,51	0,71	1,21	0,45	3,27
SFTPC infraexpresado	0,79	0,04	4,92	1,04	23,21	
SHH sobreexpresado	0,46	0,21	0,56	0,23	1,38	
SHP2 infraexpresado	0,49	0,28	1,7	0,65	4,45	

Tabla 42. Análisis multivariante de factores asociados a la supervivencia en la serie tumoral, incluyendo los marcadores por separado (n=99; 3 casos perdidos por imposibilidad técnica de la determinación de algún marcador de la firma). Prueba ómnibus: p=0,002. -2 log de la verosimilitud inicial: 242,16, final: 217,81. 1, n: número de pacientes; 2: referencia, estadio III-IV.

Los modelos multivariantes ponen de manifiesto que el SFTPC es un factor pronóstico independiente para la recidiva y la mortalidad. Los pacientes con SFTPC infraexpresado a nivel tumoral presenta un riesgo de recidiva 7 veces superior y un riesgo de mortalidad casi 5 veces superior. Como era de esperar, los pacientes con estadio I presentaban mejor supervivencia.

Respecto la firma, la presencia de SFTPC infraexpresado, sólo o en combinación con la no sobreexpresión de SHH y la infraexpresión de SHP2, se asocia a un riesgo de recidiva 8 veces superior y un riesgo de mortalidad casi 6 veces superior (Anexo 14). Se compararon los modelos y se seguía evidenciando que la firma no aportaba más información que el SFTPC aislado.

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según la expresión tumoral de los marcadores según histología

En el Anexo 12 se detalla el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia en los adenocarcinomas y en los carcinomas escamosos, según la expresión tumoral de los marcadores.

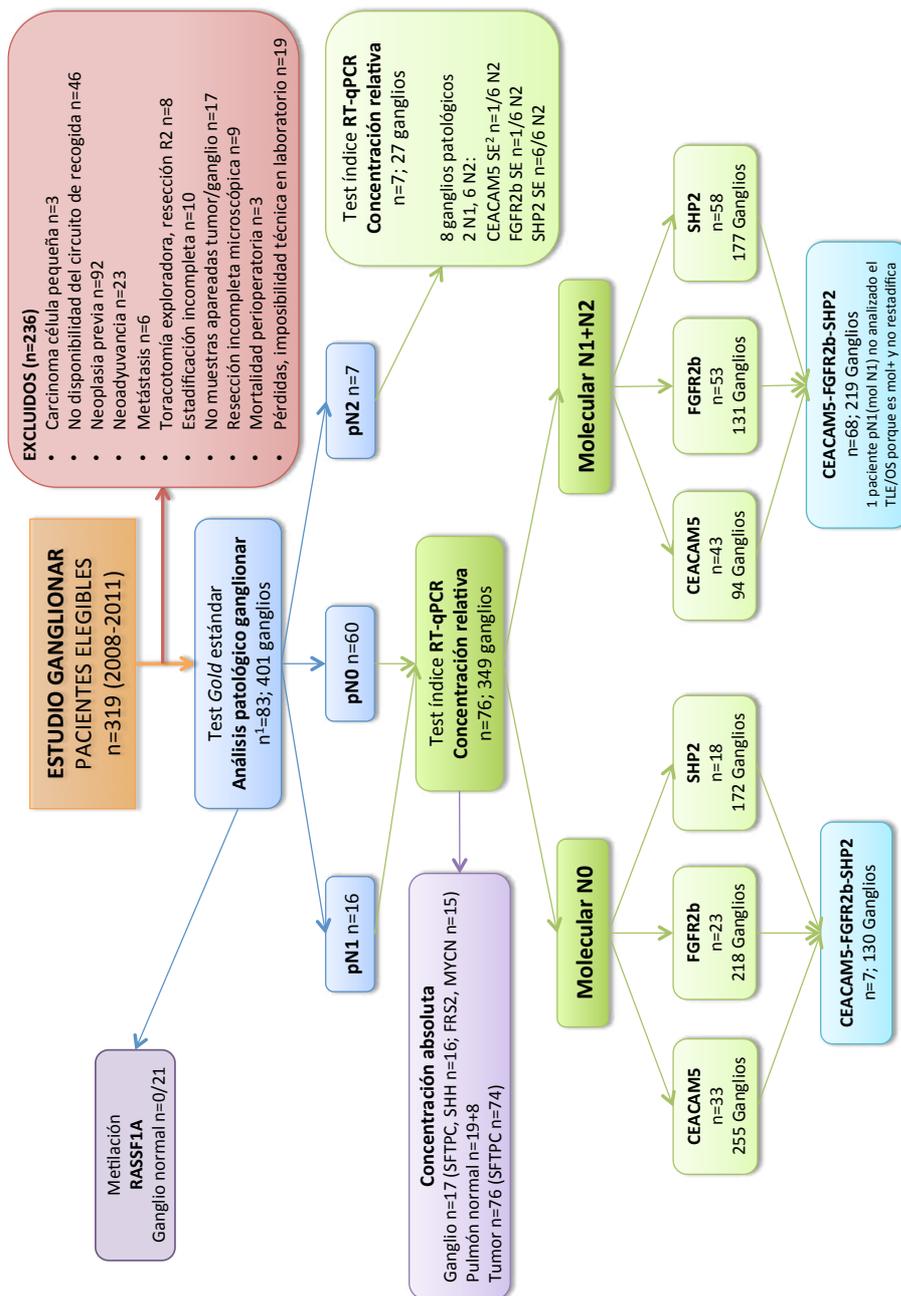
Marcador	Factores asociados a expresión de forma independiente			TLE ³ 5 a ⁴			Riesgo de recidiva			OS ⁵ 5 a			Riesgo de mortalidad HR (IC 95%)	Pronóstico	Utilidad potencial
	SE ¹	IE ²	Invasión vascular intratumoral	IE	ND ⁵	SE	HR ⁶ (IC ⁷ 95%)	IE	ND	SE	HR (IC 95%)				
CEACAM5	No	Invasión vascular intratumoral	22%	-	76%	Univariante p>0,05	60%	0%	74%	Univariante p>0,05	No	No	No		
FGFR2b	No	Invasión intratumoral (vascular) Recidiva	48%	57%	89%	No determinado (distorsión)	63%	43%	96%	No determinado (distorsión)	No	No	No		
FRS2	Tamaño tumoral >3 cm.	No	49%	48%	81%	Univariante p>0,05	64%	61%	71%	Univariante p>0,05	A explorar CE ¹⁰	No	No		
MYCN	No	No	69%	33%	72%	Univariante p>0,05	71%	50%	72%	Univariante p>0,05	A explorar ADK	A explorar ADK	No		
SFTPC	No	Recidiva (p<0,1)	46%	100%	83%	IE: 7.33 (1.31-40.93)	56%	88%	92%	IE: 4.92 (1.04-23.21)	Sí	Sí	Sí		
SHH	No	pN1-2 Recidiva	57%	61%	71%	SE: 0.54 (0.23-1.27)	53%	55%	79%	SE: 0.56 (0.23-1.38)	Sí, sobretodo CE	Sí, sobretodo CE	No		
SHP2	Carcinoma escamoso	No	56%	52%	75%	IE: 2.09 (0.81-5.4)	43%	65%	71%	IE: 1.7 (0.65-4.45)	Sí, sobretodo ADK	Sí, sobretodo ADK	A explorar ADK		
SOX17	No	No	67%	47%	75%	Univariante p>0,05	65%	64%	69%	Univariante p>0,05	No	No	No		

Tabla 43. Resumen de los resultados de la expresión tumoral de los 8 marcadores embrionarios. 1, SE: sobreexpresión; 2, IE: infraexpresión; 3, TLE: tiempo libre de enfermedad; 4, a: años; 5, SD: sin diferencias en la expresión; 6, HR: *hazard ratio*; 7, IC: intervalo de confianza; 8, OS: supervivencia global; 9, ADK: adenocarcinoma; 10, CE: carcinoma escamoso.

Restadificación molecular ganglionar

Diagrama de flujo

Figura 58. Diagrama de flujo del estudio ganglionar. 1, n: número de pacientes; 2, SE: sobreexpresión.



El tercer objetivo de esta tesis fue valorar si la expresión anómala de marcadores embrionarios en muestras ganglionares torácicas nos permitía identificar la presencia de células neoplásicas en ganglios. Si esto fuera así, el análisis molecular de los ganglios permitiría una restadificación molecular con una correlación con un menor tiempo libre de enfermedad y supervivencia de los pacientes.

Expresión ganglionar basal

Para poder decir que una determinada expresión molecular en un ganglio es anómala, primero hay que conocer la expresión del marcador en los ganglios de pacientes sin neoplasia. De esta manera, dispondremos de los niveles normales de expresión en ganglios, que nos permitirán clasificarlos adecuadamente.

También habrá que conocer la expresión de los marcadores en el pulmón normal y en el tumor, ya que sólo serán útiles para restadificar aquellos marcadores cuyos niveles de expresión en el tumor o en el pulmón normal sean superiores a los de los ganglios normales. En ambos casos, una expresión elevada en los ganglios a restadificar nos demostrará la presencia de células de origen pulmonar en el ganglio.

Por tanto, el primer paso será analizar la literatura y nuestros resultados y comparar los valores basales de expresión en los ganglios de pacientes sin neoplasia con los niveles de expresión del pulmón normal y el tumor.

Resultados de las bases de datos de la literatura

Se revisaron los resultados existentes en las bases de datos disponibles, SAGE Genie y GEO. Se comparó la expresión de marcadores en ganglios de pacientes sin neoplasia, en el pulmón normal y en el tumor pulmonar (tabla 44). La expresión de CEACAM5 y SFTPC es superior en el tumor y en el pulmón normal respecto al ganglio. La expresión de FGFR2b y SHP2 es algo superior en el tumor respecto al ganglio, pero las diferencias son escasas. SHH y SOX17 presentan expresión muy baja en los tres tejidos, mientras que FRS2 y MYCN se expresan más en el ganglio que en el pulmón sano o neoplásico.

EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES EMBRIONARIOS						
Marcador	BBDD ¹ SAGE (NCI) (tags por 200.000)			BBDD GEO (NCBI)	Relación P-T/G ²	Utilidad
	Ganglio normal	Pulmón normal	Tumor	Tumor vs Ganglio		
CEACAM5	10	13	11-39	↑	↑	SI
FGFR2b	2	2	5-6		=/↑	¿?
FRS2	2	0	0		=	NO
MYCN	2	0	0		=	NO
SFTPC	14	775	22-184		↑	SI
SHH	0	0	0		=	NO
SHP2	4	2	0-6	↑	=/↑	¿?
SOX17	0	0	0		=	NO

Tabla 44. Resultados de las bases de datos públicas del patrón de expresión en ganglio, en pulmón normal y en tumor de los marcadores moleculares embrionarios. Se expone en rojo las series con expresión tumoral o del pulmón normal superior al ganglio normal. Bases de datos: SAGE y GEO. 1: BBDD: base de datos; 2: P, pulmón; T, tumor; G, ganglio.

A la luz de los datos disponibles en las bases de datos exploradas, los marcadores potencialmente útiles para la restadificación ganglionar serían CEACAM5, SFTPC, FGFR2b y SHP2.

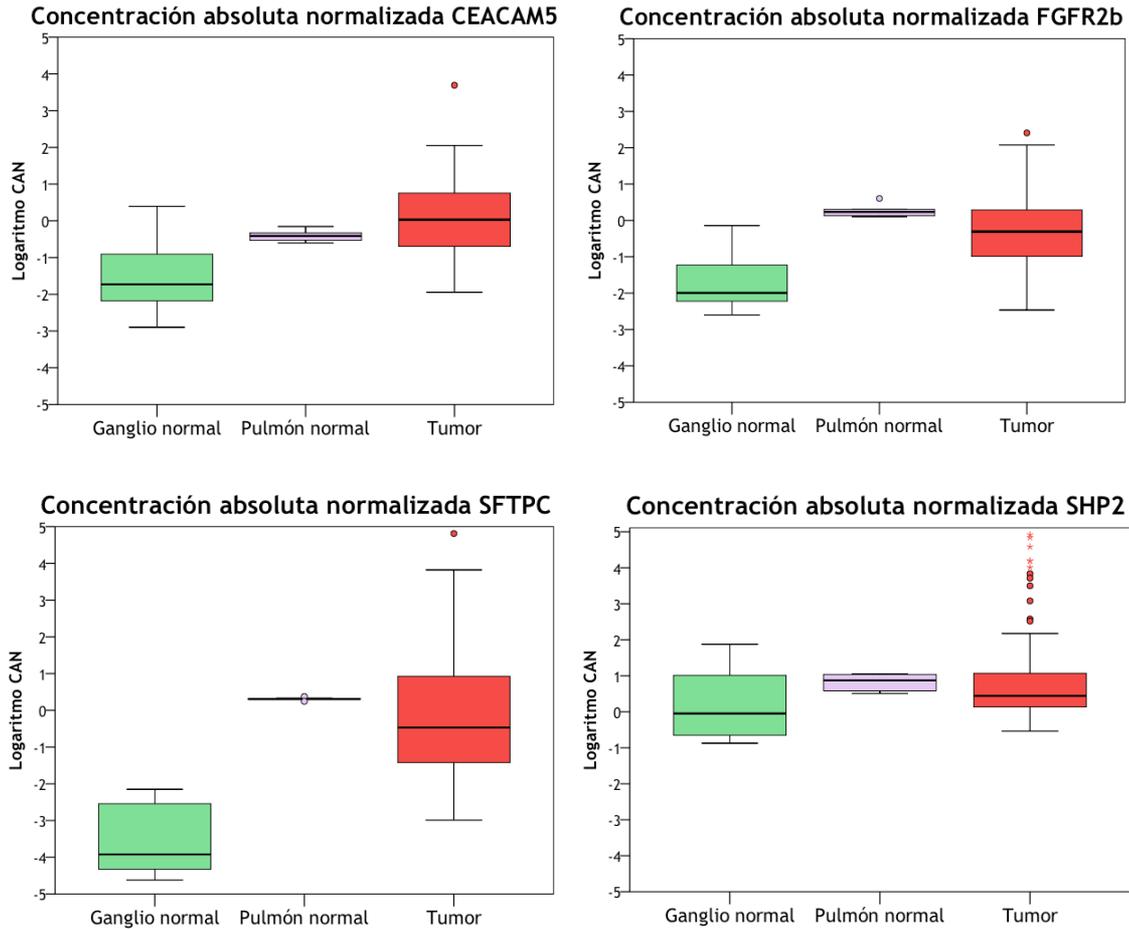
Expresión ganglionar respecto el pulmón normal y el tumor

En esta tesis se evaluó un conjunto de 25 ganglios aislados de pacientes sometidos a intervención quirúrgica por patología no neoplásica. Este grupo control estaba formado 17 pacientes, 13 hombres (76,5%) y 4 mujeres (23,5%). La edad media fue de 55 ± 18 años, rango 27-79 años. En 11 casos (64,7%) los pacientes no presentaban patología inflamatoria mientras que 6 (35,3%) presentaban una enfermedad inflamatoria torácica o signos inflamatorios ganglionares. Las estaciones ganglionares más frecuentes fueron la subcarinal (7 casos; 41,2%) y la paratraqueal derecha baja (6 casos; 35,3%). Los tipos de resección más frecuentes, *ex aequo*, fueron la lobectomía y la segmentectomía (6 casos, respectivamente, 35,3%).

Los marcadores que se validaron como potencialmente útiles fueron CEACAM5, FGFR2b, SFTPC y SHP2, dado que presentaban mayor expresión tumoral y en el pulmón normal que en el ganglio normal. Desafortunadamente, se tuvo que desestimar SFTPC dado que la expresión ganglionar era tan baja que en muchas muestras había dificultades técnicas para obtener una amplificación correcta mediante RT-qPCR, lo que dificultaría la interpretación de los resultados. Por otra parte, FRS2, SHH y SOX17 presentaban similares concentraciones en el tumor y el ganglio normal y alta concentración en el pulmón normal, lo que los hacía menos interesantes. MYCN, por su parte, presentaba una mayor concentración en el ganglio respecto el tumor o el pulmón normal (Anexo 16).

Marcador	EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES EMBRIONARIOS (concentración absoluta normalizada)										Utilidad
	Ganglio normal (n=25)		Pulmón normal (n=27)		Tumor (n=102)		P				
	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)					
CEACAM5	0,02	0,13	0,41	0,19	1,08	5,56	<0,05				SI
FGFR2b	0,01	0,061	1,83	0,65	0,5	1,85	<0,05				SI
FRS2	0,21	0,42	0,57	0,36	0,13	0,54	0,04				NO
MYCN	0,82	2,03	0,022	0,01	0,06	1,88	0,01				NO
SFTPC	1,38·10⁻⁴	0,003	2,03	0,12	0,34	8,76	0,01				SI
SHH	2,31·10⁻⁶	1,53·10 ⁻⁴	0,38	0,2	1,08·10⁻⁶	2,88·10 ⁻⁵	0,003				NO
SHP2	0,89	12,7	7,77	7,25	2,76	10,65	0,01				SI
SOX17	0,044	0,055	8,13	3,58	0,047	0,33	<0,05				NO

Tabla 45. Expresión tumoral, en pulmón normal y en ganglio normal de los marcadores moleculares embrionarios, medida como concentración absoluta normalizada. 1, n: número de muestras. Los 76 pacientes pN0 y pN1 que se restadificarán aportan las 102 muestras tumorales, por tanto, podemos apreciar el patrón de expresión tumoral de los pacientes a restadificar. Los resultados de expresión en el pulmón normal provienen de 10 réplicas de un *pool* de muestras. Las muestras tumorales de SFTPC fueron 100 (74 pacientes) y las muestras ganglionares normales fueron 22 (16 pacientes). Las muestras ganglionares de FRS2 y MYCN fueron 23 (15 pacientes) y las de SHH fueron 22 (16 pacientes).



Figuras 59-62.
Expresión de CEACAM5,
FGFR2b, SFTPC y SHP2
en los ganglios de
pacientes sin neoplasia,
comparada con el
pulmón normal y el
tumor.

Restadificación molecular ganglionar

Primero se optó por definir un ganglio como positivo usando la concentración relativa obtenida mediante el método $\Delta\Delta C_T$, dado que está ampliamente aceptado en la comunidad científica para evaluar la expresión. Se definió un ganglio como positivo cuando presentara sobreexpresión molecular, es decir, aquellos que tenían un *fold change* >2 teniendo como referencia la media de los C_T de los ganglios de pacientes sin neoplasia (CEACAM5: 31,26 ciclos, FGFR2b: 31,94 y SHP2: 25,35 ciclos). El paciente que presentara uno o más ganglios con sobreexpresión molecular para cualquiera de los 3 marcadores (CEACAM5, FGFR2b y SHP2), se clasificaría como molecular N1 ó N2 según la localización anatómica de/los ganglio/s con sobreexpresión. También se exploró la restadificación con cada marcador por separado. Los datos de expresión de los pacientes del estudio se exponen en el Anexo 15.

Se analizaron también los 349 ganglios para la expresión SOX17, pero como la expresión tumoral y ganglionar normal eran similares, no era un marcador útil para la restadificación.

Descriptivo

Variable		n ¹	% ²	Variable		n	%	
Sexo	Hombre	62	82%	pN	pN0	60	79%	
	Mujer	14	28%		pN1	16	21%	
Edad	66,5 ± 7,3 años	76	100%	pM	pM0	76	100%	
Tabaquismo	50 (22) p/a ³	76	100%	Estadio patológico	IA	27	36%	
Comorbilidad	Respiratoria	40	53%		IB	20	26%	
	Cardíaca	16	21%		IIA	19	25%	
	Vascular	12	16%		IIB	7	9%	
	Hepática	12	16%		IIIA	3	4%	
	Insuficiencia renal	4	5%	Tamaño tumoral	33,8 ± 20 mm	76	100%	
cT	cT1a	17	22%	Invasión intratumoral	Vascular	14	18%	
	cT1b	14	19%		Linfática	16	21%	
	cT2a	28	37%		Perineural	5	7%	
	cT2b	4	5%		Total	25	33%	
		cT3	12	16%	Histología	CE ⁴	38	50%
		cT4	1	1%		ADK ⁵	31	41%
cN	cN0	72	95%	CCG ⁶ /CNCG ⁷		5	6%	
	cN1	4	5%	Otros	2	3%		
cM	cM0	76	100%	Cirugía realizada	Segmentectomía	5	7%	
Estadio clínico	IA	31	41%		Lobectomía	58	76%	
	IB	26	34%		Neumonectomía	13	17%	
	IIA	6	8%	Adyuvancia	QT ⁸	14	18%	
	IIB	10	13%		RT ⁹	1	1%	
	IIIA	3	4%		QT y RT	0	0%	
pT	pT1a	19	25%	Ganglios resecaados	12 ± 4,1	76	100%	
	pT1b	15	20%	Recidiva	Local	11	14%	
	pT2a	25	33%		Distancia	7	9%	
	pT2b	6	8%		Local y distancia	2	3%	
	pT3	11	14%		Total	20	26%	

Tabla 46. Características clínicas de los pacientes a restadificar (n=76). 1, n: número de pacientes; 2, %: porcentaje; 3, p/a: paquetes/año; 4, CE: carcinoma escamoso; 5, ADK: adenocarcinoma; 6, CCG: carcinoma de célula grande; 7, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande; 8, QT: quimioterapia; 9, RT: radioterapia.

Marcador	Ganglios (n=349) positivos						FC Mediana y Q3-Q1	Estación más frecuente		Casos positivos	
	Molecular N1		Molecular N2		Total			Nº ²	n, %	n	%
	n ¹	%	n	%	n	%					
CEACAM5	39	11%	55	16%	94	27%	0,31 (2,85)	4R	15 (16%)	43	57%
FGFR2b	46	13%	85	25%	131	38%	1,4 (2,87)	7	25 (19%)	56	74%
SHP2	63	18%	114	33%	177	51%	2,05 (5,14)	7	34 (19%)	58	76%
COMBINACIÓN	74	21%	145	42%	219	63%	-	7	42 (19%)	68	89%

Tabla 47. Descriptivo del análisis de los ganglios para cada marcador y para la combinación de los 3 marcadores. La n total es de 349 ganglios. 1, n: número de ganglios; 2, N: número de estación.

Usando la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, un total de 219 ganglios de los 349 analizados (63%) fueron molecular positivo, 145 a nivel N2 (42%) y 74 (21%) a nivel N1. De los 66 ganglios analizados de pacientes pN1, sólo uno presentaba afectación neoplásica histológica (1,5%) y también presentaba afectación molecular para los tres marcadores. La estación ganglionar más afectada a nivel molecular fue la subcarinal.

Pacientes restadificados

En un primer análisis, evaluamos los datos de sobreexpresión ganglionar sin tener en cuenta si el tumor primario apareado tenía el marcador sobreexpresado o como mínimo con la misma expresión que el pulmón normal (*fold change* ≥ 1). Tras la restadificación de toda la serie, la distribución de los pacientes fue la siguiente.

Tabla 48. Número de pacientes pN0 en cada grupo anatómico-molecular tras la restadificación molecular con cada uno de los marcadores por separado y con la combinación de los 3. 1, n: número de pacientes.

ESTADIO MOLECULAR Pacientes pN0	MARCADOR							
	CEACAM5		FGFR2b		SHP2		COMBINACIÓN	
	n ¹	%	n	%	n	%	n	%
Molecular N0	22	37%	16	27%	17	28%	7	12%
Molecular N1	9	15%	6	10%	7	12%	5	8%
Molecular N2	29	48%	38	63%	36	60%	48	80%
Total	60	100%	60	100%	60	100%	60	100%

Tabla 49. Número de pacientes pN1 en cada grupo anatómico-molecular tras la restadificación molecular con cada uno de los marcadores por separado y con la combinación de los 3. 1, n: número de pacientes.

ESTADIO MOLECULAR Pacientes pN1	MARCADOR							
	CEACAM5		FGFR2b		SHP2		COMBINACIÓN	
	n ¹	%	n	%	n	%	n	%
Molecular N0 (no informativos)	9	56%	4	25%	0	0%	0	0%
Molecular N1	2	13%	3	19%	1	6%	1	6%
Molecular N2	5	31%	9	56%	15	94%	15	94%
Total	16	100%	16	100%	16	100%	16	100%

Dado que el número de pacientes molecular N1 era escaso, se colapsaron con los molecular N2 para establecer dos grupos diferenciados, molecular positivo (n=69) y molecular negativo (n=7). Mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, de los 60 pacientes pN0, 53 (88%) fueron reclasificados como molecular positivo y de los 16 pacientes pN1, 15 (94%) fueron reclasificados como molecular N2.

Dado que sólo había un paciente en el grupo pN1 molecular N1, se agruparon los pacientes pN0 y pN1. Se evaluó la evolución de los pacientes según las dos nuevas categorías, molecular negativo y molecular positivo. Se referenciaron a las curvas Kaplan Meier de la estadificación patológica.

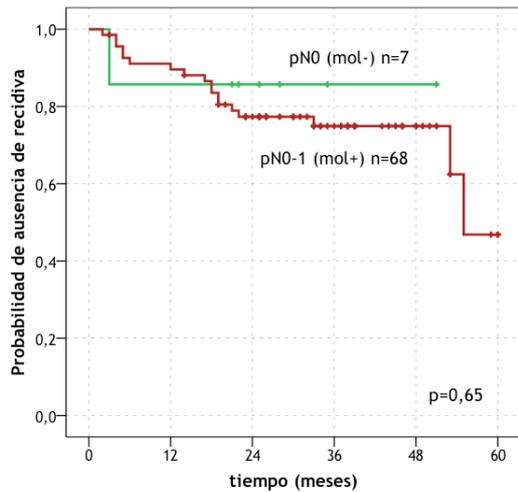
Tras la restadificación molecular ganglionar, los pacientes molecular positivo presentaban una discreta y no significativa peor evolución que los pacientes molecular negativo. Los pacientes molecular negativo presentaban una discreta mejor evolución que los pacientes pN0, mientras que los pacientes molecular positivo presentaban una evolución más similar a los pacientes pN1. La restadificación de cada marcador por separado no mostró mejores resultados (Anexo 16), así como tampoco la restadificación en los subgrupos pN0 y pN1.

Con posterioridad y en vista de estos resultados no del todo satisfactorios, se procedió a considerar como informativos sólo los casos con los marcadores sobreexpresados a nivel tumoral (n=59: pN0 n=47, pN1 n=13). Sólo en los pacientes que mostraban sobreexpresión tumoral tendríamos suficiente sensibilidad para localizar enfermedad ganglionar en caso que el número de células fuera escaso. Mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, de los 47 pacientes pN0, 38 (81%) fueron reclasificados como molecular positivo y de los 13 pacientes pN1, 12 (92%) fueron reclasificados como molecular N2; el paciente restante fue no informativo (pN1 molecular N0). Sin embargo, esta restadificación molecular no tuvo ninguna correlación clínica.

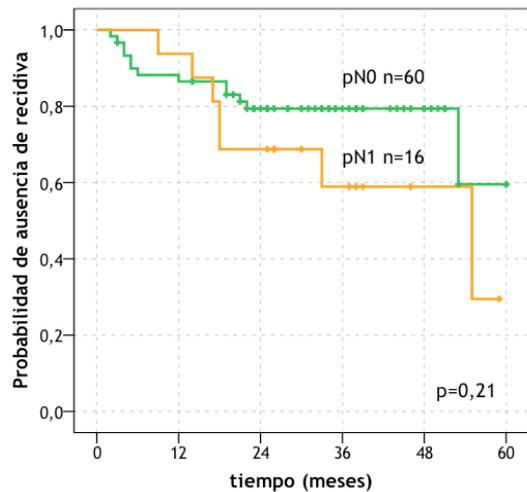
Consideraciones del tiempo libre de enfermedad y supervivencia

La media del TLE de la serie ganglionar restadificada fue de $47 \pm 2,5$ meses, con un TLE a 1 año de 87%, a 3 años del 75% y 5 años del 47%. La media global de supervivencia fue de $48,2 \pm 2,4$ meses, con una supervivencia al año de 92%, a los 3 años del 77% y a los 5 años de 64%. La distribución según estadios nos muestra que los resultados de los estadios I-II eran comparables a los publicados en la literatura y a la serie global de carcinoma broncogénico del Servicio de Cirugía Torácica del HUB. El estadio IIIA presentaba 3 pacientes, insuficientes para hacer afirmaciones.

TLE TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (COMBINADO)

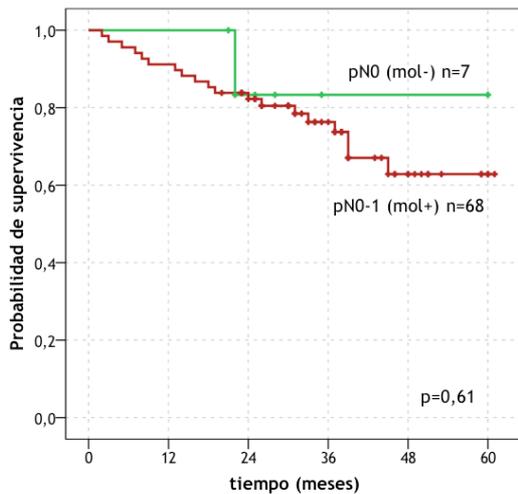


TLE SEGÚN AFECTACIÓN PATOLÓGICA GANGLIONAR

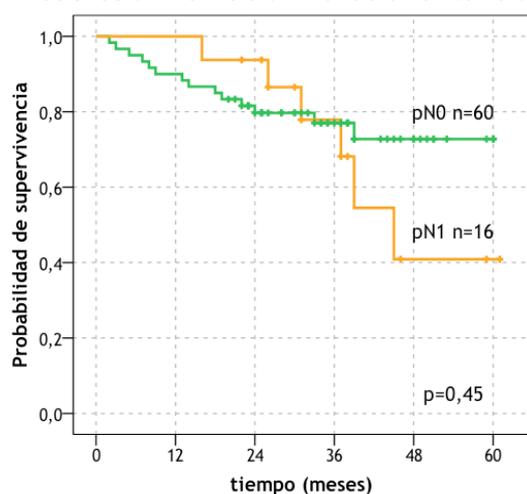


Figuras 63-64. Tiempo libre de enfermedad de los pacientes (n=75) tras la restadificación molecular ganglionar mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, referenciado a la clasificación patológica ganglionar de la serie. El paciente pN1 molecular N1 no se incluyó porque era molecular positivo pero no implicaba restadificación del paciente; esta exclusión no modificó las curvas del tiempo libre de enfermedad ni de la supervivencia.

OS TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (COMBINADO)



OS SEGÚN AFECTACIÓN PATOLÓGICA GANGLIONAR



Figuras 65-66. Supervivencia global de los pacientes (n=75) tras la restadificación molecular ganglionar mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, referenciado a la clasificación patológica ganglionar de la serie.

Tabla 50. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=75) tras la restadificación molecular ganglionar mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, referenciado a la clasificación patológica ganglionar de la serie.

Variable	Estrato	n ¹	Media ²	SD ²	p	Estrato	Media ²	SD ²	p
TLE	Molecular N0	7	44,1	6,3	0,65	pN0	48,4	2,8	0,21
	Molecular N1-N2	68	46,9	2,6		pN1	41,6	5	
OS	Molecular N0	7	53,7	5,8	0,61	pN0	48,7	2,7	0,45
	Molecular N1-2	68	47,6	2,6		pN1	45,5	4,4	

Comparación de la expresión tumoral y ganglionar

Se analizó la expresión tumoral de los 76 casos y se comparó con la expresión global en los ganglios de cada marcador.

Expresión	CEACAM5				FGFR2b				SHP2				COMBINACIÓN			
	Tumor		Ganglio		Tumor		Ganglio		Tumor		Ganglio		Tumor		Ganglio	
	n ¹	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Sobreexpresión	49	64%	43	57%	12	16%	56	74%	40	53%	58	76%	63	83%	68	89%
Sobreexpresión coincidente tumor y ganglios	29/76 (38%)				9/76 (12%)				35/76 (46%)				61/76 (80%)			

Tabla 51. Número de pacientes con sobreexpresión en los tumores primarios y también a nivel de uno o más ganglios. 1, n: número de pacientes.

Análisis de los pacientes pN2

Se analizaron 7 pacientes IIIA N2 y un global de 27 ganglios, 6 histológicamente afectados a nivel mediastínico. CEACAM5 y FGFR2b sólo presentaron un ganglio afecto molecularmente de los 6 afectados histológicamente, mientras que todos los ganglios con neoplasia a nivel N2 presentaban afectación molecular por SHP2.

Los dos ganglios hiliares positivos histológicamente fueron también positivos molecularmente para CEACAM5 y SHP2. De los restantes 19 ganglios sin enfermedad, presentaron sobreexpresión de CEACAM5 1 ganglio (N2) de 1 paciente, de FGFR2b 14 ganglios (11 N2 y 1 N1) de 6 pacientes y de SHP2 18 ganglios (13 N2 y 5 N1) de 5 pacientes.

Status molecular	MARCADOR					
	CEACAM5		FGFR2b		SHP2	
	n ¹	%	n	%	n	%
Ganglios pN2 sobreexpresados	1/6	17%	1/6	17%	6/6	100%
Pacientes pN2 sobreexpresados	2/5	20%	2/5	20%	5/5	100%

Tabla 52. Número de pacientes y de ganglios pN2 con afectación histológica y sobreexpresión molecular. 1, n: número de pacientes.

Restadificación mediante la concentración absoluta normalizada

En vista de los resultados no del todo satisfactorios, obtenidos utilizando la concentración relativa, se exploró utilizar la concentración absoluta.

Se realizaron las curvas ROC entre las muestras de ganglio de pacientes sin neoplasia y muestras tumorales, para buscar el *cutoff* diagnóstico. Esta apro-

ximación nos permitía saber si el ganglio presenta una expresión similar al tumor, pero no si esta expresión se acompaña de un cambio pronóstico, que es lo que realmente es clave en la restadificación. A pesar de esta importante consideración, se exploró la restadificación. Los pacientes molecular N1 y N2 presentaban mejor pronóstico que los pacientes molecular N0; por tanto, no se demostró útil para restadificar (ver Anexo 16).

Finalmente, se realizaron las curvas ROC entre la expresión de cada uno de los ganglios de los pacientes con neoplasia de pulmón (n=376) y el status de los pacientes, recidiva y supervivencia (ver Anexo 16), para buscar un punto diagnóstico que se acompañe de un cambio pronóstico de los pacientes. Ningún punto cumplió esta premisa y no se progresó a la restadificación molecular ganglionar.

Discusión

La presente tesis aborda tres temas diferentes, pero complementarios, sobre la estadificación del carcinoma pulmonar. En primer lugar, una estadificación clínica y una estadificación postoperatoria que se aproximen a la extensión real anatómica de la neoplasia permiten ofrecer a priori el tratamiento más beneficioso para cada paciente, además de establecer un pronóstico cercano a la realidad. Actualmente, la estadificación patológica, incluyendo la información obtenida en la cirugía, es el *gold standard* en la extensión anatómica de la neoplasia y uno de los principales factores pronóstico. Por tanto, es muy importante obtener una buena concordancia entre estadificación clínica y patológica, es decir, presentar un alto número de casos donde la estadificación clínica coincida con lo más cercano a la realidad que disponemos. Hemos visto que ambas clasificaciones no presentan una correlación elevada, pero esta discrepancia no es un obstáculo para que el tratamiento seleccionado esté bien indicado.

En segundo lugar, hemos explorado si la expresión de marcadores embrionarios nos puede ayudar a discriminar cuáles de los pacientes sometidos a resección radical tienen un mejor o un peor pronóstico. Es bien conocido que incluso los pacientes con el estadio patológico más precoz (estadio IA pT1aN0), resecados de forma completa cumpliendo los más rigurosos criterios de reseccabilidad, presentan una tasa de recidiva que puede llegar al 16% a los 3 años y que aumenta con el seguimiento, sobretodo en los primeros 60 meses(97). Esto implica que la sensibilidad de la estadificación patológica, con las técnicas actualmente implementadas en la asistencia, no es suficientemente elevada. La clasificación definitiva de la neoplasia, asignada a cada paciente, en muchas ocasiones no se sitúa cercana a la extensión real, y no sólo anatómica, de la neoplasia pulmonar. Los estudios de biología molecular han permitido dar un paso adelante en esta búsqueda de la extensión real de la neoplasia y además nos han aportado datos sobre el pronóstico del paciente y de respuesta a tratamientos. En la presente tesis hemos evidenciado que la infraexpresión de SFTPC en el tumor se asocia a un peor pronóstico y puede tener valor pronóstico independiente. Con este mismo objetivo hemos valorado la utilidad de la restadificación molecular de los ganglios extirpados en resecciones completas, sin resultados concluyentes.

Concordancia entre la estadificación clínica y la patológica

La primera fase de esta tesis fue realizar un estudio clínico para evaluar si como comité oncológico multidisciplinario, desde el punto de vista de los pacientes quirúrgicos, estábamos realizando adecuadamente el estudio de la extensión de la neoplasia previo a la cirugía. Se diseñó un estudio de evaluación de la calidad analizando la concordancia entre la estadificación clínica preoperatoria y la estadificación patológica.

Las características de los pacientes incluidos son similares en muchos aspectos a las reportadas por otros equipos de nuestro entorno, tomando como referencia los datos presentados por el Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (GCCB-S)(61). Nuestra población tiene una mayoría de hombres, con una edad media similar (62 versus 64 años del GCCB-S) y un consumo de tabaco actual o pasado similar (89% versus 87%). El estadio clínico IB es el más frecuente en ambas poblaciones; además, en nuestro estudio los adenocarcinomas están más representados(61). La diferencia entre tipos histológicos entre la serie española y la nuestra puede ser debido a un efecto temporal: en el mundo occidental y en Asia se están atendiendo más pacientes con adenocarcinoma y menos con carcinoma escamoso(6). En nuestra serie también destaca menos frecuencia de neumonectomías, como indicador de un progreso en la selección de los pacientes.

En nuestro estudio hemos evidenciado una concordancia moderada (58%) entre la estadificación clínica y la patológica, que corresponde a un índice kappa de 0,54 (IC 95% 0,44-0,63). La revisión de la literatura nos pone de manifiesto una menor concordancia global, con porcentajes del 22-47%(61-64) y un índice kappa bajo, de 0,25(61). Nuestro estudio incluye la PET y sobretodo la PET-TC en la mayor parte de la muestra y esto es debido a la implantación progresiva del PET-TC en el algoritmo de estadificación cuando se realizó esta fase del estudio (2005-2007). Los resultados muestran una tendencia a mejorar la concordancia en el grupo con PET/PET-TC, que no llega a ser estadísticamente significativa. En cambio, la mayoría de los estudios previos no la incluían, probablemente por una cuestión de implantación. Hay que destacar que el objetivo de este primer estudio era comparar la estadificación clínica versus la quirúrgico-patológica y no el realizar un análisis comparativo entre TC, PET y PET-TC.

La PET permite evaluar todas las estaciones ganglionares y la combinación con la TC permite una localización anatómica más exacta: combina los criterios morfológicos y metabólicos. Además, permite identificar localizaciones previamente no sospechosas, especialmente en lo que concierne a los grupos ganglionares y

metástasis. En un estudio piloto realizado por nuestro grupo sobre 68 pacientes estudiados con PET-TC, se obtuvo una alta especificidad (94%) y valor predictivo negativo (97%) en la estadificación mediastínica, sin encontrar asociación entre SUVmax y afectación mediastínica por PET-TC ni quirúrgicamente. No obstante, existen grupos que han relacionado el SUVmax como factor pronóstico en el carcinoma broncogénico; a mayor SUVmax, peor supervivencia(283). También se ha intentado determinar una cifra de SUVmax como punto de corte que determine mayor probabilidad de malignidad(284) sin que se haya llegado a conclusiones definitivas trasladadas a la asistencia diaria. De todo esto se desprende que uno de los factores que permite mejorar la estadificación clínica es incluir de forma rutinaria la PET-TC dentro de las pruebas clínicas a realizar a los pacientes potencialmente quirúrgicos(285). La PET-TC no sustituye otras pruebas, pero sirve de guía para técnicas que exploran y obtienen material histológico del mediastino y los hilios, como la mediastinoscopia, la ecobroncoscopia y la ecoendoscopia digestiva alta, aumentando el rendimiento de las mismas. El fin es complementar todas las técnicas para obtener una mejor estadificación clínica. Es probable que la PET-TC no haya cumplido con todas las expectativas que generó pero es también cierto que ha mejorado o ha dirigido la detección de las metástasis ganglionares y en otros órganos.

En cuanto a los resultados obtenidos por estadios, se evidenció que el estadio I y especialmente IA presentan de las mejores concordancias, con resultados similares a la literatura, entorno al 60% para el estadio I y al 75% para el IA(286,287); con índice kappa entorno 0,70 para el IA(288). En cambio, la concordancia empeora en los estadios más avanzados, como sucede en el estadio III. Mención aparte es el estadio IV quirúrgico, pues el hecho de haber extirpado la metástasis previa a la cirugía torácica condiciona la concordancia específica.

Si se desglosa el estadio en el T y la N, se aprecian mejores resultados en la concordancia para la T que para la N, hecho que se describe ya en la literatura, con unos porcentajes entorno el 70% para la T y 50% para la N(62). En términos de índice kappa, los resultados presentados en este trabajo mejoran los de series previas en cuanto a T y N(61). Una limitación de este tipo de estudios es la imposibilidad ética de explorar completamente de forma patológica todo el descriptivo M; sólo se exploran aquellos órganos con sospecha clínica o por PET-TC de metástasis. Las metástasis de pequeño tamaño (<8-10 mm) pueden ser indetectables por la PET-TC; no obstante, el buen rendimiento de esta técnica para la detección de las mismas, hace que esta limitación sea menor a lo previsto de forma teórica.

Es interesante destacar que se observa una mejor concordancia en pacientes sin tratamiento previo neoadyuvante (quimioterapia o quimiorradioterapia) y/o con un adenocarcinoma lepidico o adenocarcinoma invasivo mucinoso localizado en el lóbulo inferior derecho. La excelente concordancia obtenida en estos 17 casos de adenocarcinoma es paradójica, pues en la literatura se describen como tumores con una tasa no desdeñable de falsos negativos en la PET(289). No disponemos de una explicación razonable para este hallazgo.

El análisis de la distribución de los casos sin concordancia nos revela una tendencia a la infraestadificación clínica, hecho que también se ha recogido previamente en la literatura(61,286). En nuestra serie destaca que aproximadamente el 60% de los casos infraestadificados eran finalmente estadios no quirúrgicos o no quirúrgicos de entrada, fundamentalmente estadios IIIA con afectación ganglionar mediastínica. En referencia a los falsos negativos de la PET-TC (n=6/137) cabe destacar las limitaciones de esta técnica: nódulo por debajo de 8 mm, necrosis o componentes quísticos y determinados tipos histológicos, como el adenocarcinoma lepidico. A pesar de todas las diferentes técnicas utilizadas en todos estos años, todavía hay enfermedad neoplásica no detectada en el momento del diagnóstico preoperatorio. En este sentido, cabe mencionar que técnicas como el EBUS y el EUS están ya consolidadas y son de utilidad. En cambio, está por ver el papel que puedan aportar novedosas técnicas como la broncoscopia virtual o la endomicroscopía confocal. Viendo las continuas aportaciones moleculares a la literatura, podemos asegurar que en un futuro veremos como marcadores moleculares nos permitirán acercarnos más a la extensión real de la enfermedad(287,290,291). En cuanto a los casos supraestadificados, todos ellos continuaban teniendo indicación quirúrgica, por lo que la supraestadificación no comportó una mala indicación en esta serie. El bajo porcentaje de supraestadificación implica que los pacientes realmente quirúrgicos que se excluyen por motivos de resecabilidad son pocos.

La relevancia de este estudio es determinar cómo influye la ausencia de concordancia sobre el tratamiento que ofrecemos a los pacientes(287). De los resultados presentados podemos extraer que, a pesar de presentar una concordancia moderada (58%), en su conjunto un 82% de los pacientes fueron correctamente tratados. Un 12% debería haber recibido tratamiento neoadyuvante por ser estadios IIIA con afectación ganglionar mediastínica patológica, posteriormente ser restadificados y entonces valorar la posibilidad de cirugía. Este porcentaje nos parece aceptable ya que los pacientes con pN2 no sospechado en un solo nivel (79% de los pN2) tienen buena evolución en nuestra población(77). Recientemente hemos realizado una nueva revisión no publicada sobre los pN2 no sospechados (2005-2013, n=72/777) y se mantienen los resultados. Los pacientes con pN2 m múltiple (n=15/777), que son los que tienen claramente mala evolución, sólo representan el 1,9% del total de nuestros pacientes operados. Sin embargo, otros grupos prefieren mantener este porcentaje de afectación ganglionar no identificada previamente más bajo, pero a costa de un mayor número de exploraciones preoperatorias invasivas(80). Finalmente, un 6% no debería haber recibido cirugía por ser estadios IIIB y IV patológicos. Aunque no es un porcentaje elevado, claramente deberemos mejorarlo.

En referencia a los posibles sesgos de este estudio clínico, la inclusión de pacientes con y sin PET preoperatorio, así como incluir pacientes con tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía hace a la serie más heterogénea. No obstante, este hecho permite tener una visión global de la concordancia clínico-patológica en el cáncer de pulmón tratado con cirugía.

A modo de conclusión, a pesar de todos los esfuerzos que se realizan, de toda la batería de exploraciones y diversas técnicas, aproximadamente la mitad de los pacientes no están correctamente estadificados de forma clínica. No obstante, la introducción en los últimos años de nuevas pruebas de imagen y técnicas ha ayudado a mejorar la concordancia. En la mayoría de los pacientes la cirugía está correctamente indicada y sólo una pequeña parte de los casos deberían haber recibido otro tratamiento, por lo menos, en lo que concierne al tratamiento inicial. Deben seguir, pues, los esfuerzos dirigidos a extender y estandarizar técnicas de reciente aparición(79,292).

Análisis pronóstico de los marcadores embrionarios

Tras evidenciar las limitaciones de las técnicas actualmente implantadas en la asistencia clínica diaria, se evidenció la necesidad de investigar en nuevas técnicas aplicables que nos permitieran añadir factores pronósticos, localizar enfermedad no detectada y conocer la extensión real de la enfermedad, más allá, incluso, de la estadificación patológica. Con los datos del estudio previo sirviendo de proyección, se diseñó el estudio translacional con el objetivo de evaluar si la expresión de marcadores embrionarios podía añadir información pronóstica independiente a la estadificación patológica.

Las propiedades que debe presentar un marcador tumoral para que sea utilizado en la clínica es que sea sensible y específico, de determinación rápida y coste-efectiva, con la mínima variabilidad posible entre determinaciones y entre laboratorios y accesible para poderlo implementar en la práctica diaria.

SFTPC

SFTPC es un marcador muy específico de diferenciación del epitelio pulmonar normal, concretamente de los neumocitos tipo II, e hipotetizamos que en caso de transformación neoplásica se perdería su expresión. Efectivamente, un 78% de los pacientes con CPNCP presentan infraexpresión tumoral de SFTPC. Los resultados son concordantes con los existentes en estudios de *arrays*, donde se aprecia que a medida que aumenta el estadio patológico, disminuye la concentración (229,240). Aunque típicamente SFTPC se ha asociado a adenocarcinomas o no escamosos(230,239,241,251), nuestro estudio evidencia mayor expresión en los carcinomas escamosos. Se ha evidenciado un aumento de expresión de SFTPC en líneas celulares y CPCP menos agresivos tras exposición a

5-bromodeoxiuridina, la cual provoca diferenciación celular(171). No obstante, los neumocitos tipo II retienen la capacidad de iniciar procesos neoplásicos(293). Mientras que nosotros no hemos realizado estudios de expresión de la proteína SFTPC, sí que hay estudios previos que la han analizado encontrando un porcentaje elevado de tumores positivos, sin que reporten si esta expresión está aumentada o disminuida respecto al epitelio pulmonar correspondiente. En cualquier caso, un descenso de expresión de proteína es siempre difícil de cuantificar mediante técnicas de inmunohistoquímica(167). Otros miembros de la familia de proteínas SFTP presentan un comportamiento similar. En las lesiones preneoplásicas también se ha evidenciado progresión asociada a menos expresión de SFTPD (294). En este caso, el mecanismo de acción sería diferente ya que SFTPD está implicada en la respuesta inmune a la agresión, por lo que su pérdida facilitaría la evasión inmune del tumor.

En nuestra serie, la infraexpresión tumoral de SFTPC se ha asociado de forma independiente a peor pronóstico, con un riesgo 7 veces superior de recidiva y 5 veces superior de mortalidad, probablemente por tumores más grandes o más indiferenciados. El análisis por histologías mantiene similares resultados. Estos datos coinciden con los resultados reportados por varias series(220,229,230,239,240). No obstante, Lee y colaboradores y TCGA reportan mayor expresión en los recidivados o éxitus por neoplasia(222). En nuestra serie, además, la peor evolución de los infraexpresados ya se produce desde estadios tempranos.

A modo de conclusión, SFTPC es un marcador muy prevalente y la pérdida de expresión confiere mal pronóstico en tumores resecaos. Por tanto, este marcador podría considerarse en la monitorización postoperatoria de los pacientes intervenidos por neoplasia pulmonar, mayoritariamente estadios precoces.

FGFR2b

No existe, en las diferentes series de estudios de *microarrays* depositadas en las bases de datos, un patrón claro de infra o sobreexpresión de FGFR2 en tejido tumoral. A nivel de proteína, Behrens y colaboradores evidenciaron sobreexpresión tumoral de FGFR2, mientras que Yamayoshi et al evidenciaron sobreexpresión específica de FGFR2b, en el 51% de los tumores mediante inmunohistoquímica(154,295). Pros et al no evidenciaron ningún paciente con sobreexpresión de FGFR2 en una muestra de 60 tumores analizados mediante RT-PCR. No obstante, en ese estudio, la expresión relativa tumoral era superior a la del pulmón normal, pero el *cutoff* de sobreexpresión utilizado por los autores (10 veces la mediana de la expresión del pulmón normal) fue bastante restrictivo(148). En esta tesis, hemos analizado un subtipo de FGFR2, FGFR2b, con una expresión tumoral similar o algo menor al pulmón normal. La tasa de sobreexpresión (20-26%) fue menor a las reportadas, pero concordante con el estudio de Marek que evidenció que la sobreexpresión tumoral de FGFR2 viene

dada el subtipo FGFR2c y no por FGFR2b(146) y discordante con Liao(296). La sobreexpresión de FGFR2b se concentra en pacientes con estadio I-II y sin invasión vascular, lo que confirmaba los resultados de Beer(240).

La sobreexpresión tumoral de FGFR2b fue más frecuente en el carcinoma escamoso, en línea con los resultados previos de FGFR2(148,222), donde en algún estudio lo había incluido en una firma distintiva de este tipo histológico(230). Esta sobreexpresión no se asociaba de forma clara a alteraciones en el DNA ya que la amplificación sólo se da en un número bajo de casos (3-6%)(148). Otros miembros de la familia FGFR, como el FGFR1 están amplificados y sobreexpresados en el carcinoma escamoso(146,147,151).

La correlación entre los niveles de expresión de FGFR2 y la evolución clínica es motivo de controversia. En las bases de datos disponibles (Oncomine™) se recogen estudios que evidencian que los pacientes con más expresión FGFR2 presentan mejor evolución(220,240,242) y otros estudios que no reportan diferencias (222,241), aunque la mayoría presentan resultados variables según la sonda considerada, lo que probablemente refleja diferentes comportamientos de los distintos miembros de esta familia de moléculas(229,230).

El hecho que en este estudio hemos analizado un subtipo de FGFR2, FGFR2b no es trivial, pues esta expresión específica se ha asociado a menor proliferación celular(297), sobretodo en contraposición a la expresión de su variante de *splicing* FGFR2c. La pérdida de expresión de FGFR2b se ha asociado a peor evolución, en líneas celulares y modelos murinos de cáncer de próstata (cambio a FGFR2c), piel, vejiga o de glándulas salivares(11,297-301); en nuestro estudio, la infraexpresión de FGFR2b se asocia a invasión vascular. Las mutaciones de FGFR2 también se han asociado a senescencia celular y pérdida de actividad tirosina quinasa. Nuestros pacientes con sobreexpresión tumoral de FGFR2b presentan mayor tiempo hasta la recidiva y mejor supervivencia ($p < 0,05$). Estos resultados de buen pronóstico se mantenían, en nuestra serie, en el carcinoma escamoso sobreexpresado y se presentaban sobretodo en jóvenes, en estadio I-II, tumores de ≤ 3 cm y sin invasión linfática. Es bien conocido que según el contexto FGF puede causar activación tumoral o senescencia celular. El efecto protector de la expresión de FGFR2b podría depender del contexto(301) o del tipo histológico, pues Yamayoshi y colaboradores evidenciaron peor evolución con la coexpresión tumoral de FGF7-FGFR2b en adenocarcinomas y no diferencias en el carcinoma escamoso.

CEA, CEACAM5

CEA-CEACAM5 es un marcador con abundante literatura y una larga trayectoria, motivo por el cual se eligió para validar los resultados que se obtuvieron con los marcadores embrionarios. Clásicamente, el aumento de expresión o de niveles de CEACAM5 en suero se ha asociado a una peor evolución(302). No obstante, hasta la fecha no se ha implementado en la asistencia.

Un 68% de los tumores presentaban sobreexpresión de CEACAM5 en línea con los resultados de la literatura, aunque nuestro porcentaje está en el límite inferior de lo publicado hasta la fecha(66). En nuestra experiencia, los pacientes con adenocarcinoma presentan los niveles de CEACAM5 tumoral entre 2,6-5,6 veces más elevados que los carcinomas escamosos ($p=0,04$) y más elevados que los CICC; esto concuerda con los resultados obtenidos con *microarrays* (230).

Curiosamente, no existen muchos trabajos que evalúen el carácter pronóstico de la elevación de CEACAM5 tumoral. Okayama et al, estudiando 150 pacientes, reportan una mayor expresión tumoral en los casos con recidiva, sin que tenga significación estadística. En nuestra serie, la expresión de CEACAM5 no tiene una asociación significativa con el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia. Los resultados en suero contradicen nuestros resultados, pues la elevación de CEA se asocia a peor pronóstico y los niveles más altos a los estadios más avanzados(141,302). Es posible que la carga de CEA en suero no refleje tanto la expresión o no en el tumor como la carga tumoral global que tiene el paciente en el momento del diagnóstico.

SHH

Si bien el papel de SHH en el desarrollo del cáncer de pulmón está bien documentado, hay pocos estudios que hayan estudiado su valor pronóstico. En nuestro estudio lo hemos hecho y hay que destacar que tiene una expresión baja, lo que es importante en el momento de la interpretación de los resultados obtenidos. La expresión tumoral era inferior al pulmón normal y estos concordaba con lo publicado en los estudios de expresión con *arrays*. SHH es un marcador de carcinoma escamoso y así se comportó en nuestra serie(173,230,241). En contra de lo que podríamos prever en base a la asociación descrita entre expresión de SHH y proliferación celular mediada por MYCN(229), los pacientes con sobreexpresión de SHH tenían mejor pronóstico, mientras que la infraexpresión se asocian de forma independiente a afectación ganglionar y recidiva. Finalmente, Okayama et al reportaron niveles de expresión similares si se analizaba el status de recidiva y de supervivencia(229).

SHP2

SHP2 es un marcador que presenta un comportamiento dual promoviendo(184) e inhibiendo la proliferación celular y esto se manifiesta hasta en su expresión tumoral. Algunos estudios presentan mayor expresión tumoral(178,230) y otros, como el presente, demuestran una mayor expresión del pulmón normal. En la presente tesis, SHP2 se comporta como un inhibidor de la proliferación, pues los pacientes que presentan menos expresión de SHP2 presentan peor evolución. No obstante, en la literatura hay estudios que apoyan nuestros resultados(17,21,230), mientras que otros estudios muestran una peor evolución para los sobreexpresados(179,229,240). Los datos del presente estudio orientan a este marcador como un gen supresor de tumores, en el que su sobreexpresión confiere buen pronóstico y su infraexpresión confiere mal pronóstico. No obstante, en la literatura existen más datos a favor de SHP2 como un oncogén.

SOX17, MYCN y FRS2

La concentración tumoral de SOX17 fue ligeramente inferior a la del pulmón normal, pero los resultados obtenidos en cuanto a evolución según expresión tumoral no eran informativos. No obstante, esto no nos debe ocultar que la familia SOX es una familia interesante, pues la metilación e inactivación de SOX17 es un fenómeno presente en la neoplasia pulmonar(183,196), que condiciona menor expresión y que la menor expresión se asocia a recidiva(222,230) y éxitus(230).

La falta de información pronóstica de MYCN está probablemente relacionada con unos niveles de expresión extremadamente bajos. Si bien su patrón de expresión tumoral más frecuente es la sobreexpresión (55% en esta serie), no se asoció en nuestro estudio a diferencias en tiempo libre de enfermedad ni en supervivencia. En la literatura existe controversia, aún no resuelta, sobre su posible utilidad como marcador pronóstico(229,230,240,241), ya que pocos estudios han considerado el subtipo MYCN. Sí que se ha asociado MYC a peor evolución y a apoptosis(127,160,239). Tampoco hemos visto que FRS2 se comporte como un marcador con potencial utilidad clínica y esto podría estar relacionado con distintos comportamientos de los dos subtipos conocidos(156,158).

Combinación de marcadores

Al combinar diferentes marcadores y utilizando modelos multivariantes, evidenciamos que la firma que teóricamente podía añadir valor pronóstico a SF-TPC no lo hacía. FGFR2b se descartó dado que interaccionaba mucho con el SFTPC. Estos marcadores no se habían utilizado antes conjuntamente, pero sí que se habían evaluado, junto con otros muchos genes, FGFR2 y SHH sobreex-

presados ó FGFR2 y SHP2 infraexpresados, en la serie de Bittner (no publicada, disponible en Oncomine®) o FGFR2 y SFTPC infraexpresados en la series de Beer, Rohrbeck, Okayama o Bhattacharjee(229,240,241,303).

Sintetizando, podemos decir que la infraexpresión tumoral de SFTPC se asocia a peor pronóstico de forma independiente, siendo un marcador interesante que merecerá validación en series más amplias. Por otro lado, el comportamiento del subtipo FGFR2b también merece mayor atención con la idea de profundizar en su posible papel supresor. Colateralmente, se evidenció que la invasión linfática intratumoral se asociaba a mayor riesgo de recidiva y peor supervivencia. Este es un dato a tener en cuenta a la hora de considerar un tratamiento adyuvante, ya que es una característica que no siempre se considera en la práctica clínica habitual.

Restadificación molecular ganglionar

La restadificación molecular ganglionar ha sido el tercer objetivo de esta tesis, pues la detección de enfermedad en esta localización crítica, sobretodo a nivel de los nódulos linfáticos mediastínicos, discrimina entre un tratamiento quirúrgico o de quimioterapia-radioterapia. Desde el punto de vista del cirujano oncológico torácico, el estado ganglionar es clave en la estadificación de la neoplasia y es el principal punto a progresar con una estadificación molecular de la neoplasia de pulmón. Para poder reclasificar molecularmente los pacientes a través de los ganglios, se tienen que cumplir dos premisas: el marcador tiene que estar sobreexpresado respecto la expresión ganglionar torácica de personas sanas y esta alteración molecular debe estar asociada a un mayor riesgo de recidiva e, idealmente, de mortalidad. El cumplimiento de estas dos condiciones implica que el marcador sería un indicador de la presencia de células neoplásicas en el ganglio analizado y que este grado de afectación tendría implicación clínica.

Teniendo en mente estas consideraciones, se reclasificaron los ganglios y se restadificaron los pacientes usando tres marcadores, CEACAM5, FGFR2b y SHP2. Estos marcadores fueron cuidadosamente seleccionados tras analizar la literatura previa, las rutas moleculares implicadas en la embriología pulmonar, tras analizar los resultados recogidos en las bases de datos y los resultados obtenidos de los niveles de marcadores en un número reducido de nuestras muestras de tumor, pulmón normal y ganglio sin patología neoplásica.

Existen muchos estudios de restadificación mediante inmunohistoquímica, pero se eligió como técnica la RT-qPCR de mRNA dado que aporta mayor sensibilidad, disminuye la variación subjetiva interobservador y permiten estudiar

más muestras en una misma reacción. Referenciaremos nuestra discusión a los estudios mediante esta técnica y de la metilación de DNA.

Con la combinación de marcadores se reclasificaron 219 ganglios (63%), valor en el límite alto de lo reportado en las series, cuyos valores más frecuentes se encuentran entre 15-20% de los ganglios. Se restadificaron a molecular positivo un número muy elevado de casos, 68 (89%). Si revisamos la literatura, los marcadores que finalmente restadifican con impacto en el tiempo libre de enfermedad y supervivencia, reclasifican entre un 24% (MUC1) y como máximo un 63% (CEACAM5-PLUNC) o un 67% de los casos pN0 (KRT19), siendo lo más habitual restadificar entre un 20-40% de los casos, como sucede, por ejemplo, con CDH13 y CDKN2A (40-42%). En nuestra serie, CEACAM5 restadifica el 57% de los casos (63% si miramos los exclusivamente pN0) y esto si que es concordante con los resultados publicados (36-64%)(66,144,251,265,268). SFTPC no se pudo analizar en este tercer estudio dado que la expresión ganglionar era muy baja y hubo problemas técnicos; en la literatura no se ha evaluado su carácter pronóstico, pero sí la presencia en ganglios y la reclasificación de pacientes, que está entorno al 26%(251,264).

El tiempo hasta la recidiva y la supervivencia fue algo menor en el grupo de pacientes molecular positivo que en los pacientes molecular negativo, pero sin diferencias significativas. El análisis por subgrupos molecular N0, molecular N1 y molecular N2, incluso desglosando en pacientes restadificados pN0 y pN1, no mostraba mejores resultados. Por tanto, la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2 no es útil para la restadificación molecular ganglionar. El análisis de los marcadores por separado seguía el mismo patrón. En contraste con nuestros resultados, los pacientes con expresión elevada/sobreexpresión de CEA-CEACAM5 ganglionar se asociaban de forma independiente a un riesgo 3 veces superior de recidiva(254,265) y la asociación con PLUNC podía determinar hasta un riesgo 6 veces superior de mortalidad(258). Un reciente estudio sobre la metilación de SHP1 también asocia mayor riesgo de recidiva, de forma independiente.

Además del CEA, la sobreexpresión ganglionar de KRT19, *survivin/livin* y la metilación de *CDKN2A-CDH13* se han asociado a mayor riesgo de recidiva de forma independiente(205,252,259,266). Por su parte, MUC1 y *survivin/livin* se asociaron a un mayor riesgo de mortalidad(256,259). No se ha publicado literatura que permita constatar nuestros resultados de SHP2 y FGFR2b. Será de interés que otros autores intenten reevaluar nuestros resultados. En la tabla 53 exponemos los principales estudios que han realizado una restadificación molecular ganglionar.

Si bien nosotros no los hemos analizado en estudios previos, otros marcadores como p53, AE1, AE3 o la metilación de *DAPK* se han detectado en ganglio linfático y sus niveles elevados no se han asociado de forma independiente a peor pronóstico. No obstante, los resultados de estos estudios muestran tendencias interesantes y probablemente es necesario un número de pacientes superior para obtener una relación significativa e independiente.

Hay que subrayar que nuestros resultados no se modificaron tanto si se calculaba la concentración absoluta como la relativa. También se exploraron diferentes niveles de *cutoffs*, llegando a realizar curvas ROC tomando como referente la recidiva y la supervivencia, sin que se modificaran los resultados. Tal como se describe en resultados, ni el estudio circunscrito a los tumores que sobreexpresaban los marcadores ni utilizando la expresión ganglionar como nivel de corte modificaban las conclusiones.

ESTUDIO	Pacientes	Ganglios pN0		Pacientes pN0 Mol+	Pronóstico pN0 Mol+ Peor (HR, IC 95%)
		n ¹	n Mol+		
Li 2008(256)	89	402	36 (9%) MUC1	21 (24%) MUC1	OS: 2,8 (1,5-5,2)
Nosotti 2012(265)	55	609	ND ²	20 (36%) CEA	TLE: 0,8 (0,12-1,5) OS: 1 (0,2-1,9)
Nosotti 2005(254)	44	261	35 (13%) CEA	16 (36%) CEA	TLE: 3,3 (1,1-9,5)
Ge 2005(266)	22	117	25 (21%) KRT19	6 (27%) KRT19	TLE: 0,2 (0,1-0,3)*
Pimpec-Barthes 2005(253)	33	223	30 (14%) KRT19	16 (48%) KRT19	TLE 2 a ³ : 5,6. 4 a NS.
Melfi 2008(252)	6	6	4 (67%) KRT19	4 (67%) KRT19	Mol+ N2, 60% Recurren
Chanida 2014(267)	23	198	ND	4 (17%) SHP1	TLE: 19 (1,4-243,2)
Benlloch 2009(258)	38	344	44 (13%) CEACAM5 54 (16%) PLUNC	24 (63%) 8 (21%) Mol+ N2	Mol+ N2 OS: 6,1 (1,5-25,3)
Brock 2008(205)	187	75	ND	32 (42%) <i>CDKN2A</i> 30 (40%) <i>CDH13</i>	TLE N2: 4,3 (1,1-17,7) TLE N2: 6,1 (0,8-45)
Li 2013(259)	44	286	79 (28%) survivin y/o livin	15 (34%) survivin y/o livin	TLE: 2,5 (1,1-4,8) OS: 2,5 (1,1-4,5)
Macia 2015	76	349	219 (63%) CEACAM5 y/o FGFR2b y/o SHP2	68 (89%) CEACAM5 y/o FGFR2b y/o SHP2	p>0,05

Tabla 53.

Principales estudios de restadificación molecular ganglionar comparados con nuestro estudio. 1, n: número; 2, ND: no disponible; 3, a: años. *El riesgo de recidiva de los pacientes molecular negativos es menor.

Limitaciones

Hay que tener en cuenta que en el momento que empezábamos este estudio estábamos seleccionando, teóricamente, marcadores que se sobreexpresaban en tejido tumoral y que, por tanto, se comportarían a nivel teórico como oncogenes. En el transcurso del estudio, esto no se confirmó para todos los marcadores, lo que llevó a revisar los pacientes, los datos, se repitió la técnica de la extracción de RNA, paso a cDNA, RT-qPCR y análisis de los datos sin objetivar errores que hicieran cambiar el sentido de la expresión de los marcadores. No obstante, hay que tener en cuenta que el análisis de la expresión por *real time* RT-qPCR es muy sensible a varios factores, como por ejemplo la transcriptasa inversa utilizada o la calidad y la cantidad de RNA de la muestra. El RNAlater es un estabilizador de RNA eficaz pero durante el procesamiento puede degradarse parte del RNA objetivo. Todo esto implica un cierto grado de variabilidad y menor reproducibilidad; estas dificultades intrínsecas de la técnica hacen que pequeñas alteraciones en el proceso se traduzcan en cambios relevantes en los resultados finales. Desconocemos si la baja expresión detectada de algunos marcadores en el pulmón normal y en el tumor (sobretudo SHH y MYCN) puede estar relacionada con estas limitaciones. No obstante, hay que tener en cuenta que el hecho de reportarse en la literatura varios métodos de procesamiento de las muestras, varios controles a usar, diversos métodos de normalización o puntos de corte diagnósticos diferentes indica que estamos todavía lejos de conseguir una metodología completamente estandarizada. A estos condicionantes técnicos podemos añadir la conocida heterogeneidad de los tumores como otro factor de confusión(304).

Otra limitación que podría genera falsos negativos fue la obtención de la muestra. En el caso de las muestras tumorales, se utilizó *tru-cut* quirúrgico o biopsia excisional quirúrgica, intentando no desestructurar el tumor. Estas peculiaridades técnicas hacen que no se pueda asegurar el 100% la representatividad tumoral de las muestras prospectivas (83 casos, incluyendo los 76 a restadificar). Optamos por un muestreo de 42 muestras de las cuales había muestra congelada y evidenciamos que los resultados obtenidos en estas muestras con celularidad confirmada no diferían de los obtenidos en muestras sin confirmación mediante hematoxilina-eosina.

En el caso de las muestras ganglionares con afectación neoplásica histológica, la afectación podía no incluir todo el ganglio y no ser visible macroscópicamente. Dado que la recogida de muestras se realizaba en quirófano, en los pacientes pN1 no se puede asegurar que la muestra obtenida contenga material ganglionar con neoplasia. Por otra parte, podríamos pensar que no se hayan resecado los ganglios con enfermedad molecular. Durante la cirugía, se resecan todos los ganglios visibles y si revisamos la literatura, el impacto del número de ganglios resecados en la recidiva y en la supervivencia es aún contradictorio, variando según el estudio evaluado(305,306). La tendencia en los últimos estudios es a asociar mejor supervivencia y mayor número de ganglios resecados o examinados durante la

cirugía, con mínimo de 6 y un *plateau* entorno a 18-20 ganglios(307,308) aunque esto también depende del estadio patológico o la estadificación previa realizada. Si es suficientemente rigurosa con una correcta evaluación preoperatoria y en estadios precoces (T1-2 NO ó N1 no hilar), no se precisa de una disección ganglionar sistemática y es suficiente un muestreo sistemático(88). En este estudio se han analizado una mediana de 12 ganglios, lo que nos asegura haber recogido muestras representativas de todos los espacios ganglionares.

En cuanto a los falsos positivos, se tomaron las medidas adecuadas para minimizar la contaminación epitelial durante la recogida y el procesamiento de las muestras. También tendremos que asumir un porcentaje de expresión basal ectópica de los marcadores y la posible amplificación de zonas no específicas del marcador objetivo. Para ello, se diseñaron los *primers* englobando dos exones y eligiendo regiones que minimizaran esta posibilidad.

Finalmente, el número de pacientes fue significativo sin compararnos con otras series, pero carece de la potencia para responder a las preguntas que nos hemos planteado, sobretodo en cuanto a la restadificación molecular ganglionar. A pesar de las limitaciones, el hecho de tener duplicadas o triplicadas las determinaciones por muestra y por otra parte el rigor seguido en el procedimiento hace pensar que los datos son fidedignos.

Líneas de investigación futuras

Después de nuestros resultados, SFTPC se convierte en un marcador tumoral interesante que merece validación y probablemente un mejor conocimiento de su mecanismo de acción. Por otro lado, el comportamiento del subtipo FGFR2b también merece mayor estudio para profundizar en su posible papel supresor. Finalmente, se tendrá que valorar si vale la pena ahondar más en el papel del CEA en estos pacientes.

Esta tesis no sólo ha pretendido analizar la expresión de los marcadores en tumores, sino que un objetivo fundamental ha sido la restadificación ganglionar molecular, aspecto, aunque presente, menos analizado en la literatura. Desde la óptica del cirujano torácico, el status ganglionar de los pacientes es de alto interés. El conocimiento del status molecular ganglionar puede permitir elegir aquellos pacientes con neoplasia de pulmón que se beneficiarán de tratamiento quirúrgico, puede servir de guía para ofrecer un tratamiento adyuvante a aquellos pacientes tratados mediante cirugía y que presenten alto riesgo de recidiva, puede permitir monitorizar la evolución de los pacientes de forma postoperatoria y serviría para, en un futuro, detectar los pacientes con neoplasia de pulmón de forma más precoz -me-

diante el estudio de marcadores en muestras más accesibles (sangre, esputo)-, tratando así tumores más pequeños y más localizados, aumentando el 20% actual de pacientes con neoplasia tributarios de cirugía y aumentando el volumen de pacientes tributarios de resección pulmonar mayor a través de un abordaje toracoscópico. Deberemos considerar otros marcadores y otras técnicas (detección de mutaciones, metilación de DNA, etc.) para realizar una restadificación molecular ganglionar que detecte los pacientes con peor pronóstico. El objetivo de fondo sigue siendo detectar la extensión clínicamente relevante de la enfermedad.

En este sentido, los estudios colaborativos a gran escala, como *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) o *The strategic partnering to evaluate cancer signatures* (SPECES) *Program*, nos ayudarán a dilucidar el papel exacto de todos estos marcadores expuestos en esta tesis. Dada la complejidad técnica del análisis del transcriptoma, probablemente estudios epigenéticos o de mutaciones deberán realizarse también en la línea de los marcadores embrionarios pulmonares para confirmar o descartar todos estos resultados.

El futuro estará en el análisis personalizado para cada tumor y ganglios de cada paciente, a gran escala génica (secuenciación exómica), de transcripción (transcriptoma) y de proteínas (proteómica), que pueda aportar una clasificación molecular que nos acerque a la extensión real de la enfermedad, que aumente el número de pacientes tributarios de tratamiento quirúrgico, que permita elegir el mejor tratamiento farmacológico para cada paciente y que permita detectar y tratar precozmente la recidiva en el seguimiento de los pacientes.

Conclusiones

- 1.-** En neoplasia de pulmón resecable, la concordancia entre la estadificación clínica y la quirúrgica-patológica es moderada. No obstante, en la inmensa mayoría de los casos no afecta a la indicación quirúrgica.
- 2.-** La infraexpresión tumoral de SFTPC se asocia a un peor pronóstico de forma independiente, siendo un marcador interesante que merecerá ser validado en series más amplias.
- 3.-** La restadificación molecular basada en los niveles de expresión en ganglio de los marcadores embrionarios CEACAM5, FGFR2b y SHP2 no aporta información clínica adicional a la estadificación patológica (pN).

Bibliografía

- 1.- Carlson BM. Embriología humana y biología del desarrollo. Madrid: Harcourt; 2005.
- 2.- Moore KL, Persaud TVN. Embriología clínica. Barcelona: Elsevier; 2008.
- 3.- Moya J, Serrano T, Escobar I, Ramos R, Macía I, Rivas F, et al. Anatomía y embriología pleural. En: Guijarro R, Deu M, Álvarez A, editores. Patología de la Pleura. Primera. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2014. p. 3-12.
- 4.- Rabineau D, Dupont J-M, Plateaux P. Embryologie humaine [Internet]. Disponible en: <http://cvirtuel.cochin.univ-paris5.fr/embryologie/animentre>.
- 5.- Riquet M, Briere J, Dupont P, Pennhouat G, Hidden G. The embryonic and early fetal development of the lymphatics of the heart and lungs in humans (25.6.93). *Surg Radiol Anat*. 1993;15(4):369-70.
- 6.- Ramos R, Moya J, Macía I, Rivas F, Ureña A. Asklepios Atlas de Patologías. Cáncer de Pulmón. Barcelona; 2014.
- 7.- Orr-Urtreger A, Bedford MT, Burakova T, Arman E, Zimmer Y, Yayon A, et al. Developmental localization of the splicing alternatives of fibroblast growth factor receptor-2 (FGFR2). *Dev Biol*. 1993;158(2):475-86.
- 8.- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:139-49.
- 9.- Givol D, Yayon A. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J*. 1992;6(15):3362-9.
- 10.- Holzmann K, Grunt T, Heinzle C, Sampl S, Steinhoff H, Reichmann N, et al. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor IgIII loops in cancer. *Journal of Nucleic Acids*. 2012. p. 950508.
- 11.- Katoh M. Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review). *Int J Oncol*. 2008;33(2):233-7.
- 12.- Zhou W, Feng X, Wu Y, Bengé J, Zhang Z, Chen Z. FGF-receptor substrate 2 functions as a molecular sensor integrating external regulatory signals into the FGF pathway. *Cell Res* [Internet]. 2009 Oct [citado 2014 Jul 13];19(10):1165-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652666>
- 13.- Kouhara H, Hadari Y., Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, et al. A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell* [Internet]. 1997 May [citado 14 jul 2014];89(5):693-702. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400802524>
- 14.- Tomasovic A, Traub S, Tikkanen R. Molecular networks in FGF signaling: Flotillin-1 and Cbl-associated protein compete for the binding to fibroblast growth factor receptor substrate 2. *PLoS One*. 2012;7(1).

- 15.- Zhang J, Lin Y, Zhang Y, Lan Y, Lin C, Moon AM, et al. Frs2alpha-deficiency in cardiac progenitors disrupts a subset of FGF signals required for outflow tract morphogenesis. *Development* [Internet]. 2008 Nov [citado 15 jul 2014];135(21):3611-22. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3262991&tool=pmcentrez&render-type=abstract>
- 16.- Kameda Y, Ito M, Nishimaki T, Gotoh N. FRS2 alpha 2F/2F mice lack carotid body and exhibit abnormalities of the superior cervical sympathetic ganglion and carotid sinus nerve. *Dev Biol* [Internet]. 2008 Feb 1 [citado 15 jul 2014];314(1):236-47. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18177855>
- 17.- Ren Y, Chen Z, Chen L, Fang B, Win-Piazza H, Haura E, et al. Critical role of Shp2 in tumor growth involving regulation of c-Myc. *Genes Cancer*. 2010;1(10):994-1007.
- 18.- Mohi MG, Neel BG. The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17(1):23-30.
- 19.- Chan G, Kalaitzidis D, Neel BG. The tyrosine phosphatase Shp2 (PTPN11) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* [Internet]. 2008 Jun [citado 15 jul 2014];27(2):179-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286234>
- 20.- Bard-Chapeau EA, Li S, Ding J, Zhang SS, Zhu HH, Princen F, et al. Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2011;19(5):629-39.
- 21.- Wu D, Pang Y, Ke Y, Yu J, He Z, Tautz L, et al. A conserved mechanism for control of human and mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation by shp2 tyrosine phosphatase. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jan [citado 3 ago 2014];4(3):e4914. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2655646&tool=pmcentrez&render-type=abstract>
- 22.- Aceto N, Sausgruber N, Brinkhaus H, Gaidatzis D, Martiny-Baron G, Mazarrol G, et al. Tyrosine phosphatase SHP2 promotes breast cancer progression and maintains tumor-initiating cells via activation of key transcription factors and a positive feedback signaling loop. *Nat Med*. 2012;18(4):529-37.
- 23.- Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, Keilhack H, Halmos B, Naoki K, et al. Activating mutations of the noonan syndrome-associated SHP2/PTPN11 gene in human solid tumors and adult acute myelogenous leukemia. *Cancer Res* [Internet]. 2004 Dec 15 [citado 3 ago 2014];64(24):8816-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15604238>
- 24.- Velcheti V, Govindan R. Hedgehog signaling pathway and lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007;2(1):7-10.
- 25.- Schaefer GI, Perez JR, Duvall JR, Stanton BZ, Shamji AF, Schreiber SL. Discovery of small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog pathway. *J Am Chem Soc* [Internet]. 2013 Jul 3 [citado 16 jul 2014];135(26):9675-80. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3703668&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 26.- Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature*. 2003;422(6929):313-7.
- 27.- Warburton D, Bellusci S, De Langhe S, Del Moral PM, Fleury V, Mailleux A, et al. Molecular mechanisms of early lung specification and branching morphogenesis. *Pediatr Res*. 2005;57(5 Pt 2):26R-37R.
- 28.- Cardoso W V, Lu J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development*. 2006;133(9):1611-24.
- 29.- Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* [Internet]. 1998 Sep [citado 16 jul 2014];20(1):58-61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/1717>
- 30.- Choy SW, Cheng SH. Hedgehog signaling. *Vitam Horm* [Internet]. 2012 Jan [citado 15 jul 2014];88:1-23. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123946225000018>

- 31.- Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2012 Jan [citado 17 jul 2014];16(1):103-19. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3457779&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 32.- Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2014 Feb [citado 9 jul 2014];13(2):140-56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4204>
- 33.- Kallioniemi A. Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior. *Cancer Genet* [Internet]. 2012 Jun [citado 17 jul 2014];205(6):267-77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749032>
- 34.- Remezal M. Aparato respiratorio. En: Burkitt HG, Young B, Heath JW, editores. *Wheater. Histología funcional*. Madrid: Churchill Livingstone; 1993. p. 220-234.
- 35.- Zarbock R, Woischnik M, Sparr C, Thurm T, Kern S, Kaltenborn E, et al. The surfactant protein C mutation A116D alters cellular processing, stress tolerance, surfactant lipid composition, and immune cell activation. *BMC Pulm Med* [Internet]. 2012 Jan [citado 19 jul 2014];12:15. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3376036&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 36.- Lange AW, Haitchi HM, LeCras TD, Sridharan A, Xu Y, Wert SE, et al. Sox17 is required for normal pulmonary vascular morphogenesis. *Dev Biol* [Internet]. 2014 Mar 1 [citado 11 jul 2014];387(1):109-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418654>
- 37.- Zhang W, Glöckner SC, Guo M, Machida EO, Wang DH, Easwaran H, et al. Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Apr 15 [citado 27 feb 2014];68(8):2764-72. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2823123&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 38.- Park KS, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Whitsett JA. Sox17 influences the differentiation of respiratory epithelial cells. *Dev Biol*. 2006;294(1):192-202.
- 39.- Hipp NI, Christner L, Wirth T, Mueller-Klieser W, Walenta S, Schröck E, et al. MYCN and survivin cooperatively contribute to malignant transformation of fibroblasts. *Carcinogenesis* [Internet]. 2014 Feb [citado 20 jul 2014];35(2):479-88. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130166>
- 40.- Pavlopoulou A, Scorilas A. A Comprehensive Phylogenetic and Structural Analysis of the Carcinoembryonic Antigen (CEA) Gene Family. *Genome Biol Evol* [Internet]. 2014 Jan [citado 20 jul 2014];6(6):1314-26. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4079198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 41.- Kuespert K, Pils S, Hauck CR. CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2006 Oct [citado 20 jul 2014];18(5):565-71. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16919437>
- 42.- Bronchogenic Cancer. En: Kaiser LR, Singhal S, editores. *Essentials of Thoracic Surgery*. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2004. p. 163-205.
- 43.- Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013;49(6):1374-1403.
- 44.- López-Encuentra A. Clasificación de las neoplasias respiratorias. Carcinoide. *Epidemiología y estadificación del carcinoma broncogénico*. En: Martín P, Ramos G, Sanchís J, editores. *Medicina Respiratoria*. Madrid: Aula Médica SL; 2006. p. 1068.
- 45.- Borrás JM, Pinol JL, Izquierdo A, Borrás J. Analysis of cancer incidence, survival and mortality according to the main tumoral localizations, 1985-2019: Lung cancer. *Med Clin (Barc)*. 2008;131 Suppl:53-7.
- 46.- Ribes J, Cleries R, Buxo M, Ameijide A, Valls J, Gispert R. Predictions of cancer incidence and mortality in Catalonia to 2015 by means of Bayesian models. *Med Clin (Barc)*. 2008 Oct;131 Suppl:32-41.

- 47.- Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, López-Campos JL, Vigil E, Otero R. Lung cancer mortality trends in Spain between 1980 and 2005. *Arch Bronconeumol*. 2008;44(2):70-4.
- 48.- Shields TW, LoCicero J, Ponn RB, Rusch VW. *General Thoracic Surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- 49.- Rudin CM, Avila-Tang E, Samet JM. Lung cancer in never smokers: a call to action. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2009 Sep 15 [citado 10 jul 2014];15(18):5622-5. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3715083&tool=pmcentrez&render-type=abstract>
- 50.- Samet JM, Avila-Tang E, Boffetta P, Hannan LM, Olivo-Marston S, Thun MJ, et al. Lung cancer in never smokers: clinical epidemiology and environmental risk factors. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2009 Sep 15 [citado 20 jul 2014];15(18):5626-45. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170525&tool=pmcentrez&render-type=abstract>
- 51.- Escobar I. Valor pronóstico de la determinación del antígeno Ki-67 en estadios quirúrgicos del cáncer de pulmón no célula pequeña [tesis doctoral]. Barcelona (España): Universitat de Barcelona; 2011. p 135.
- 52.- Gallegos M. Patró de metilació d'un panell de biomarcadors en l'adenocarcinoma pulmonar [tesis doctoral]. Barcelona (España): Universitat de Barcelona; 2013. p.164-5.
- 53.- 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 [Internet]*. 2011 Feb [citado 22 jul 2014];6(2):244-85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252716>
- 54.- Schwartz AM, Rezaei MK. Diagnostic surgical pathology in lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest [Internet]*. 2013 May 1 [citado 10 jul 2014];143(5 Suppl):e251S-62S. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleID=1685831>
- 55.- Silvestri GA, Gonzalez A V, Jantz MA, Margolis ML, Gould MK, Tanoue LT, et al. Methods for staging non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest [Internet]*. 2013 May 1 [citado 10 jul 2014];143(5 Suppl):e211S-50S. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleID=1685830>
- 56.- Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007;2(8):706-14.
- 57.- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. Seventh Ed. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. Wiley-Blackwell; 2009.
- 58.- Asamura H, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Rusch VW, Vansteenkiste JF, et al. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the N Descriptors in the Forthcoming 8th Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2015 Dec [citado 6 dic 2015];10(12):1675-84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26709477>
- 59.- Eberhardt WEE, Mitchell A, Crowley J, Kondo H, Kim YT, Turrisi A, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the M Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2015 Nov [citado 2 dic 2015];10(11):1515-22. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26536193>
- 60.- Rami-Porta R, Bolejack V, Crowley J, Ball D, Kim J, Lyons G, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol [Internet]*. 2015

- Jul [citado 30 sep 2015];10(7):990-1003. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134221>
- 61.-** López-Encuentra A, García-Luján R, Rivas JJ, Rodríguez-Rodríguez J, Torres-Lanza J, Varela-Simo G. Comparison between clinical and pathologic staging in 2,994 cases of lung cancer. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2005 Mar [citado 24 jul 2014];79(3):974-9; discussion 979. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734416>
- 62.-** Cetinkaya E, Turna A, Yildiz P, Dodurgali R, Bedirhan MA, Gürses A, et al. Comparison of clinical and surgical-pathologic staging of the patients with non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2002 Dec [citado 24 jul 2014];22(6):1000-5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467827>
- 63.-** Gdeedo A, Van Schil P, Corthouts B, Van Mieghem F, Van Meerbeeck J, Van Marck E. Comparison of imaging TNM [(i)TNM] and pathological TNM [pTNM] in staging of bronchogenic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 1997 Aug [citado 24 jul 2014];12(2):224-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288511>
- 64.-** Fernandes G, Sucena M, Lombardia E, Machado A, Hespanhol V, Queiroga H. [Non small cell lung cancer - comparison between clinical and pathological staging]. *Rev Port Pneumol* [Internet]. [citado 24 jul 2014];12(4):337-57. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16969567>
- 65.-** Fernando HC, Goldstraw P. The accuracy of clinical evaluative intrathoracic staging in lung cancer as assessed by postsurgical pathologic staging. *Cancer* [Internet]. 1990 Jun 1 [citado 24 jul 2014];65(11):2503-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2337866>
- 66.-** Maeda J, Inoue M, Okumura M, Ohta M, Minami M, Shiono H, et al. Detection of occult tumor cells in lymph nodes in non-small cell lung cancer patients using reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen mRNA with the evaluation of its sensitivity. *Lung Cancer*. 2006 May;52(2):235-40.
- 67.-** Rouvière H, Delmas A. Corazón y vasos del tronco. Nódulos linfáticos del tronco. Órganos torácicos. En: Rouvière H, Delmas A, editores. *Anatomía Humana Descriptiva, Topográfica y Funcional*. Décima edic. Barcelona: Masson SA; 1999. p. 216-29.
- 68.-** Riquet M. [Lung cancer and lymph drainage]. *Cancer Radiother* [Internet]. 2007 [citado 24 jul 2014];11(1-2):4-10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16928459>
- 69.-** Riquet M, Le Pimpec Barthes F. Curages ganglionnaires lors des exérèses pulmonaires pour cancer. *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Paris: Elsevier Masson SAS; 2010. p. 1-12.
- 70.-** Caplan I. Anatomical review of the lymph nodes of the human mediastinum. *Surg Radiol Anat* [Internet]. 1990 Apr [citado 25 jul 2014];12(1):9-18. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF02094120>
- 71.-** Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P, et al. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009;4(5):568-77.
- 72.-** Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* [Internet]. 1997 Jun [citado 25 jul 2014];111(6):1718-23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9187199>
- 73.-** Rusch VW, Crowley J, Giroux DJ, Goldstraw P, Im J-G, Tsuboi M, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2007 Jul [citado 25 jul 2014];2(7):603-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17607115>
- 74.-** Fréchette E, Deslauriers J. Surgical anatomy of the bronchial tree and pulmonary artery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2006 Jan [citado 25 jul 2014];18(2):77-84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17157224>

- 75.-** Riquet M, Manac'h D, Dupont P, Dujon A, Hidden G, Debesse B. Anatomic basis of lymphatic spread of lung carcinoma to the mediastinum: anatomo-clinical correlations. *Surg Radiol Anat* [Internet]. 1994 Jan [citado 28 jul 2014];16(3):229-38. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7863408>
- 76.-** Shields TW. Lymphatics of the Lungs. En: Shields TW, LoCicero J, Ponn RB, editores. *General Thoracic Surgery*. Sexta edic. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 74-90.
- 77.-** Macia I, Ramos R, Moya J, Rivas F, Ureña A, Banque M, et al. Survival of Patients with Non-Small Cell Lung Cancer According to Lymph Node Disease: Single pN1 vs Multiple pN1 vs Single Unsuspected pN2. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(7):2413-2418.
- 78.-** Detterbeck FC, Tanoue LT, Boffa DJ. Anatomy, biology and concepts, pertaining to lung cancer stage classification. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2009 Apr [citado 24 jul 2014];4(4):437-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333070>
- 79.-** De Leyn P, Dooms C, Kuzdzal J, Lardinois D, Passlick B, Rami-Porta R, et al. Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2014 May 1 [citado 31 may 2014];45(5):787-98. Disponible en: <http://ejcts.oxfordjournals.org.sire.ub.edu/content/45/5/787.abstract>
- 80.-** Obiols C, Call S, Rami-Porta R, Trujillo-Reyes JC, Saumench R, Iglesias M, et al. Survival of patients with unsuspected pN2 non-small cell lung cancer after an accurate preoperative mediastinal staging. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2014 Mar [citado 4 jun 2014];97(3):957-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24286635>
- 81.-** Gómez-Caro A, Boada M, Cabañas M, Sanchez M, Arguis P, Lomeña F, et al. False-negative rate after positron emission tomography/computer tomography scan for mediastinal staging in cI stage non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2012 Jul [citado 26 jul 2014];42(1):93-100; discussion 100. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290911>
- 82.-** 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;30(5):787-92.
- 83.-** Rami-Porta R, Wittekind C, Goldstraw P, Committee IA for the S of LC (IASLC) S. Complete resection in lung cancer surgery: proposed definition. *Lung Cancer*. 2005;49(1):25-33.
- 84.-** Hermanek P, Hutter R V, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. *Cancer* [Internet]. 1999 Dec 15 [citado 24 jul 2014];86(12):2668-73. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594862>
- 85.-** Herpel E, Muley T, Schneider T, Palm E, Kieslich de Hol D, Warth A, et al. A pragmatic approach to the diagnosis of nodal micrometastases in early stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2010 Aug [citado 24 jul 2014];5(8):1206-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581709>
- 86.-** Detterbeck FC, Postmus PE, Tanoue LT. The stage classification of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* [Internet]. 2013 May 1 [citado 10 jul 2014];143(5 Suppl):e191S-210S. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleID=1685290>
- 87.-** Howington JA, Blum MG, Chang AC, Balekian AA, Murthy SC. Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* [Internet]. American College of Chest Physicians; 2013 May 1 [citado 10 jul 2014];143(5 Suppl):e278S-313S. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleID=1685833>
- 88.-** Darling GE, Allen MS, Decker PA, Ballman K, Malthaner RA, Incullet RI, et al. Randomized trial of mediastinal lymph node sampling versus complete lymphadenectomy during pulmonary resection in the patient with N0 or N1 (less than hilar) non-small cell carci-

- noma: results of the American College of Surgery Oncology Group Z0030 Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011;141(3):662-70.
- 89.-** Ramnath N, Dilling TJ, Harris LJ, Kim AW, Michaud GC, Balekian AA, et al. Treatment of stage III non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* [Internet]. 2013 May 1 [citado 10 jul 2014];143(5 Suppl):e314S-40S. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleID=1685834>
- 90.-** Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* [Internet]. 2011 Feb [citado 11 jul 2014];12(2):175-80. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277552>
- 91.-** 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* [Internet]. 2012 Mar [citado 27 jul 2014];13(3):239-46. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22285168>
- 92.-** Shaw AT, Kim D-W, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn M-J, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Jun 20 [citado 10 jul 2014];368(25):2385-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23724913>
- 93.-** Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Oct 28 [citado 9 jul 2014];363(18):1693-703. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3014291&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 94.-** Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinó L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Jul 9 [citado 2 jun 2015];373(2):123-35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26028407>
- 95.-** Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2015 Sep 27 [citado 29 sep 2015];373(17):1627-39. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26412456>
- 96.-** Sawyer TE, Bonner JA, Gould PM, Foote RL, Deschamps C, Lange CM, et al. Factors predicting patterns of recurrence after resection of N1 non-small cell lung carcinoma. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 1999 Oct [citado 28 jul 2014];68(4):1171-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543475>
- 97.-** Thomas P, Rubinstein L. Cancer recurrence after resection: T1 N0 non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Study Group. Ann Thorac Surg* [Internet]. 1990 Feb [citado 28 jul 2014];49(2):242-6; discussion 246-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2154958>
- 98.-** Raz DJ, Zell JA, Ou S-HI, Gandara DR, Anton-Culver H, Jablons DM. Natural history of stage I non-small cell lung cancer: implications for early detection. *Chest* [Internet]. 2007 Jul [citado 27 jul 2014];132(1):193-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505036>
- 99.-** Rami-Porta R, Ball D, Crowley J, Giroux DJ, Jett J, Travis WD, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the T descriptors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2007 Jul [citado 28 jul 2014];2(7):593-602. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17607114>
- 100.-** Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2007 Aug [citado 28 jul 2014];2(8):694-705. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762335>

- 101.-** Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4 [citado 9 jul 2014];144(5):646-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
- 102.-** Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* [Internet]. 2004 Aug [citado 11 jul 2014];10(8):789-99. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286780>
- 103.-** Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2008 Mar 13 [citado 15 jul 2014];358(11):1148-59. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337604>
- 104.-** Inconato M, Urso L, Portela A, Laukkanen MO, Soini Y, Quintavalle C, et al. Epigenetic regulation of miR-212 expression in lung cancer. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 15 [citado 15 jul 2014];6(11):e27722. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027722>
- 105.-** Nadal E, Chen G, Gallegos M, Lin L, Ferrer-Torres D, Truini A, et al. Epigenetic inactivation of microRNA-34b/c predicts poor disease-free survival in early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 Dec 15 [citado 2 ago 2014];19(24):6842-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24130071>
- 106.-** Tejero R, Navarro A, Campayo M, Viñolas N, Marrades RM, Cordeiro A, et al. miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 8 [citado 30 nov 2015];9(7):e101899. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4087018&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 107.-** Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2009 Nov [citado 30 nov 2015];30(11):1903-9. Disponible en: <http://www.carcin.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgp219>
- 108.-** Sholl LM, Barletta JA, Yeap BY, Chirieac LR, Hornick JL. Sox2 protein expression is an independent poor prognostic indicator in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1193-8.
- 109.-** Yang C-Y, Lin M-W, Chang Y-L, Wu C-T, Yang P-C. Programmed cell death-ligand 1 expression in surgically resected stage I pulmonary adenocarcinoma and its correlation with driver mutations and clinical outcomes. *Eur J Cancer* [Internet]. 2014 May [citado 13 jul 2014];50(7):1361-9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804914000914>
- 110.-** Kohno T, Nakaoku T, Tsuta K, Tsuchihara K, Matsumoto S, Yoh K, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Translational Lung Cancer Research* [Internet]. 2015 Apr [citado 26 may 2015];4(2):156-64. Disponible en: <http://www.tlcr.org/article/view/3750/4384>
- 111.-** Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, Sanchez JJ, et al. BRCA1: a novel prognostic factor in resected non-small-cell lung cancer. *PLoS One*. 2007 Nov 7;2(11):e1129.
- 112.-** Guilleminault L, Carmier D, Heuzé-Vourc'h N, Diot P, Pichon E. [Immunotherapy in non-small cell lung cancer: inhibition of PD1/PDL1 pathway]. *Rev Pneumol Clin* [Internet]. 2015 Feb [citado 17 nov 2015];71(1):44-56. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25687821>
- 113.-** Coate LE, John T, Tsao M-S, Shepherd FA. Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol* [Internet]. 2009 Oct [citado 3 ago 2014];10(10):1001-10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796752>
- 114.-** D'Amico TA, Massey M, Herndon 2nd JE, Moore MB, Harpole Jr DH. A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use of ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999;117(4):736-43.
- 115.-** D'Amico TA, Brooks KR, Joshi MB, Conlon D, Herndon 2nd J, Petersen RP, et al. Serum protein expression predicts recurrence in patients with early-stage lung cancer after resection. *Ann Thorac Surg*. 2006;81(6):1982-7; discussion 1987.

- 116.-** Buccheri G, Ferrigno D. Serum biomarkers facilitate the recognition of early- stage cancer and may guide the selection of surgical candidates: a study of carcinoembryonic antigen and tissue polypeptide antigen in patients with operable non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;122(5):891-9.
- 117.-** Hu Z, Lin D, Yuan J, Xiao T, Zhang H, Sun W, et al. Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(13):4646-52.
- 118.-** Yamamoto O, Takahashi H, Hirasawa M, Chiba H, Shiratori M, Kuroki Y, et al. Surfactant protein gene expressions for detection of lung carcinoma cells in peripheral blood. *Respir Med*. 2005;99(9):1164-74.
- 119.-** Cheng TL, Chang MY, Huang SY, Sheu CC, Kao EL, Cheng YJ, et al. Overexpression of circulating c-met messenger RNA is significantly correlated with nodal stage and early recurrence in non-small cell lung cancer. *Chest*. 2005;128(3):1453-60.
- 120.-** Tamura M, Oda M, Tsunozuka Y, Matsumoto I, Kawakami K, Ohta Y, et al. Chest CT and serum vascular endothelial growth factor-C level to diagnose lymph node metastasis in patients with primary non-small cell lung cancer. *Chest*. 2004;126(2):342-6.
- 121.-** Alegre MM, Weyant MJ, Bennett DT, Yu JA, Ramsden MK, Elnaggar A, et al. Serum detection of thymidine kinase 1 as a means of early detection of lung cancer. *Anticancer Res [Internet]*. 2014 May [citado 31 jul 2014];34(5):2145-51. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778016>
- 122.-** Warnecke-Eberz U, Bollschweiler E, Drebber U, Pohl A, Baldus SE, Hoelscher AH, et al. Frequent down-regulation of pim-1 mRNA expression in non-small cell lung cancer is associated with lymph node metastases. *Oncol Rep*. 2008 Sep;20(3):619-24.
- 123.-** Wang Q, Hu D, Rui Y, Jiang A, Liu Z, Huang L. Prognosis value of HIF-1 α expression in patients with non-small cell lung cancer. *Gene [Internet]*. 2014 May 15 [citado 11 jul 2014];541(2):69-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631267>
- 124.-** Minamiya Y, Kawai H, Saito H, Ito M, Hosono Y, Motoyama S, et al. REG1A expression is an independent factor predictive of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer [Internet]*. 2008 Apr [citado 24 may 2015];60(1):98-104. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964685>
- 125.-** Yamashita S, Chujo M, Moroga T, Anami K, Tokuisi K, Miyawaki M, et al. DYRK2 expression may be a predictive marker for chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res [Internet]*. 2009 Jul 1 [citado 24 may 2015];29(7):2753-7. Disponible en: <http://ar.iiarjournals.org/content/29/7/2753.abstract>
- 126.-** Yamashita S, Chujo M, Tokuisi K, Anami K, Miyawaki M, Yamamoto S, et al. Expression of dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) can be a favorable prognostic marker in pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg [Internet]*. 2009 Dec 12 [citado 24 may 2015];138(6):1303-8. Disponible en: <http://www.jtcvsonline.org/article/S0022522309010502/fulltext>
- 127.-** Rosell R, Bivona TG, Karachaliou N. Genetics and biomarkers in personalisation of lung cancer treatment. *Lancet [Internet]*. 2013 Aug 24 [citado 27 jul 2014];382(9893):720-31. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673613617158>
- 128.-** Nana-Sinkam SP, Powell CA. Molecular biology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest [Internet]*. 2013 May 1 [citado 10 jul 2014];143(5 Suppl):e30S-9S. Disponible en: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleID=1682710>
- 129.-** Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature [Internet]*. 2008 Oct 23 [citado 11 jul 2014];455(7216):1069-75. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- 130.- Peters S, Zimmermann S. Targeted therapy in NSCLC driven by HER2 insertions. *Transl lung cancer Res.* 2014;3(2):84-8.
- 131.- Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 [citado 11 jul 2014];371(21):1963-71. Disponible en: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1406766>
- 132.- Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news en the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2009 Oct 22 [citado 15 jul 2014];9(10):701-13. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19693097>
- 133.- Molina-Vila MA, Bertran-Alamillo J, Gasco A, Mayo-de-las-Casas C, Sanchez-Ronco M, Pu-jantell-Pastor L, et al. Nondisruptive p53 Mutations Are Associated with Shorter Survival in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 Sep 1 [citado 22 nov 2014];20(17):4647-59. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24696321>
- 134.- Borczuk AC, Gorenstein L, Walter KL, Assaad AA, Wang L, Powell CA. Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. *Am J Pathol* [Internet]. 2003 Nov [citado 3 ago 2014];163(5):1949-60. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1892411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 135.- Bonner AE, Lemon WJ, Devereux TR, Lubet RA, You M. Molecular profiling of mouse lung tumors: association with tumor progression, lung development, and human lung adenocarcinomas. *Oncogene* [Internet]. 2004 Feb 5 [citado 3 ago 2014];23(5):1166-76. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647414>
- 136.- Navarro A, Marrades RM, Viñolas N, Quera A, Agustí C, Huerta A, et al. MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology.* 2009;76(3):162-9.
- 137.- Navarro A, Tejero R, Viñolas N, Cordeiro A, Marrades RM, Fuster D, et al. The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Oct 13 [citado 20 nov 2015];6(31):31544-56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.3003>.
- 138.- Navarro A, Monzo M. MicroRNAs in human embryonic and cancer stem cells. *Yonsei Med J* [Internet]. 2010 Sep [citado 20 nov 2015];51(5):622-32. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2908867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 139.- Liu H, Kho AT, Kohane IS, Sun Y. Predicting survival within the lung cancer histopathological hierarchy using a multi-scale genomic model of development. *PLoS Med* [Internet]. 2006 Jul [citado 19 jul 2014];3(7):e232. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1483910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 140.- Kim CFB, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* [Internet]. 2005 Jun 17 [citado 14 jul 2014];121(6):823-35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15960971>
- 141.- Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2012 May [citado 20 jul 2014];76(2):138-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22153832>
- 142.- Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, et al. Prognostic significance of perioperative serum carcinoembryonic antigen in non-small cell lung cancer: analysis of 1,000 consecutive resections for clinical stage I disease. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(1):216-21.
- 143.- Tomita M, Shimizu T, Ayabe T, Yonei A, Onitsuka T. Prognostic significance of tumour marker index based on preoperative CEA and CYFRA 21-1 in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* [Internet]. 2010 Jul [citado 31 may 2015];30(7):3099-102. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20683062>

- 144.-** D'Cunha J, Corfits AL, Herndon 2nd JE, Kern JA, Kohman LJ, Patterson GA, et al. Molecular staging of lung cancer: real-time polymerase chain reaction estimation of lymph node micrometastatic tumor cell burden in stage I non-small cell lung cancer--preliminary results of Cancer and Leukemia Group B Trial 9761. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123(3):484-91; discussion 491.
- 145.-** Bugalho A, Martins C, Dias SS, Nunes G, Silva Z, Correia M, et al. Cytokeratin 19, carcinoembryonic antigen, and epithelial cell adhesion molecule detect lung cancer lymph node metastasis in endobronchial ultrasound-guided transbronchial aspiration samples. *Clin Lung Cancer [Internet].* 2013 Dec [citado 31 jul 2014];14(6):704-12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886796>
- 146.-** Marek L, Ware KE, Fritzsche A, Hercule P, Helton WR, Smith JE, et al. Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF Receptor-Mediated Autocrine Signaling in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Mol Pharmacol [Internet].* 2009 Jan 1 [citado 15 may 2013];75(1):196-207. Disponível em: <http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.108.049544>
- 147.-** 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;2(62):62ra93.
- 148.-** Pros E, Lantuejoul S, Sanchez-Verde L, Castillo SD, Bonastre E, Suarez-Gauthier A, et al. Determining the profiles and parameters for gene amplification testing of growth factor receptors in lung cancer. *Int J Cancer [Internet].* 2013 Aug 15 [citado 22 sep 2014];133(4):898-907. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23400671>
- 149.-** Malchers F, Dietlein F, Schöttle J, Lu X, Nogova L, Albus K, et al. Cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms of transformation by amplified FGFR1 in lung cancer. *Cancer Discov [Internet].* 2014 Feb [citado 23 nov 2014];4(2):246-57. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24302556>
- 150.-** Göke F, Franzen A, Menon R, Goltz D, Kirsten R, Boehm D, et al. Rationale for treatment of metastatic squamous cell carcinoma of the lung using fibroblast growth factor receptor inhibitors. *Chest [Internet].* 2012 Oct [citado 2014 Aug 3];142(4):1020-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22499828>
- 151.-** Wynes MW, Hinz TK, Gao D, Martini M, Marek LA, Ware KE, et al. FGFR1 mRNA and protein expression, not gene copy number, predict FGFR TKI sensitivity across all lung cancer histologies. *Clin Cancer Res [Internet].* 2014 Jun 15 [citado 3 ago 2014];20(12):3299-309. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24771645>
- 152.-** Gozgit JM, Wong MJ, Moran L, Wardwell S, Moheemad QK, Narasimhan NI, et al. Ponatinib (AP24534), a multitargeted pan-FGFR inhibitor with activity in multiple FGFR-amplified or mutated cancer models. *Mol Cancer Ther [Internet].* 2012 Mar [citado 22 jul 2014];11(3):690-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238366>
- 153.-** Kim HS, Mitsudomi T, Soo RA, Cho BC. Personalized therapy on the horizon for squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer [Internet].* 2013 Jun [citado 5 ago 2014];80(3):249-55. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489560>
- 154.-** Behrens C, Lin HY, Lee JJ, Raso MG, Hong WK, Wistuba II, et al. Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer. *Clin Cancer Res [Internet].* 2008 Oct 1 [citado 23 nov 2014];14(19):6014-22. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18829480>
- 155.-** Ota S, Zhou Z-Q, Link JM, Hurlin PJ. The role of senescence and prosurvival signaling in controlling the oncogenic activity of FGFR2 mutants associated with cancer and birth defects. *Hum Mol Genet [Internet].* 2009 Jul 15 [citado 23 nov 2014];18(14):2609-21. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2701333&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 156.-** Chen Y, McGee J, Chen X, Doman TN, Gong X, Zhang Y, et al. Identification of druggable cancer driver genes amplified across TCGA datasets. *PLoS One [Internet].* 2014 Jan [citado 31 jul 2014];9(5):e98293. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4038530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- 157.- Zhang L, Xiao H, Zhou H, Santiago S, Lee JM, Garon EB, et al. Development of transcriptomic biomarker signature in human saliva to detect lung cancer. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2012 Oct [citado 3 ago 2014];69(19):3341-50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22689099>
- 158.- Sato T, Gotoh N. The FRS2 family of docking/scaffolding adaptor proteins as therapeutic targets of cancer treatment. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2009 Jun [citado 3 ago 2014];13(6):689-700. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19456272>
- 159.- Wu Y-M, Su F, Kalyana-Sundaram S, Khazanov N, Ateeq B, Cao X, et al. Identification of Targetable FGFR Gene Fusions in Diverse Cancers. *Cancer Discov* [Internet]. 2013 [citado 3 ago 2014];3(6):636-47. Disponible en: <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2159-8290.CD-13-0050>
- 160.- de Cássia S Alves R, Meurer RT, Roehe AV. MYC amplification is associated with poor survival in small cell lung cancer: a chromogenic in situ hybridization study. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2014 Jul 11 [citado 26 jul 2014]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25012251>
- 161.- Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, et al. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* [Internet]. 2014 Jul 9 [citado 9 jul 2014];511(7511):543-50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25079552>
- 162.- Iwakawa R, Takenaka M, Kohno T, Shimada Y, Totoki Y, Shibata T, et al. Genome-wide identification of genes with amplification and/or fusion in small cell lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. 2013 Sep [citado 2014 Nov 23];52(9):802-16. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3806277&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 163.- Romero OA, Sanchez-Cespedes M. The SWI/SNF genetic blockade: effects in cell differentiation, cancer and developmental diseases. *Oncogene* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014 May 22 [citado 3 nov 2014];33(21):2681-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23752187>
- 164.- Romero OA, Setien F, John S, Gimenez-Xavier P, Gómez-López G, Pisano D, et al. The tumour suppressor and chromatin-remodelling factor BRG1 antagonizes Myc activity and promotes cell differentiation in human cancer. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2012 Jul [citado 30 jul 2014];4(7):603-16. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3407948&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 165.- Hoang CD, Guillaume TJ, Engel SC, Tawfic SH, Kratzke RA, Maddaus MA. Analysis of paired primary lung and lymph node tumor cells: a model of metastatic potential by multiple genetic programs. *Cancer Detect Prev* [Internet]. 2005 Jan [citado 2 ago 2014];29(6):509-17. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289389>
- 166.- Seo AN, Yang JM, Kim H, Jheon S, Kim K, Lee CT, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of c-MYC copy number gain in lung adenocarcinomas. *Br J Cancer* [Internet]. 2014 May 27 [citado 5 ago 2014];110(11):2688-99. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24809777>
- 167.- Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F, et al. Prognostic Significance of OCT4 Expression in Adenocarcinoma of the Lung. *Jpn J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Oct 1 [citado 5 ago 2014];40(10):961-6. Disponible en: <http://jjco.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jjco/hyq066>
- 168.- Li R, Todd NW, Qiu Q, Fan T, Zhao RY, Rodgers WH, et al. Genetic deletions in sputum as diagnostic markers for early detection of stage I non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Jan 15 [citado 5 ago 2014];13(2 Pt 1):482-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255269>
- 169.- Kim T-M, Yim S-H, Lee J-S, Kwon M-S, Ryu J-W, Kang H-M, et al. Genome-wide screening of genomic alterations and their clinicopathologic implications in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2005 Dec 1 [citado 5 ago 2014];11(23):8235-42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322280>

- 170.-** Zhang X, Zheng B, Han B, Huang J, Geng Q, Xu H, et al. Lung adenocarcinoma stem cell phenotypes and their correlation with patient prognosis. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* [Internet]. 2009 Nov [citado 5 ago 2014];31(11):836-40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20137348>
- 171.-** Chen Y, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Ye F, Petersen I. 5-Bromodeoxyuridine induced differentiation of a human small cell lung cancer cell line is associated with alteration of gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2007 Feb 16 [citado 5 ago 2014];353(3):559-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17196172>
- 172.-** Gialmanidis IP, Bravou V, Amanetopoulou SG, Varakis J, Kourea H, Papadaki H. Overexpression of hedgehog pathway molecules and FOXM1 in non-small cell lung carcinomas. *Lung Cancer* [Internet]. 2009 Oct [citado 4 ago 2014];66(1):64-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200615>
- 173.-** Hong Z, Bi A, Chen D, Gao L, Yin Z, Luo L. Activation of Hedgehog Signaling Pathway in Human Non-small Cell Lung Cancers. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2014 Apr 9 [citado 4 ago 2014]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24710823>
- 174.-** Yue D, Li H, Che J, Zhang Y, Tseng H-HK, Jin JQ, et al. Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2014 Jan [citado 4 ago 2014];33:34. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4029998&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 175.-** Raz G, Allen KE, Kingsley C, Cherni I, Arora S, Watanabe A, et al. Hedgehog signaling pathway molecules and ALDH1A1 expression in early-stage non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* [Internet]. 2012 May [citado 2014 Jul 19];76(2):191-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115706>
- 176.-** Bermudez O, Hennen E, Koch I, Lindner M, Eickelberg O. Gli1 mediates lung cancer cell proliferation and Sonic Hedgehog-dependent mesenchymal cell activation. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [citado 4 ago 2014];8(5):e63226. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3646741&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 177.-** Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med* [Internet]. 2009 Sep [citado 1 ago 2014];9(7):873-86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19860666>
- 178.-** Tang C, Zhou X, Yang H, Wang Q, Zhang R. Expression and its clinical significance of SHP2 in non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2010;13(2):98-101.
- 179.-** Tang C, Luo D, Yang H, Wang Q, Zhang R, Liu G, et al. Expression of SHP2 and related markers in non-small cell lung cancer: a tissue microarray study of 80 cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Internet]. 2013 Oct [citado 3 ago 2014];21(5):386-94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343958>
- 180.-** Karachaliou N, Rosell R. Systemic treatment in EGFR-ALK NSCLC patients: second line therapy and beyond. *Cancer Biol Med* [Internet]. 2014 Sep [citado 20 nov 2014];11(3):173-81. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4197428&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 181.-** Lazzara MJ, Lane K, Chan R, Jasper PJ, Michael B, Sorger PK, et al. Impaired Shp2-mediated ERK activation contributes to gefitinib sensitivity of lung cancer cells with EGFR-activating mutations. *Cancer Res*. 2010;70(9):3843-50.
- 182.-** Sithanandam G, Smith GT, Fields JR, Anderson LM. Alternate paths en epidermal growth factor receptor to Akt in malignant versus nontransformed lung epithelial cells: ErbB3 versus Gab1. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(5):490-9.
- 183.-** Yin D, Jia Y, Yu Y, Brock M V, Herman JG, Han C, et al. SOX17 methylation inhibits its antagonism of Wnt signaling pathway in lung cancer. *Discov Med* [Internet]. 2012 Jul [citado 5 ago 2014];14(74):33-40. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4061568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- 184.- Karachaliou N, Rosell R, Molina MA, Viteri S. Predicting resistance by selection of signaling pathways. *Transl Lung Cancer Res* [Internet]. 2014 [citado 6 ago 2014];3(2):107-15. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4367662&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 185.- Yu B, Liu W, Yu W-M, Loh ML, Alter S, Guvench O, et al. Targeting protein tyrosine phosphatase SHP2 for the treatment of PTPN11-associated malignancies. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2013 Sep [citado 5 dic 2015];12(9):1738-48. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3769526&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 186.- Inoue M, Minami M, Shiono H, Sawabata N, Ideguchi K, Okumura M. Clinicopathologic study of resected, peripheral, small-sized, non-small cell lung cancer tumors of 2 cm or less in diameter: pleural invasion and increase of serum carcinoembryonic antigen level as predictors of nodal involvement. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2006 May [citado 31 jul 2014];131(5):988-93. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678580>
- 187.- Yamazaki M, Ishikawa H, Kunii R, Tasaki A, Sato S, Ikeda Y, et al. Relationship between CT features and high preoperative serum carcinoembryonic antigen levels in early-stage lung adenocarcinoma. *Clin Radiol* [Internet]. 2014 Jul [citado 31 jul 2014];69(6):559-66. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625689>
- 188.- Kaneda M, Tarukawa T, Watanabe F, Adachi K, Sakai T, Nakabayashi H. Clinical features of primary lung cancer adjoining pulmonary bulla. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* [Internet]. 2010 Jul 1 [citado 31 jul 2014];10(6):940-4. Disponible en: <http://icvts.oxfordjournals.org/content/10/6/940>
- 189.- Ince TA, Richardson AL, Bell GW, Saitoh M, Godar S, Karnoub AE, et al. Transformation of different human breast epithelial cell types leads to distinct tumor phenotypes. *Cancer Cell*. 2007;12(2):160-70.
- 190.- Grose R, Dickson C. Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(2):179-86.
- 191.- Gatiús S, Velasco A, Azueta A, Santacana M, Pallares J, Valls J, et al. FGFR2 alterations in endometrial carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. 2011 Nov [citado 15 nov 2015];24(11):1500-10. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.2011.110>
- 192.- Díez de Medina SG, Chopin D, El Marjou A, Delouvé A, LaRochelle WJ, Hoznek A, et al. Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional cell bladder carcinomas. *Oncogene* [Internet]. 1997 Jan 23 [citado 3 ago 2014];14(3):323-30. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9018118>
- 193.- Wang H, Wang W, Wang X, Cai K, Wu H, Ju Q, et al. Reduced N-Myc downstream-regulated gene 2 expression is associated with CD24 upregulation and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Med Oncol* [Internet]. 2012 Dec [citado 5 ago 2014];29(5):3162-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528516>
- 194.- Pession A, Tonelli R. The MYCN oncogene as a specific and selective drug target for peripheral and central nervous system tumors. *Curr Cancer Drug Targets* [Internet]. 2005 Jun [citado 5 ago 2014];5(4):273-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15975048>
- 195.- Rapp UR, Korn C, Ceteci F, Karreman C, Luetkenhaus K, Serafin V, et al. MYC is a metastasis gene for non-small-cell lung cancer. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jan [citado 20 jul 2014];4(6):e6029. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0006029>
- 196.- Castillo SD, Sanchez-Cespedes M. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(9):903-19.
- 197.- Mainardi S, Mijimolle N, Francoz S, Vicente-Dueñas C, Sánchez-García I, Barbacid M. Identification of cancer initiating cells in K-Ras driven lung adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Jan 7 [citado 30 jul 2014];111(1):255-60. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3890787&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- 198.-** Sin D, Tammemagi CM, Lam S, Barnett MJ, Duan X, Tam A, et al. Pro-surfactant protein B as a biomarker for lung cancer prediction. *J Clin Oncol.* 2013;31(36):4536-43.
- 199.-** Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Kanauchi N, Endoh M, Sadahiro M, et al. Promoter hypermethylation of RASSF1A and RUNX3 genes as an independent prognostic prediction marker in surgically resected non-small cell lung cancers. *Lung Cancer.* 2007 Oct;58(1):131-8.
- 200.-** Kontic M, Stojisic J, Jovanovic D, Bunjevacki V, Ognjanovic S, Kuriger J, et al. Aberrant promoter methylation of CDH13 and MGMT genes is associated with clinicopathologic characteristics of primary non-small-cell lung carcinoma. *Clin Lung Cancer.* 2012;13(4):297-303.
- 201.-** de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, et al. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res.* 2012;18(10):2976-86.
- 202.-** Buckingham L, Penfield Faber L, Kim A, Liptay M, Barger C, Basu S, et al. PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II non-small cell lung cancer patients. *Int J Cancer.* 2010;126(7):1630-9.
- 203.-** Toyooka S, Suzuki M, Maruyama R, Toyooka KO, Tsukuda K, Fukuyama Y, et al. The relationship between aberrant methylation and survival in non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer.* 2004;91(4):771-4.
- 204.-** Harden S V, Tokumaru Y, Westra WH, Goodman S, Ahrendt SA, Yang SC, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9(4):1370-5.
- 205.-** Brock M V, Hooker CM, Ota-Machida E, Han Y, Guo M, Ames S, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med [Internet].* 2008 Mar 13 [citado 10 mar 2010];358(11):1118-28.
- 206.-** Pesek M, Kopeckova M, Benesova L, Meszarosova A, Mukensnabl P, Bruha F, et al. Clinical significance of hypermethylation status in NSCLC: evaluation of a 30-gene panel in patients with advanced disease. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4647-52.
- 207.-** Ota N, Kawakami K, Okuda T, Takehara A, Hiranuma C, Oyama K, et al. Prognostic significance of p16(INK4a) hypermethylation in non-small cell lung cancer is evident by quantitative DNA methylation analysis. *Anticancer Res.* 2006;26(5B):3729-32.
- 208.-** Kim DS, Kim MJ, Lee JY, Kim YZ, Kim EJ, Park JY. Aberrant methylation of E-cadherin and H-cadherin genes in nonsmall cell lung cancer and its relation to clinicopathologic features. *Cancer.* 2007;110(12):2785-92.
- 209.-** Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T. Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Sci.* 2003 Jul;94(7):589-92.
- 210.-** Vaissiere T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V, et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res.* 2009;69(1):243-52.
- 211.-** Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res [Internet].* 2006 Mar [citado 14 jul 2014];16(3):383-93. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1415217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 212.-** Nadal E, Zhong J, Lin J, Reddy RM, Ramnath N, Orringer MB, et al. A MicroRNA cluster at 14q32 drives aggressive lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res [Internet].* 2014 Jun 15 [citado 2 ago 2014];20(12):3107-17. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24833665>
- 213.-** Duncavage E, Goodgame B, Sezhiyan A, Govindan R, Pfeifer J. Use of microRNA expression levels to predict outcomes in resected stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol [Internet].* 2010 Nov [citado 2 ago 2014];5(11):1755-63. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20975375>

- 214.-** Tan X, Qin W, Zhang L, Hang J, Li B, Zhang C, et al. A 5-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Nov 1 [citado 16 jul 2014];17(21):6802-11. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21890451>
- 215.-** Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2010 Jan 15 [citado 6 dic 2015];16(2):430-41. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3163170&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 216.-** Lu Y, Govindan R, Wang L, Liu PY, Goodgame B, Wen W, et al. MicroRNA profiling and prediction of recurrence/relapse-free survival in stage I lung cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2012 May [citado 3 ago 2014];33(5):1046-54. Disponible en: <http://www.carcin.oxford-journals.org/cgi/doi/10.1093/carcin/bgs100>
- 217.-** Drilon A, Rekhman N, Ladanyi M, Paik P. Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *Lancet Oncol* [Internet]. 2012 Oct [citado 3 ago 2014];13(10):e418-26. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026827>
- 218.-** Serizawa M, Koh Y, Kenmotsu H, Isaka M, Murakami H, Akamatsu H, et al. Assessment of mutational profile of Japanese lung adenocarcinoma patients by multitarget assays: a prospective, single-institute study. *Cancer* [Internet]. 2014 May 15 [citado 3 ago 2014];120(10):1471-81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24700479>
- 219.-** Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* [Internet]. 2012 Sep 27 [citado 11 jul 2014];489(7417):519-25. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3466113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 220.-** Zhu C-Q, Ding K, Strumpf D, Weir BA, Meyerson M, Pennell N, et al. Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Oct 10 [citado 28 jul 2014];28(29):4417-24. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2988634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 221.-** Hoang CD, D'Cunha J, Tawfic SH, Gruessner AC, Kratzke RA, Maddaus MA. Expression profiling of non-small cell lung carcinoma identifies metastatic genotypes based on lymph node tumor burden. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2004 May [citado 2 ago 2014];127(5):1332-41; discussion 1342. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022522303021172>
- 222.-** Lee E-S, Son D-S, Kim S-H, Lee J, Jo J, Han J, et al. Prediction of recurrence-free survival in postoperative non-small cell lung cancer patients by using an integrated model of clinical information and gene expression. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 Nov 15 [citado 5 nov 2014];14(22):7397-404. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010856>
- 223.-** Chen H-Y, Yu S-L, Chen C-H, Chang G-C, Chen C-Y, Yuan A, et al. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Jan 4 [citado 2 ago 2014];356(1):11-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202451>
- 224.-** Sanmartín E, Sirera R, Usó M, Blasco A, Gallach S, Figueroa S, et al. A Gene Signature Combining the Tissue Expression of Three Angiogenic Factors is a Prognostic Marker in Early-stage Non-small Cell Lung Cancer. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2014 Feb [citado 2 mar 2014];21(2):612-20. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145997>
- 225.-** Kratz JR, He J, Van Den Eeden SK, Zhu Z-H, Gao W, Pham PT, et al. A practical molecular assay to predict survival in resected non-squamous, non-small-cell lung cancer: development and international validation studies. *Lancet* [Internet]. 2012 Mar 3 [citado 21 oct 2014];379(9818):823-32. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3294002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 226.-** Kratz JR, Van den Eeden SK, He J, Jablons DM, Mann MJ. A prognostic assay to identify patients at high risk of mortality despite small, node-negative lung tumors. *JAMA* [Internet]. 2012 Oct 24 [citado 2 ago 2014];308(16):1629-31. Disponible en: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=1386606>

- 227.-** Tsao M-S, Jablons DM. Molecular prognostication of non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2013 Jan [citado 31 jul 2014];25(1):4-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800523>
- 228.-** Kratz JR, Jablons DM. Genomic prognostic models in early-stage lung cancer. *Clin Lung Cancer* [Internet]. 2009 May [citado 1 ago 2014];10(3):151-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443334>
- 229.-** Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Iwakawa R, et al. Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res* [Internet]. 2012 Jan 1 [citado 1 ago 2014];72(1):100-11. Disponible en: dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1403
- 230.-** Hou J, Aerts J, den Hamer B, van Ijcken W, den Bakker M, Riegman P, et al. Gene expression-based classification of non-small cell lung carcinomas and survival prediction. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jan [citado 11 nov 2014];5(4):e10312. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2858668&tool=pmcentrez&render-type=abstract>
- 231.-** Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Sanchez JJ, Mendez P, Rzyman W, et al. Three-gene expression signature predicts survival in early-stage squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2008 Aug 1 [citado 12 ago 2014];14(15):4794-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18676750>
- 232.-** Shedden K, Taylor JMG, Enkemann SA, Tsao M-S, Yeatman TJ, Gerald WL, et al. Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. *Nat Med* [Internet]. 2008 Aug [citado 22 jul 2014];14(8):822-7. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2667337&tool=pmcentrez&render-type=abstract>
- 233.-** Lau SK, Boutros PC, Pintilie M, Blackhall FH, Zhu C-Q, Strumpf D, et al. Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2007 Dec 10 [citado 2 ago 2014];25(35):5562-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18065728>
- 234.-** Bianchi F, Nuciforo P, Vecchi M, Bernard L, Tizzoni L, Marchetti A, et al. Survival prediction of stage I lung adenocarcinomas by expression of 10 genes. *J Clin Invest* [Internet]. 2007 Nov [citado 2 ago 2014];117(11):3436-44. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2030461&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 235.-** Potti A, Mukherjee S, Petersen R, Dressman HK, Bild A, Koontz J, et al. A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Aug 10 [citado 2 ago 2014];355(6):570-80. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899777>
- 236.-** Lu Y, Lemon W, Liu P-Y, Yi Y, Morrison C, Yang P, et al. A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med* [Internet]. 2006 Dec [citado 2 ago 2014];3(12):e467. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1716187&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 237.-** Raponi M, Zhang Y, Yu J, Chen G, Lee G, Taylor JMG, et al. Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Aug 1 [citado 1 ago 2014];66(15):7466-72. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16885343>
- 238.-** Blackhall FH, Wigle DA, Jurisica I, Pintilie M, Liu N, Darling G, et al. Validating the prognostic value of marker genes derived in a non-small cell lung cancer microarray study. *Lung Cancer* [Internet]. 2004 Nov [citado 12 dic 2014];46(2):197-204. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474668>
- 239.-** Tomida S, Koshikawa K, Yatabe Y, Harano T, Ogura N, Mitsudomi T, et al. Gene expression-based, individualized outcome prediction for surgically treated lung cancer patients. *Oncogene* [Internet]. 2004 Jul 8 [citado 12 dic 2014];23(31):5360-70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064725>

- 240.-** Beer DG, Kardia SLR, Huang C-C, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* [Internet]. 2002 Aug [citado 1 ago 2014];8(8):816-24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12118244>
- 241.-** Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Nov 20 [citado 1 ago 2014];98(24):13790-5. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=61120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 242.-** Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, Petersen S, Thaesler Z, Pacyna-Gengelbach M, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Nov 20 [citado 13 dic 2014];98(24):13784-9. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=61119&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 243.-** Sandoval J, Mendez-Gonzalez J, Nadal E, Chen G, Carmona FJ, Sayols S, et al. A prognostic DNA methylation signature for stage I non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2013 Nov 10 [citado 1 ago 2014];31(32):4140-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24081945>
- 244.-** Kubuschok B, Passlick B, Izbicki JR, Thetter O, Pantel K. Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 1999 Jan [citado 31 jul 2014];17(1):19-24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10458213>
- 245.-** Wu J, Ohta Y, Minato H, Tsunozuka Y, Oda M, Watanabe Y, et al. Nodal Occult Metastasis in Patients With Peripheral Lung Adenocarcinoma of 2.0 cm or less in diameter. *Ann Thorac Surg*. 2001;71(6):1772-7; discussion 1777-8.
- 246.-** Marchevsky AM, Qiao JH, Krajisnik S, Mirocha JM, McKenna RJ. The prognostic significance of intranodal isolated tumor cells and micrometastases in patients with non-small cell carcinoma of the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2003 Aug [citado 31 jul 2014];126(2):551-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12928657>
- 247.-** Maruyama R, Sugio K, Mitsudomi T, Saitoh G, Ishida T, Sugimachi K. Relationship between early recurrence and micrometastases in the lymph nodes of patients with stage I non-small-cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 1997 Oct [citado 5 dic 2015];114(4):535-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9338638>
- 248.-** Zhang W, Pal SK, Liu X, Yang C, Allahabadi S, Bhanji S, et al. Myeloid Clusters Are Associated with a Pro-Metastatic Environment and Poor Prognosis in Smoking-Related Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013 May 24 [citado 10 may 2014];8(5):e65121. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0065121>
- 249.-** Saintigny P, Coulon S, Kambouchner M, Ricci S, Martinot E, Danel C, et al. Real-time RT-PCR detection of CK19, CK7 and MUC1 mRNA for diagnosis of lymph node micrometastases in non small cell lung carcinoma. *Int J Cancer*. 2005;115(5):777-82.
- 250.-** Wang XT, Sielen W, Eggeling S, Ludwig C, Stoelben E, Mueller J, et al. Detection of disseminated tumor cells in mediastinoscopic lymph node biopsies and lymphadenectomy specimens of patients with NSCLC by quantitative RT-PCR. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;28(1):26-32.
- 251.-** Nordgård O, Singh G, Solberg S, Jørgensen L, Halvorsen AR, Smaaland R, et al. Novel molecular tumor cell markers in regional lymph nodes and blood samples in patients undergoing surgery for non-small cell lung cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan [citado 31 jul 2014];8(5):e62153. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3643953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 252.-** Melfi FMA, Lucchi M, Davini F, Viti A, Fontanini G, Boldrini L, et al. Intraoperative sentinel lymph node mapping in stage I non-small cell lung cancer: detection of micrometastases by polymerase chain reaction. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2008 Jul [citado 5 ago 2014];34(1):181-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502662>

- 253.-** Pimpec-Barthes F Le, Danel C, Lacave R, Ricci S, Bry X, Lancelin F, et al. Association of {CK19} mRNA detection of occult cancer cells in mediastinal lymph nodes in non-small cell lung carcinoma and high risk of early recurrence. *Eur J Cancer [Internet]*. 2005 Jan [citado 5 dic 2015];41(2):306-12. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804904007798>
- 254.-** Nosotti M, Falleni M, Paleschi A, Pellegrini C, Alessi F, Bosari S, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction detection of lymph node lung cancer micrometastasis using carcinoembryonic antigen marker. *Chest [Internet]*. 2005 Sep [citado 3 jun 2015];128(3):1539-44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162755>
- 255.-** Dango S, Wang XT, Gold M, Cucuruz B, Klein CA, Passlick B, et al. Expression of melano-ma-antigen-A (MAGE-A) in disseminated tumor cells in regional lymph nodes of patients with operable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2010;67(3):290-5.
- 256.-** Li SH, Wang Z, Liu XY, Liu FY. Gene diagnosis and prognostic significance of lymph node micrometastasis after complete resection of histologically node-negative non-small cell lung cancer. *World J Surg*. 2008;32(8):1651-6.
- 257.-** Salerno CT, Frizelle S, Niehans GA, Ho SB, Jakkula M, Kratzke RA, et al. Detection of occult micrometastases in non-small cell lung carcinoma by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Chest*. 1998;113(6):1526-32.
- 258.-** Benlloch S, Galbis-Caravajal JM, Alenda C, Peiro FM, Sanchez-Ronco M, Rodriguez-Paniagua JM, et al. Expression of molecular markers in mediastinal nodes en resected stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC): prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases. *Ann Oncol*. 2009;20(1):91-7.
- 259.-** Li J, Li Z-N, Yu L-C, Shi S-B, Ge L-P, Wu J-R, et al. Gene diagnosis of micrometastases in regional lymph nodes of patients with stage I non-small cell lung cancer: impact on staging and prognosis. *Clin Transl Oncol [Internet]*. 2013 Nov [citado 5 dic 2015];15(11):882-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23404657>
- 260.-** Ahrendt SA, Yang SC, Wu L, Roig CM, Russell P, Westra WH, et al. Molecular assessment of lymph nodes in patients with resected stage I non-small cell lung cancer: preliminary results of a prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123(3):464-6.
- 261.-** Hashimoto T, Kobayashi Y, Ishikawa Y, Tsuchiya S, Okumura S, Nakagawa K, et al. Prognostic value of genetically diagnosed lymph node micrometastasis in non-small cell lung carcinoma cases. *Cancer Res [Internet]*. 2000 Nov 15 [citado 5 dic 2015];60(22):6472-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11103815>
- 262.-** Nwogu CE, Yendamuri S, Tan W, Kannisto E, Bogner P, Morrison C, et al. Lung cancer lymph node micrometastasis detection using real-time polymerase chain reaction: correlation with vascular endothelial growth factor expression. *J Thorac Cardiovasc Surg [Internet]*. 2013 Mar [citado 5 ago 2014];145(3):702-7; discussion 707-8. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584695&tool=pmcentrez&render-type=abstract>
- 263.-** Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007;2(4):327-43.
- 264.-** Betz C, Papadopoulos T, Buchwald J, Dammrich J, Muller-Hermelink HK. Surfactant protein gene expression in metastatic and micrometastatic pulmonary adenocarcinomas and other non-small cell lung carcinomas: detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1995;55(19):4283-6.
- 265.-** Nosotti M, Paleschi A, Rosso L, Tosi D, Santambrogio L, Mendogni P, et al. Lymph node micrometastases detected by carcinoembryonic antigen mRNA affect long-term survival and disease-free interval in early-stage lung cancer patients. *Oncol Lett*. 2012;4(5):1140-4.
- 266.-** Ge MJ, Wu QC, Wang M, Zhang YH, Li LB. Detection of disseminated lung cancer cells in regional lymph nodes by assay of CK19 reverse transcriptase polymerase chain reaction and its clinical significance. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(10):662-8.

- 267.-** Chanida V, Poonchavist C, Virote S, Apiwat M. The role of SHP-1 promoter 2 hypermethylation detection of lymph node micrometastasis in resectable stage I non-small cell lung cancer as a prognostic marker of disease recurrence. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Aug 4 [citado 6 dic 2015];19(4):586-92. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23824557>
- 268.-** Qiu Y, Yang H, Chen H, Ge L, Xu X, Xiong X, et al. Detection of CEA mRNA, p53 and AE1/AE3 in haematoxylin-eosin-negative lymph nodes of early-stage non-small cell lung cancer may improve veracity of N staging and indicate prognosis. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(2):146-52.
- 269.-** Safar AM, Spencer H, Su X, Cooney CA, Shwaiki A, Fan CY. Promoter hypermethylation for molecular nodal staging in non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(6):936-41.
- 270.-** Xi L, Coello MC, Litle VR, Raja S, Gooding WE, Yousem SA, et al. A combination of molecular markers accurately detects lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2006;12(8):2484-91.
- 271.-** Wallace MB, Block MI, Gillanders W, Ravenel J, Hoffman BJ, Reed CE, et al. Accurate molecular detection of non-small cell lung cancer metastases in mediastinal lymph nodes sampled by endoscopic ultrasound-guided needle aspiration. *Chest*. 2005;127(2):430-7.
- 272.-** Helmbold P, Lahtz C, Herpel E, Schnabel PA, Dammann RH. Frequent hypermethylation of RASSF1A tumour suppressor gene promoter and presence of Merkel cell polyomavirus in small cell lung cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45(12):2207-11.
- 273.-** Sobin LH, Wittekind C. UICC International Union Against Cancer, TNM Classification of malignant tumours. Hoboken: Wiley & Sons; 2002.
- 274.-** Gamez C, Rosell R, Fernandez A, Andía E, Arnaiz MD, Cardenal F, et al. PET/CT fusion scan in lung cancer: current recommendations and innovations. *J Thorac Oncol*. 2006;1(1):74-7.
- 275.-** Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Intraoperative lymph node staging in bronchogenic carcinoma surgery. Consensus report. *Arch Bronconeumol*. 2001;37(11):495-503.
- 276.-** Cohen J. Weighted kappa: nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull*. 1968;70(4):213-20.
- 277.-** Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. *Clin Chem*. 2003;49(1):1-6.
- 278.-** McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, et al. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(16):1180-4.
- 279.-** Schulz KF, Altman DG, Moher D. CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* [Internet]. 2010 Jan 23 [citado 10 jul 2014];340(mar23_1):c332. Disponible en: <http://www.bmj.com/content/340/bmj.c332>
- 280.-** Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig L, et al. STARD 2015: An Updated List of Essential Items for Reporting Diagnostic Accuracy Studies. *BMJ* [Internet]. 2015 Oct 28 [citado 10 nov 2015];28;351:h5527. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.h5527>
- 281.-** Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55(4):611-22.
- 282.-** Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* [Internet]. 1977 Mar [citado 20 jul 2014];33(1):159-74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/843571>
- 283.-** Berghmans T, Dusart M, Paesmans M, Hossein-Foucher C, Buvat I, Castaigne C, et al. Primary tumor standardized uptake value (SUVmax) measured on fluorodeoxyglucose positron emis-

- sion tomography (FDG-PET) is of prognostic value for survival in non-small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review and meta-analysis (MA) by the European Lung Cancer Working Party for the IASLC Lung Cancer Staging Project. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2008 Jan [citado 2014 Nov 4];3(1):6-12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18166834>
- 284.-** Lee BE, Redwine J, Foster C, Abella E, Lown T, Lau D, et al. Mediastinoscopy might not be necessary in patients with non-small cell lung cancer with mediastinal lymph nodes having a maximum standardized uptake value of less than 5.3. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2008 Mar [citado 9 nov 2014];135(3):615-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329480>
- 285.-** Lardinois D, Weder W, Hany TF, Kamel EM, Korom S, Seifert B, et al. Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computed tomography. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 Jun 19 [citado 9 nov 2014];348(25):2500-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12815135>
- 286.-** D'Cunha J, Herndon JE, Herzan DL, Patterson GA, Kohman LJ, Harpole DH, et al. Poor correspondence between clinical and pathologic staging in stage 1 non-small cell lung cancer: results en CALGB 9761, a prospective trial. *Lung Cancer* [Internet]. 2005 May [citado 9 nov 2014];48(2):241-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829324>
- 287.-** Cerfolio RJ, Bryant AS, Ojha B, Eloubeidi M. Improving the inaccuracies of clinical staging of patients with NSCLC: a prospective trial. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2005 Oct [citado 9 nov 2014];80(4):1207-13; discussion 1213-4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16181842>
- 288.-** dos Santos PA, da Rocha RS, Pipkin M, Lopes da Silveira M, Cypel M, Oliveira J, et al. Concordance between clinical and pathological staging in patients with stages I or II non-small cell lung cancer subjected to surgical treatment. *J Bras Pneumol* [Internet]. Jan [citado 9 nov 2014];33(6):647-54. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200364>
- 289.-** Heyneman LE, Patz EF. PET imaging in patients with bronchioloalveolar cell carcinoma. *Lung Cancer* [Internet]. 2002 Dec [citado 9 nov 2014];38(3):261-6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445747>
- 290.-** Buendia E, Cantó A, Milá J, Mestre M, Bas J, Moya J, et al. Tissue determination of carcinoembryonic antigen. *Res Surg*. 1990;2:76-80.
- 291.-** López-Encuentra A, Bülzebruck H, Feinstein AR, Motta G, Mountain CF, Naruke T, et al. Tumor staging and classification in lung cancer. Summary of the international symposium. Madrid, Spain, 3-4 December 1999. *Lung Cancer* [Internet]. 2000 Jul [citado 9 nov 2014];29(1):79-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970143>
- 292.-** De Leyn P, Lardinois D, Van Schil PE, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M, et al. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* [Internet]. 2007 Jul [citado 9 nov 2014];32(1):1-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17448671>
- 293.-** Lin C, Song H, Huang C, Yao E, Gacayan R, Xu SM, et al. Alveolar Type II Cells Possess the Capability of Initiating Lung Tumor Development. *PLoS One* [Internet]. 2012 [citado 15 nov 2015];7(12):e53817. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3527621&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 294.-** Sin DD, Man SFP, McWilliams A, Lam S. Surfactant protein D and bronchial dysplasia in smokers at high risk of lung cancer. *Chest* [Internet]. 2008 [citado 15 nov 2015];134(3):582-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779194>
- 295.-** Yamayoshi T, Nagayasu T, Matsumoto K, Abo T, Hishikawa Y, Koji T. Expression of keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7 and its receptor in human lung cancer: correlation with tumour proliferative activity and patient prognosis. *J Pathol* [Internet]. 2004 Sep [citado 28 nov 2015];204(1):110-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15307144>
- 296.-** Liao RG, Jung J, Tchaicha J, Wilkerson MD, Sivachenko A, Beauchamp EM, et al. Inhibitor-Sensitive FGFR2 and FGFR3 Mutations in Lung Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* [Inter-

- net]. 2013 Aug 15 [citado 28 nov 2015];73(16):5195-205. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-12-3950>
- 297.-** Ricol D, Cappellen D, El Marjou A, Gil-Diez-de-Medina S, Girault JM, Yoshida T, et al. Tumour suppressive properties of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb in human bladder cancer. *Oncogene* [Internet]. 1999 Dec 2 [citado 28 nov 2015];18(51):7234-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10602477>
- 298.-** Carstens RP, Eaton JV, Krigman HR, Walther PJ, Garcia-Blanco MA. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2) in human prostate cancer. *Oncogene*. 1997;15:3059-65.
- 299.-** Dienstmann R, Rodon J, Prat A, Perez-Garcia J, Adamo B, Felip E, et al. Genomic aberrations in the FGFR pathway: Opportunities for targeted therapies in solid tumors. *Ann Oncol*. 2014;25(3):552-63.
- 300.-** Zhang Y, Wang H, Toratani S, Sato JD, Kan M, McKeehan WL, et al. Growth inhibition by keratinocyte growth factor receptor of human salivary adenocarcinoma cells through induction of differentiation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Sep 25 [citado 28 nov 2015];98(20):11336-40. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=58730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 301.-** Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010 Feb [citado 29 nov 2015];10(2):116-29. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrc2780>
- 302.-** Molina R, Marrades RM, Augé JM, Escudero JM, Viñolas N, Reguart N, et al. Assessment of a Combined Panel of Six Serum Tumor Markers for Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2015 Oct 14 [citado 5 nov 2015]; Disponible en: http://www.atsjournals.org.sire.ub.edu/doi/abs/10.1164/rccm.201404-0603OC?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#.VI-CbNARtb8
- 303.-** Rohrbeck A, Neukirchen J, Roskopf M, Pardillos GG, Geddert H, Schwalen A, et al. Gene expression profiling for molecular distinction and characterization of laser captured primary lung cancers. *J Transl Med* [Internet]. 2008 Jan [citado 21 dic 2014];6:69. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2613386&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 304.-** Zhang J, Fujimoto J, Wedge DC, Song X, Seth S, Chow C-W, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* [Internet]. 2014 Oct 9 [citado 9 oct 2014];346(6206):256-9. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1256930>
- 305.-** Izbicki JR, Passlick B, Pantel K, Pichlmeier U, Hosch SB, Karg O, et al. Effectiveness of radical systematic mediastinal lymphadenectomy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of a prospective randomized trial. *Ann Surg* [Internet]. 1998 Jan [citado 7 feb 2015];227(1):138-44. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1191184&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 306.-** Wu YL, Huang Z, Wang S, Yang X, Ou W. A randomized trial of systematic nodal dissection in resectable non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;36:1-6.
- 307.-** Osarogiagbon RU, Ogbata O, Yu X. Number of lymph nodes associated with maximal reduction of long-term mortality risk in pathologic node-negative non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 2014 Feb [citado 9 sep 2015];97(2):385-93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.athoracsur.2013.09.058>
- 308.-** Wright G, Manser RL, Byrnes G, Hart D, Campbell DA. Surgery for non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Thorax*. 2006;61:597-603.
- 309.-** Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* [Internet]. 2006 Jan [citado 9 jul 2014];1(3):1559-82. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406449>

- 310.-** Varela M. Detección de células epiteliales en ganglios linfáticos mediante RT-PCR. [tesis doctoral]. Barcelona (España): Universitat de Barcelona; 2007. p 26-29.
- 311.-** Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(11):901-10.
- 312.-** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Resumen estructurado

Antecedentes e hipótesis. Los actuales métodos de estadificación clínica del carcinoma de pulmón no célula pequeña (CPNCP) no predicen adecuadamente la estadificación patológica de la neoplasia. La expresión anómala en tejido tumoral de marcadores moleculares embrionarios puede tener utilidad pronóstica en pacientes con CPNCP intervenidos quirúrgicamente con intención radical. La expresión de dichos marcadores moleculares en ganglios linfáticos torácicos puede indicar la existencia de células tumorales en los citados ganglios y ayudar a una mejor estadificación del tumor resecado.

Objetivos. Determinar la concordancia entre la estadificación clínica y la patológica en pacientes con CPNCP tratado quirúrgicamente con intención radical. Determinar el valor pronóstico de la expresión de marcadores embrionarios en muestras tumorales y de la estadificación molecular ganglionar en estos mismos pacientes.

Población. Estudio clínico: 176 pacientes afectados de CPNCP estadificados y operados. **Estudio tumoral:** 129 muestras de tumor primario de 102 pacientes operados de CPNCP con intención radical y 27 muestras de pulmón normal. **Estudio ganglionar:** 349 ganglios de 76 pacientes operados con intención radical (60 pN0, 16 pN1), 27 ganglios de 7 pacientes pN2 y 25 ganglios normales. **Métodos.** Se evaluó la expresión de CEACAM5, FGFR2b, FRS2, MYCN, SFTPC, SHH, SHP2 y SOX17 en tumor y CEACAM5, FGFR2b y SHP2 en ganglios, mediante RT-qPCR de mRNA. Estadística: la concordancia se determinó fundamentalmente mediante el índice kappa. Para los estudios tumoral y ganglionar: chi-cuadrado, pruebas no paramétricas, curvas Kaplan Meier, test log-rank y regresión de Cox, logística binaria u ordinal.

Resultados. Estudio clínico. Concordaron 102 casos (58%), índice kappa 0,54 (0,44-0,63). La estadificación quirúrgico-patológica validó la cirugía en 145 ca-

82%), 21 (12%) fueron IIIA N2 y 10 (6%) IIIB-IV. **Estudio tumoral.** Respecto el pulmón normal, CEACAM y MYCN presentaron mayor expresión tumoral ($p < 0,05$), FGFR2b similar expresión y FRS2, SFTPC, SHH, SHP2 y SOX17 menor expresión ($p < 0,05$). La infraexpresión tumoral de SFTPC se asoció a un riesgo de recidiva 7,3 (1,3-40,9) veces superior y un riesgo de mortalidad 4,9 (1,04-23,2) veces superior. La infraexpresión tumoral de SHP2 presentaba menor tiempo libre de enfermedad (TLE) y supervivencia global (SG) ($p = 0,055$). La sobreexpresión de FGFR2b ó SHH presentaba mayor TLE/SG ($p < 0,05$; SG SHH $p = 0,07$). La combinación de marcadores no aportó información adicional. **Estudio ganglionar.** Se evidenció una mayor expresión tumoral y en pulmón normal de CEACAM5, FGFR2b, SFTPC y SHP2, respecto el ganglio normal. Mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2 se reclasificaron 219 (63%) de los 349 ganglios analizados y se restadificaron a molecular positivo 68 pacientes (89%): 53 pN0 (88%) y 15 pN1 (94%). Las curvas del TLE/SG mostraban una discreta peor evolución de los pacientes molecular positivo ($p > 0,05$).

Conclusiones. En neoplasia de pulmón resecable, la concordancia entre la estadificación clínica y la quirúrgica-patológica es moderada sin que afecte a la indicación quirúrgica. La infraexpresión tumoral de SFTPC se asocia a un peor pronóstico de forma independiente de las variables clínico-patológicas convencionales. La restadificación molecular basada en los niveles de expresión en ganglio de los marcadores embrionarios CEACAM5, FGFR2b y SHP2 no aporta información clínica adicional relevante.

Lista de tablas

Tabla 1. Clasificación del adenocarcinoma. Basada en la Clasificación 2015 de la OMS de los tumores del pulmón, la pleura, el timo y el corazón (Travis WD, et al. <i>J Thorac Oncol.</i> 2015;10:1243-60) y en la clasificación de la IASLC, ATS y ERS. 1, IASLC: <i>International Association for the Study of Lung Cancer</i> ; 2, ATS: <i>American Thoracic Society</i> ; 3, ERS: <i>European Respiratory Society</i> .	42
Tabla 2. Alteraciones moleculares y presentación radiológica frecuente de los subtipos de adenocarcinoma.	43
Tabla 3. Subtipos histológicos de carcinoma escamoso.	45
Tabla 4. Alteraciones moleculares relevantes del carcinoma escamoso. 1, FGFR1: <i>fibroblast growth factor receptor 1</i> ; 2, NFE2L2: <i>nuclear factor, erythroid 2-like 2</i> ; 3, SOX2: <i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i> ; 4, DDR2: <i>discoidin domain receptor tyrosine kinase 2</i> .	45
Tabla 5. Estadios anatómicos según las combinaciones de los descriptivos T, N y cM, séptima edición de la clasificación TNM.	48
Tabla 6. Mapa ganglionar propuesto por la IASLC y vigente en la actualidad. 1, R: derecho; 2, L: izquierdo.	55
Tabla 7. Resumen de las técnicas de estadificación mediastínica ganglionar y sus valores de sensibilidad, especificidad, VPN y VPP. Dado que el VPN está afectado por la prevalencia y en los estudios de PAAF/BAG guiada por TC es >80%, el VPN no se calculó. *Ensayo clínico ASTER, comparado con cirugía sola (Sensibilidad 79%, VPN 86%). 1, VPP: valor predictivo positivo; 2, VPN: valor predictivo negativo; 3, VAMLA: <i>video assisted mediastinal lymphadenectomy</i> ; 4, TEMPLA: <i>transcervical extended mediastinal lymphadenectomy</i> .	57
Tabla 8. Clasificación según la presencia o ausencia de células tumorales aisladas, ya fuere por hallazgos morfológicos o no morfológicos.	60
Tabla 9. Supervivencia mediana y a 5 años en función del estadio patológico, del descriptivo pT y el N. Fuente: IASLC <i>Database</i> y <i>New Database</i> , bases de datos en la que se basaron la séptima y octava clasificación TNM de la neoplasia pulmonar; estudios adicionales referenciados(56,58,73,77,99,100). 1: mediana en meses.	65
Tabla 10. Principales marcadores moleculares evaluados en el carcinoma pulmonar(93-95,109-113) y Sánchez Torres, <i>Plenary Session & VII Educational Symposium of the Spanish Lung Cancer Group</i> , 2014. *: en fase de implementación.	72
Tabla 11. Principales marcadores moleculares evaluados en el carcinoma pulmonar de forma experimental(51,114-126).	73
Tabla 12. Visión global de los marcadores embrionarios CEACAM5, FGFR2b y FRS2 en la neoplasia de pulmón (66,116,141-159).	79

Tabla 13. Visión global de los marcadores embrionarios MYCN, SFTPC y SHH en la neoplasia de pulmón(26,118,160-177).	83
Tabla 14. Visión global de los marcadores embrionarios SHP2 y SOX17 en la neoplasia de pulmón(17,21,23,128,178-185).	87
Tabla 15. Frecuencia de metilación de marcadores epigenéticos en muestra tumoral de neoplasia pulmonar (199,201,204-211).	88
Tabla 16. Frecuencia de mutaciones, principalmente driver mutations, amplificaciones y otras alteraciones moleculares en muestras tumorales(90,148,153,161,217-219). 1, ND: no disponible.	89
Tabla 17. Principales firmas genómicas tumorales evaluadas en la literatura mediante <i>microarrays</i> y RT-(q)PCR (2007-2014). 1, n: número de pacientes; 2, ND: no disponible.	92
Tabla 18. Principales firmas genómicas tumorales evaluadas en la literatura con las 4 principales técnicas (1999-2007). 1, n: número de pacientes; 2, ND: no disponible.	93
Tabla 19. Resultados de la revisión bibliográfica de los marcadores que restadifican molecularmente los pacientes a nivel ganglionar. Las firmas genómicas se separan de los marcadores aislados mediante una línea más gruesa. Si no se indica lo contrario, la peor evolución es de los pacientes pNO(mol+) respecto los pNO(mol-). 1: ND: no disponible; 2, Val., cohorte de validación. *Estos dos estudios comparten enfermos.	99
Tabla 20. Revisión bibliográfica de los estudios que han explorado la restadificación molecular ganglionar, a través de la evaluación pronóstica de la presencia o alteración genómica de marcadores a nivel ganglionar. Si no se indica lo contrario, la peor evolución es de los pacientes pNO(mol+) respecto los pNO(mol+). 1, ND: no disponible; 2: AL: <i>allele-specific ligation</i> ; 3: OH: <i>oligonucleotide hybridization</i> .	100
Tabla 21. Revisión bibliográfica de los estudios que han explorado la presencia de marcadores moleculares a nivel ganglionar, pero que no los han evaluado de forma pronóstica. Las firmas genómicas se separan de los marcadores aislados mediante una línea más gruesa. 1, ND: no disponible.	101
Tabla 22. Primers elegidos y construidos para realizar la RT-qPCR. 1, F: primer forward; 2, R: primer reverse; 3, B2M: β 2microglobulina. Se exponen el número de otros genes con la misma secuencia reportadas in silico mediante BLAST*. En aquéllas en las que no se puede reportar homología es porque la secuencia implica dos exones.	118
Tabla 23. Materiales utilizados y volumen en la RT.	118
Tabla 24. Materiales y volúmenes necesarios para la qPCR.	119
Tabla 25. Protocolo de realización de la qPCR. 1, S/P:según primer.	119
Tabla 26. Volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de SHH.	120
Tabla 27. Volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de β actina.	120
Tabla 28. Datos de la recta patrón del CEACAM5. R: error medio.	121
Tabla 29. Datos de la recta patrón de la β actina. R: error medio.	121
Tabla 30. Características clínicas de los pacientes de la serie tumoral (n=102). 1, n: número de pacientes; 2, %: porcentaje; 3, p/a: paquetes/año; 4, CE: carcinoma escamoso; 5, ADK: adenocarcinoma; 6, CCG: carcinoma de célula grande; 7, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande; 8, QT: quimioterapia; 9, RT: radioterapia.	132
Tabla 31. Distribución de los pacientes por estadios según la anatomía patológica (excluidos los segundos primarios sincrónicos en un mismo paciente, dado que estos datos se utilizarán con las concentraciones absolutas normalizadas y relativas de los marcadores tumorales). 1, n: número de pacientes; 2, %: porcentaje; 3, CCG: carcinoma de célula grande; 4, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande.	133

- Tabla 32.** Resultados de la revisión bibliográfica del patrón de expresión tumoral de los marcadores moleculares embrionarios respecto el pulmón normal. Se exponen en rojo las series con expresión tumoral superior al pulmón normal y en verde si fue inferior. Datos obtenidos de las bases de datos existentes, sobretodo de *arrays* incorporados en Oncomine®, y desglosados según la serie(222,229,230,240,241). 1, CCG: carcinoma de célula grande; 2, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande. 134
- Tabla 33.** Expresión tumoral y en pulmón normal de los marcadores moleculares embrionarios, medida como concentración absoluta normalizada. 1, n: número de muestras. 136
- Tabla 34.** Concentración relativa tumoral respecto el pulmón normal, según los marcadores. 138
- Tabla 35.** Factores asociados a expresión molecular tumoral. El análisis de SFTPC se realizó en base a 100 pacientes; el de SHH, en base a 101. Se muestran las variables que correlacionan con algún marcador con $p < 0,05$. Se han analizado también edad, histología, estadio patológico, invasión linfática intratumoral, tipo de resección y tipo de recidiva sin detectar ninguna variable asociada/con tendencia a asociarse a la expresión tumoral ($p < 0,1$) (Anexo 11). 1, n: número pacientes; 2, FC: fold change. 141
- Tabla 36.** Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de la serie tumoral según variables clínicas relevantes (1). 1, n: número de pacientes; 2: meses. Se analizó el TLE y OS según la comorbilidad respiratoria, cardíaca y vascular sin evidenciar diferencias a considerar. 144
- Tabla 37.** TLE y OS de la serie tumoral según variables clínicas relevantes (2). 1, n: número de pacientes; 2: meses; 3, CCG: carcinoma de célula grande; 4, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande; 5, LSD: lóbulo superior derecho; 6, LM: lóbulo medio, TLE y OS 100% a 5 años; 7, LID: lóbulo inferior derecho; 8, LSI: lóbulo superior izquierdo; 9, LII: lóbulo inferior izquierdo. 145
- Tabla 38.** Resumen del análisis univariante del tiempo libre de enfermedad y supervivencia global en función de la expresión de los marcadores moleculares aislados o en combinación. Se añade el control de calidad (metilación del promotor de RASSF1A). 1: n, número de pacientes; 2: meses. 146
- Tabla 39.** Características de las posibles agrupaciones del número de marcadores con signo adverso de la firma SFTPC-SHH-SHP2. El *gold* estándar fue la recidiva (primer valor de cada ítem) y la supervivencia (segundo valor). 150
- Tabla 40.** Distribución de los pacientes según el número de marcadores infraexpresados o no sobreexpresados, estratificados por el estadio patológico. 151
- Tabla 41.** Análisis multivariante de factores asociados a la recidiva en la serie tumoral, incluyendo los marcadores por separado (n=98; 3 casos perdidos por imposibilidad técnica de la determinación de algún marcador de la firma y 1 caso censurado antes del evento más temprano del estrato). Prueba omnibus: $p=0,004$. $-2 \log$ de la verosimilitud inicial 238,44, final 215,05. 1, n: número de pacientes; 2: referencia, estadio III-IV. 151
- Tabla 42.** Análisis multivariante de factores asociados a la supervivencia en la serie tumoral, incluyendo los marcadores por separado (n=99; 3 casos perdidos por imposibilidad técnica de la determinación de algún marcador de la firma). Prueba omnibus: $p=0,002$. $-2 \log$ de la verosimilitud inicial 242,16, final 217,81. 1, n: número de pacientes; 2: referencia, estadio III-IV. 152
- Tabla 43.** Resumen de los resultados de la expresión tumoral de los 8 marcadores embrionarios. 1, SE: sobreexpresión; 2, IE: infraexpresión; 3, TLE: tiempo libre de enfermedad; 4, a: años; 5, ND: sin diferencias en la expresión; 6, HR: hazard ratio; 7, IC: intervalo de confianza; 8, OS: supervivencia global; 9, ADK: adenocarcinoma; 10, CE: carcinoma escamoso. 153
- Tabla 44.** Resultados de las bases de datos públicas del patrón de expresión en ganglio, en pulmón normal y en tumor de los marcadores moleculares embrionarios. Se expone en rojo las series con expresión tumoral o del pulmón normal superior al ganglio normal. Bases de datos: SAGE y GEO. 1: BBDD: base de datos; 2: P, pulmón; T, tumor; G, ganglio. 156

- Tabla 45.** Expresión tumoral, en pulmón normal y en ganglio normal de los marcadores moleculares embrionarios, medida como concentración absoluta normalizada. 1, n: número de muestras. Los 76 pacientes pN0 y pN1 que se restadificarán aportan las 102 muestras tumorales, por tanto, podemos apreciar el patrón de expresión tumoral de los pacientes a restadificar. Los resultados de expresión en el pulmón normal provienen de 10 réplicas de un *pool* de muestras. Las muestras tumorales de SFTPC fueron 100 (74 pacientes) y las muestras ganglionares normales fueron 22 (16 pacientes). Las muestras ganglionares de FRS2 y MYCN fueron 23 (15 pacientes) y las de SHH fueron 22 (16 pacientes). 157
- Tabla 46.** Características clínicas de los pacientes a restadificar (n=76). 1, n: número de pacientes; 2, %: porcentaje; 3, p/a: paquetes/año; 4, CE: carcinoma escamoso; 5, ADK: adenocarcinoma; 6, CCG: carcinoma de célula grande; 7, CNCG: carcinoma neuroendocrino de célula grande; 8, QT: quimioterapia; 9, RT: radioterapia. 159
- Tabla 47.** Descriptivo del análisis de los ganglios para cada marcador y para la combinación de los 3 marcadores. La n total es de 349 ganglios. 1, n: número de ganglios; 2, N°: número de estación. 160
- Tabla 48.** Número de pacientes pN0 en cada grupo anatómico-molecular tras la restadificación molecular con cada uno de los marcadores por separado y con la combinación de los 3. 1, n: número de pacientes. 160
- Tabla 49.** Número de pacientes pN1 en cada grupo anatómico-molecular tras la restadificación molecular con cada uno de los marcadores por separado y con la combinación de los 3. 1, n: número de pacientes. 160
- Tabla 50.** Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=75) tras la restadificación molecular ganglionar mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, referenciado la clasificación patológica ganglionar de la serie. 162
- Tabla 51.** Número de pacientes con sobreexpresión en los tumores primarios y también a nivel de uno o más ganglios. 1, n: número de pacientes. 163
- Tabla 52.** Número de pacientes y de ganglios pN2 con afectación histológica y sobreexpresión molecular. 1, n: número de pacientes. 163
- Tabla 53.** Principales estudios de restadificación molecular ganglionar comparados con nuestro estudio. 1, n: número; 2, ND: no disponible; 3, a: años. 176

Lista de figuras

Figura 1. Desarrollo del embrión desde el disco germinativo bilaminar hasta el plegamiento que originará el tronco y englobará el futuro intestino primitivo en el embrión, pasando por la gastrulación.	21
Figura 2. Desarrollo de la tráquea, árbol bronquial y parénquima pulmonar durante la época embrionaria.	23
Figura 3. Esquema de la estructura de las proteínas transmembrana FGFR, con especial hincapié en la transcripción alternativa del gen de <i>FGFR2</i> para generar los subtipos de FGFR2b y FGFR2c. DTM: dominio transmembrana; PTK: <i>protein tyrosine kinase</i> .	24
Figura 4. Diagrama de las interacciones moleculares en la yema pulmonar haciendo hincapié en la vía mediada por FGFR y los puntos en común con la vía del EGFR.	30
Figura 5. Acciones de moléculas implicadas en la maduración pulmonar. Nótese el papel de MYCN en la apoptosis.	36
Figura 6. Estimación de las tasas de incidencia de las 5 neoplasias más incidentes, por sexo, en Catalunya para el año 2015. Datos sobre 100.000 personas y año. Tasa estandarizada por población mundial. Fuente: Generalitat de Catalunya, http://cancer.gencat.cat .	39
Figura 7. Estimación de las tasas de mortalidad de las 5 neoplasias más letales, por sexo, en Catalunya para el año 2015. Datos sobre 100.000 personas y año. Tasa estandarizada por población mundial. Fuente: Generalitat de Catalunya, http://cancer.gencat.cat .	39
Figura 8. Nódulos linfáticos laterotraqueales derechos en el espacio de Baréty.	51
Figura 9. Nódulos linfáticos traqueobronquiales.	51
Figura 10. Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores izquierdos.	52
Figura 11. Nódulos linfáticos mediastínicos anteriores derechos.	52
Figura 12. Mapa ganglionar propuesto por la IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) y vigente en la actualidad. 1, R: derecho; 2, L: izquierdo.	54
Figura 13. Rutas de drenaje linfático lobar.	56
Figura 14. Algoritmo de estadificación ganglionar mediastínica propuesto por la ESTS.	58
Figura 15. Curvas Kaplan Meier de la supervivencia de los pacientes con neoplasia de pulmón según estadio patológico. Fuente: modificado de IASLC <i>Database</i> (56)	65
Figura 16. Modelo de Hananan y Weinberg que expone las características de la neoplasia.	67
Figura 17. Diagrama de flujo mostrando los criterios de exclusión del estudio de concordancia entre estadificación clínica y patológica.	108

Figura 18. Diseño del estudio y distribución de muestras.	109
Figura 19. Los pacientes de la fase translacional servirán para dos estudios, el estudio tumoral y el estudio ganglionar.	112
Figura 20. Protocolo de estadificación clínica ganglionar utilizado en los comités multidisciplinares de tumores en los que están presentes miembros del Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitari de Bellvitge. *La sospecha por PET-TC de N2-N3 que se considera en este algoritmo es la dudosa o potencialmente quirúrgica en algún momento del tratamiento.	114
Figura 21. Protocolo de procesamiento de muestras. Grupos A, B y C	117
Figura 22. Curva de fusión de SHH.	120
Figura 23. Curva de fusión de β actina.	120
Figura 24. Recta patrón para el CEA.	121
Figura 25. Recta patrón para la β actina.	121
Figura 26. Distribución de los pacientes según el tratamiento que deberían haber recibido de forma inicial de acuerdo al estadio patológico.	130
Figura 27. Diagrama de flujo del estudio tumoral. 1, n: número de pacientes; 2, FC: fold change; 3, M: marcador.	131
Figuras 28-33. Expresión tumoral y de pulmón normal de los marcadores CEACAM5, FGFR2b, FRS2, MYCN, SFTPC y SHH, expresada como concentración absoluta normalizada. Las series de pulmón normal son dos: una de pulmón sano apareado de pacientes con CPNPC y otra un <i>pool</i> de muestras normales. La expresión tumoral se documenta para toda la serie (tumor) y para una serie de 42 muestras tumorales confirmadas (tumor confirmado).	137
Figura 34-35. Expresión tumoral y de pulmón normal de los marcadores SHP2 y SOX17, expresada como concentración absoluta normalizada.	138
Figuras 36-39. Expresión tumoral de CEACAM5, FGFR2b, FRS2 y MYCN según histología. En el tercer grupo se incluyen tres tipos histológicos diferentes: los carcinomas de célula grande, los carcinomas neuroendocrinos de célula grande y los tumores mixtos.	139
Figuras 40-43. Expresión tumoral de SFTPC, SHH, SHP2 y SOX17 según histología. El percentil 25 del logaritmo de la CAN de los CCG, CNCG y TM es -70,84 ng/ μ L; se han omitido para poder representar adecuadamente las dos histologías más frecuentes. En el tercer grupo se incluyen tres tipos histológicos diferentes: los carcinomas de célula grande, los carcinomas neuroendocrinos de célula grande y los tumores mixtos.	140
Figuras 44-45. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de la serie tumoral según estadio patológico.	143
Figuras 46-47. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de FGFR2b.	147
Figuras 48-49. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de SHH.	147
Figuras 50-51. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de SFTPC.	148
Figuras 52-53. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia según expresión tumoral de SHP2.	148
Figuras 54-55. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según el número de marcadores de la firma SFTPC-SHH-SHP2 con signo adverso; 99 fueron los pacientes con la determinación molecular de los 3 marcadores.	149
Figuras 56-57. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según el número de marcadores de la firma SFTPC-SHH-SHP2 con signo adverso, teniendo en cuenta si un solo marca-	

dor negativo es SFTPC o no; 99 fueron los pacientes con la determinación molecular de los 3 marcadores. 150

Figura 58. Diagrama de flujo del estudio ganglionar. 1, n: número de pacientes; 2, SE: sobreexpresión. 154

Figuras 59-62. Expresión de CEACAM5, FGFR2b, SFTPC y SHP2 en los ganglios de pacientes sin neoplasia, comparada con el pulmón normal y el tumor. 158

Figuras 63-64. Tiempo libre de enfermedad de los pacientes (n=75) tras la restadificación molecular ganglionar mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, referenciado a la clasificación patológica ganglionar de la serie. El paciente pN1 molecular N1 no se incluyó porque era molecular positivo pero no implicaba restadificación del paciente; esta exclusión no modificó las curvas del tiempo libre de enfermedad ni de la supervivencia. 162

Figuras 65-66. Supervivencia global de los pacientes (n=75) tras la restadificación molecular ganglionar mediante la combinación de CEACAM5, FGFR2b y SHP2, referenciada a la clasificación patológica ganglionar de la serie. 162

Abreviaturas y acrónimos

A

A: adenina
a: año o años
ABMS: Àrea de Barcelona Metropolitana Sud
ACCP: American College of Chest Physicians
AD: adenocarcinoma
ADH1C: alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide.
ADK: adenocarcinoma
Adyu: tratamiento adyuvante
AE1: solute carrier family 4 (anion exchanger) member 1, SLC4A1.
AE3: solute carrier family 4 (anion exchanger) member 3, SLC4A3.
AGER: advanced glycosylation end product-specific receptor
AIS: adenocarcinoma in situ
AJCC: American Joint Committee on Cancer
AKT: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AKT1: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
AKT2: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
AKT3: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
AL: allele-specific ligation
ALK: anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
ALX1: ALX homeobox 1
AMI: adenocarcinoma mínimamente invasivo
AMP: adenosine monophosphate, adenosina monofosfato.
ANXA5: annexin A5
ANOVA: analysis of variance, análisis de la varianza.
APC: adenomatous polyposis coli
ARHGDI: Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha
ARID1A: AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
ARID1B: AT rich interactive domain 1B (SWI-like)
ARID2: AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like).
ASC: PYD and CARD domain containing

ASCL2: achaete-scute family bHLH transcription factor 2
ASCL4: achaete-scute family bHLH transcription factor 4
ASTER: Assessment of surgical staging vs endoscopic ultrasound in lung cancer: a randomized clinical trial.
ATM: ataxia telangiectasia mutated serine/threonine kinase
ATP: adenosine triphosphate, adenosina trifosfato.
ATP1B1: ATPase, Na⁺/K⁺ transporting, beta 1 polypeptide.
ATS: American Thoracic Society
AUC: area under curve, área bajo la curva en las curvas ROC.
AXL: AXL receptor tyrosine kinase

B

b: log y-intersección de la recta patrón
BAG: biopsia con aguja gruesa
BAG1: BCL2-associated athanogene
BAK1: BCL2-antagonist/killer 1
BBDD: base de datos
BCLXL: BCL2-like 1, BCL2L1.
BCL2: B-cell CLL/lymphoma 2
BCL2L1: BCL2-like 1
BCL2L11: BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BDNFR: brain-derived neurotrophic factor receptor
BEK: fibroblast growth factor receptor, partial.
BER: base-excision repair
BET: bromodomain and extraterminal
BIM: BCL2-like 11 (apoptosis facilitator), BCL2L11.
BIRC5: baculoviral IAP repeat containing 5
BLAST*: Basic Local Alignment Search Tool
BLM: Bloom síndrome, RecQ helicase-like.
BMP: bone morphogenetic protein
BMP4: bone morphogenetic protein 4
BNC1: basonuclin 1
Bp: base pairs, pares de bases.

BPIFA1: *BPI fold containing family A, member 1.*
BRAF: *B-Raf protooncogene, serine/threonine kinase.*
BRCA1: *breast cancer 1, early onset.*
BRG1: *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4.*
BTAM: *bisphosphoryl tyrosine-based activation motif*
BTAM-GAB1: *bisphosphoryl tyrosine-based activation motif of GAB1.*

C

C: *cluster, grupo; citosina, según el contexto.*
°C: *grados centígrados*
CAAX: *cisteína, dos residuos alifáticos y un aminoácido C-terminal dependiendo de la especificidad del sustrato.*
CAIX: *carbonic anhydrase IX*
CALB1: *calbindin 1, 28kDa.*
CAN: *concentración absoluta normalizada*
CA4: *carbonic anhydrase IV*
CA9: *carbonic anhydrase IX, CA IX.*
CBL: *casitas B-lineage proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase.*
CBNCP: *carcinoma broncogénico no célula pequeña*
CCG: *carcinoma de célula grande*
CCL19: *chemokine (C-C motif) ligand 19*
CCND1: *cyclin D1*
CCNE: *cyclin E1*
CCNI: *cyclin I*
CCR7: *chemokine (C-C motif) receptor 7*
CDC6: *cell división cycle 6*
cDNA: *complementary deoxyribonucleic acid, DNA complementario.*
CDH1: *cadherin 1, type 1, E-cadherin.*
CDH13: *cadherin 13*
CDK1: *cyclin-dependent kinase 1*
CDK2AP1: *cyclin-dependent kinase 2 associated protein 1*
CDK4: *cyclin-dependent kinase 4*
CDK6: *cyclin-dependent kinase 6*
CDKN1A: *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*
CDKN2A: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
CDS: *coding sequences, DNA que codifica para la proteína.*
CD44: *CD44 molecule (Indian blood group)*
CD98: *solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5, SLC7A5.*
CD133: *prominin 1, PROM1.*
CD300A: *CD300a molecule*
CE: *carcinoma escamoso*
CEA: *carcinoembryonic antigen, antígeno carcinoembriogénico.*
CEACAM: *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule*
CEACAM5: *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5*
CEA-βA: *antígeno carcinoembriogénico normalizado por la βactina*
CEA-β2M: *antígeno carcinoembriogénico normalizado por la β2microglobulina*

CEIC: *Comitè Ètic d'Investigació Clínica*
Ci: *cubitus interruptus*
CICG: *carcinoma indiferenciado de célula grande*
CIS: *carcinoma in situ*
CISH: *chromogenic in situ hybridization*
CIT: *citron rho-interacting serine/threonine kinase*
CK6: *citoqueratina 6*
cm: *centímetro o centímetros*
cM: *descriptivo metástasis en la estadificación clínica*
C-MYC: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog c*
cN: *descriptivo adenopatías en la clasificación clínica*
CNCG: *carcinoma neuroendocrino de célula grande*
COL7A1: *collagen, type VII, alpha 1.*
COL17A1: *collagen, type XVII, alpha 1.*
CONSORT: *consolidated standards of reporting trials*
COX8C: *cytochrome c oxidase subunit VIII C*
C_p: *crossing point, punto de corte.*
CPCP: *carcinoma de pulmón de célula pequeña*
CPEB4: *cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4*
CpG: *dinucleótido CpG*
CPNPC: *cáncer o carcinoma de pulmón no célula pequeña*
CPT1A: *carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)*
CR: *concentración relativa*
cRAF: *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase, RAF1.*
CREB: *cAMP responsive element binding protein*
°C/s: *grados centígrados por segundo*
CSF1: *colony stimulating factor 1 (macrophage)*
C_t: *threshold cycle, ciclo umbral.*
cT: *descriptivo tumor primario en la clasificación clínica*
CTA: *células tumorales aisladas*
cTNM: *clasificación o estadificación clínica*
CTSL: *cathepsin L*
CUL3: *cullin 3*
CXCR4: *chemokine (C-X-C motif) receptor 4*
CYPIA1: *cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1.*
CYFRA21-1: *fragments of keratin 19, type I.*
C12orf59: *transmembrane protein 52B, TMEM52B.*

D

DAG1: *distroglycan 1, dystrophin-associated glycoprotein 1.*
DAPK: *death-associated protein kinase 1, DAPK1.*
DAPK1: *death-associated protein kinase 1*
dATP: *deoxyadenosine triphosphate*
dCTP: *deoxycytidine triphosphate*
DDR2: *discoidin domain receptor tyrosine kinase 2*
DEPDC1: *DEP domain containing 1*
DGKH: *diacylglycerol kinase, eta.*
dGTP: *deoxyguanosine triphosphate*
DIAPH3: *diaphanous-related formin 3*
DISP: *dispatched*
DKK1: *dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1*
DLG2: *discs, large homolog 2 (Drosophila)*

DNA: deoxyribonucleic acid
DNMT3A: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 alpha
DNMT3B: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta
dNTP: deoxyribonucleosides triphosphate, desoxirribonucleósido trifosfato.
DOC1: down regulated in ovarian cancer
DSG3: desmoglein 3
DTI: estabilizante
dTTP: deoxythymidine triphosphate
DTM: dominio transmembrana
dUTP: deoxyuridine triphosphate
DUSP6: dual specificity phosphatase 6
DYRK2: dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2

E

E: eficiencia de la reacción
EBUS: endobronchial ultrasound
EBUS-TBNA: endobronchial ultrasound associated with transbronchial needle aspiration
EDN3: endothelin 3
EGFR: epidermal growth factor receptor
EIF5A: eukaryotic translation initiation factor 5A
EML4: echinoderm microtubule associated protein like 4
EMT: epithelial-mesenchymal transition, transición epitelial-mesenquimal
EN: expresión normal
ENPP2: ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2
EPCAM: epithelial cell adhesion molecule
EPCAM2: epithelial cell adhesion molecule 2
EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERCC1: excision repair cross-complementation group 1
ERBB2: erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERBB3: erb-b2 receptor tyrosine kinase 3
ERK: mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1.
ERK1: mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3.
ERK2: mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1.
ERO1L: ERO1-like (*saccharomyces cerevisiae*)
ERS: European Respiratory Society
ESD: esterase D
ESMO: European Society for Medical Oncology
EST: expression sequence tag
ESTS: European Society of Thoracic Surgeons
EUS: endoscopy ultrasound
EUS-FNA: endoscopy ultrasound associated with fine needle aspiration
EXOSC6: exosome component 6
E2F1: E2F transcription factor 1
E2F4: E2F transcription factor 4, p107/p130-binding.

F

FAM64A: family with sequence similarity 64, member A.
FAM107A: family with sequence similarity 107, member A.
FBXW7: F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase.
FC: fold change
FDG: fluorodesoxiglucosa

FGF: fibroblast growth factor
FGFR: fibroblast growth factor receptor
FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1
FGFR2: fibroblast growth factor receptor 2
FGFR2b: fibroblast growth factor receptor 2b
FGFR2b-βA: fibroblast growth factor receptor 2b normalizado por la βactina
FGFR2b-β2M: fibroblast growth factor receptor 2b normalizado por la β2microglobulina
FGFR2c: fibroblast growth factor receptor 2c
FGFR2-IIIb: fibroblast growth factor receptor 2b
FGFR2-IIIc: fibroblast growth factor receptor 2c
FGFR3b: fibroblast growth factor receptor 3b
FGF1: fibroblast growth factor 1
FGF2: fibroblast growth factor 2
FGF3: fibroblast growth factor 3
FGF7: fibroblast growth factor 7
FGF9: fibroblast growth factor 9
FGF10: fibroblast growth factor 10
FGF19: fibroblast growth factor 19
FGF22: fibroblast growth factor 22
FHIT: fragile histidine triad
FIGF: c-fos induced growth factor, vascular endothelial growth factor D.
FISH: fluorescence in situ hybridization
FOSL2: FOS-like antigen 2
FOXM1: forkhead box M1
FOXO3: forkhead box O3
FOXP1: forkhead box P1
FQ-PCR: fluorescent quantitation reverse transcription polimerase chain reaction
FRAP1: mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase), MTOR.
FRS: fibroblast growth factor receptor substrate
FRS2: fibroblast growth factor receptor substrate 2
FRS2A: fibroblast growth factor receptor substrate 2 beta, FRS3.
FRS2B: fibroblast growth factor receptor substrate 2 beta, FRS3.
FRS2-βA: fibroblast growth factor receptor substrate 2 normalizado por la βactina
FRS2-β2M: fibroblast growth factor receptor substrate 2 normalizado por la β2microglobulina
FRS3: fibroblast growth factor receptor substrate 3, FRS2B.
Fu: fused
FUT3: fucosyltransferase 3 (galactoside 3(4)-L-fucosyltransferase, Lewis blood group).

G

G: grupo, gramo o gramos, guanina, según el contexto.
GAB: GRB2-associated binding protein
GAB1: GRB2-associated binding protein 1
GAB2: GRB2-associated binding protein 2
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA6: GATA binding protein 6
GCCB-S: Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica
GDNFR: glial derived neurotrophic factor receptor

GDP: guanosina difosfato
GEO: *Gene Expression Omnibus*
GKN2: *gastrokine 2*
GLI: *Glioma associated oncogene family zinc finger*
GLI1: *GLI family zinc finger 1*
GLI2: *GLI family zinc finger 2*
GLI3: *GLI family zinc finger 3*
GPI: glicosilfosfatidilinositol
GR: gen de referencia
GRAM: *glucosyltransferases, Rab-like GTPase activators of myotubularins.*
GRAMD1B: *GRAM domain containing 1B*
GRB2: *growth factor receptor bound protein 2*
GREB1: *growth regulation by estrogen in breast cancer 1*
Grupo A: pacientes sin neoplasia, aportan ganglios normales.
Grupo B: pacientes con carcinoma pulmonar no célula pequeña sin afectación ganglionar histológica
Grupo C: pacientes con carcinoma pulmonar no célula pequeña con afectación ganglionar histológica
Grupo D: pacientes elegidos con adenocarcinoma o carcinoma escamoso confirmado y con muestras de tumor y pulmón normal apareados
GSTA1: *glutathione S-transferase alpha 1*
GSTP1: *glutathione S-transferase pi 1*
GTP: *guanosina trifosfato*
GTPase: *hydrolase enzyme to guanosine triphosphate*
Gy: *gray o grays*
G1: *gap 1*

H

h: hora u horas
HAA: hiperplasia adenomatosa atípica
HER2: *erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, ERBB2.*
HES1: *hes family bHLH transcription factor 1*
HEXIM1: *hexamethylene bis-acetamide inducible 1*
HGF: *hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor).*
HIF1A: *hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor).*
HIP: *hedgehog interactin protein*
HIST1H4F: *histone cluster 1, H4f.*
HK: *housekeeping, gen de referencia.*
HMMR: *hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)*
HNF3B: *hepatocyte nuclear factor 3β, factor nuclear de los hepatocitos 3β.*
HOX: *homeobox*
HOXA9: *homeobox A9*
HOXA11: *homeobox A11*
HOXB7: *homeobox B7*
HPCAL4: *hippocalcin like 4*
HR: *hazard ratio*
HRAS: *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*
Hs: *homo sapiens*
HSD17B3: *hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3*
HSPG2: *heparan sulfate proteoglycan 2*
HUB: Hospital Universitari de Bellvitge
H₂O: agua

I

IASLC: *International Association for the Study of Lung Cancer*
IC: intervalo de confianza
ICO: Institut Català d'Oncologia
ICS: Institut Català de la Salut
IDIBELL: Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge
IE: infraexpresión
IF: inmunofluorescencia
IFI44: *interferon-induced protein 44*
Ig: inmunoglobulinas
IgC: dominio similar a inmunoglobulinas constante
IGFBP3: *insulin-like growth factor bindint protein 3*
IGFR1: *insulin growth factor receptor 1*
IgV: dominio similar a inmunoglobulinas variable
IH: inmunohistoquímica
IKBKAP: *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein.*
IKK: *inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase.*
IL: Illinois
IL6: *interleukin 6*
IL11: *interleukin 11*
Inc.: *incorporation*
IP08: *importin 8*
IP3: *inositol 1,4,5-trisphosphate.*
IQR: *interquartilic range, rango intercuartílico.*
IRF4: *interferon regulatory factor 4*

J

JAK: *janus kinase*
JNK: *mitogen activated protein kinase 8, MAPK8.*

K

kDA: kilodalton
KEAP1: *kelch-like ECH-associated protein 1*
KGFR: *keratinocyte growth factor receptor, FGFR2b.*
KIAA1201: *GRAM domain containing 1B, GRAMD1B.*
KRAS: *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
KRT5: *keratin 5, type II ó citoqueratina 5*
KRT7: *keratin 7, type II ó citoqueratina 7*
KRT8: *keratin 8, type II ó citoqueratina 8*
KRT13: *keratin 13, type I ó citoqueratina 13*
KRT14: *keratin 14, type I ó citoqueratina 14*
KRT15: *keratin 15, type I ó citoqueratina 15*
KRT16: *keratin 16, type I ó citoqueratina 16*
KRT18: *keratin 18, type I ó citoqueratina 18*
KRT19: *keratin 19, type I ó citoqueratina 19*
KRT20: *keratin 20, type I ó citoqueratina 20*
KS1/4: *epithelial cell adhesion molecule, EPCAM.*
Kw: test de Kruskal Wallis

L

L: *left, izquierdo; leucina, según el contexto.*
LCK: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase proto-oncogene, Src family tyrosine kinase.*
LEOPARD: lentígino, anomalías en el electrocardiograma, hipertelorismo ocular, estenosis pulmonar, alteraciones genitales y sordera.

LID: lóbulo pulmonar inferior derecho
LII: lóbulo pulmonar inferior izquierdo
LKB1: *serine/threonine kinase 11, STK11.*
LM: lóbulo pulmonar medio
Log: logaritmo
LRT-1: Laboratori de Recerca Translacional 1, Hospital Duran i Reynals, Institut Català d'Oncologia.
LSD: lóbulo pulmonar superior derecho
LSI: lóbulo pulmonar superior izquierdo
LTB4: *leukotriene B4*
L1CAM: *L1 cell adhesion molecule*

M

M: descriptivo metástasis, marcador o metionina según contexto.
m: eficiencia de la reacción o pendiente de la recta patrón
MAGEA1-6: *melanoma antigen family A1 to 6*
MAGEA10: *melanoma antigen family A10*
MAPK: *mitogen-activated protein kinase*
MAPKKK: *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*
MAPK1: *mitogen-activated protein kinase 1*
MAPK3: *mitogen-activated protein kinase 3*
MAPK8: *mitogen-activated protein kinase 8*
MAP2K: *mitogen-activated protein kinase kinase*
MAP2K1: *mitogen-activated protein kinase kinase 1*
MAP2K2: *mitogen-activated protein kinase kinase 2*
MAP3K: *mitogen-activated protein kinase kinase kinase*
MAX: *MYC associated factor X*
MB: *myoglobin, mioglobina.*
MCL1: *myeloid cell leukemia 1*
MCM4: *minichromosome maintenance complex component 4*
MCM6: *minichromosome maintenance complex component 6*
MDM2: *MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase.*
MED12: *mediator complex subunit 12*
MEK: *mitogen-activated protein kinase kinase* **MEK1:** *mitogen-activated protein kinase kinase 1*
MEK2: *mitogen-activated protein kinase kinase 2*
MER: *MER proto-oncogene, tyrosine kinase, MERTK.*
MERTK: *MER proto-oncogene, tyrosine kinase.*
MET: *MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase.*
MgCl₂: cloruro de magnesio
MGMT: *O-6-methylguanine DNA methyltransferase*
microRNA: *microrribonucleic acid*
min: minutos
MIQE: *minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments*
miRNA: *microrribonucleic acid*
mg: miligramos
mL: mililitros
MLANA: *melan-A*
MLPA: *multiplex ligation dependent probe amplification*
mm: milímetros
MMD: *monocyte to macrophage differentiation-associated*

MLLV RT: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
MMP2: *matrix metalloproteinase 2*
MMP7: *matrix metalloproteinase 7*
MMR: *mismatch repair*
MMTV: *family with sequence similarity 89, Fam89b.*
Mol-: no afectación molecular ganglionar
Mol+ N1: afectación molecular ganglionar a nivel hiliar y/o intrapulmonar
Mol+ N1-2: afectación molecular ganglionar a nivel hiliar y/o intrapulmonar y/o mediastino
Mol+ N2: afectación molecular ganglionar a nivel mediastínico
mRNA: *messenger ribonucleic acid, ácido ribonucleico mensajero.*
MSP: *methylation-specific PCR*
MTOR: *mechanistic target of rapamicin*
MTOR1: *mechanistic target of rapamicin 1*
MTOR2: *mechanistic target of rapamicin 2*
MUC1: *mucin 1, cell surface associated.*
MYC: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*
MYCL: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene lung carcinoma derived homolog 1*
MYCN: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog*
MYCN-βA: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog* normalizado por la βactina
MYCN-β2M: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma derived homolog* normalizado por la β2microglobulina
MYNN: *myoneurin*
MYT1L: *myelin transcription factor 1-like*

N

N: descriptivo ganglios o expresión normal, según el contexto.
n: número de pacientes o muestras, según la tabla; número de ciclos, según convino.
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
NCI: *National Cancer Institute*
ND: no disponible
NDRG1: *N-myc downstream regulated 1*
NDRG2: *NDRG family member 2*
NER: *nucleotide-excision repair*
NF: no factible
NFAT: *nuclear factor of activated T-cells*
NFE2L2: *nuclear factor, erythroid 2-like 2.*
NFKB: *nuclear factor kappa B*
NF1: *neurofibomin 1*
ng: nanogramo o nanogramos
NGFR: *nerve growth factor receptor*
NK: *célula natural killer*
NPBWR1: *neuropeptides B/w receptor 1*
NPY: *neuropeptide Y*
NRAS: *neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*

NTRK: *neurotrophic tyrosine kinase, receptor*.
NUDCD1: *Nuclear distribution protein C (NudC) domain containing 1*

O

OCDF1: *solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 4*.
OCT: *optimal cutting temperature compound*
OH: *oligonucleotide hybridization*
OECD: *Organization for Economic Co-operation and Development*
Oligo-dT: secuencia corta de desoxitimidina
OMDM: *O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase*.
OMS: Organización Mundial de la Salud
OR: *odds ratio*
OS: *overall survival*, supervivencia global.

P

PAAF: punción aspiración con aguja fina
PAP2: *MYB binding protein (p160) 1a*
PCDHGB6: *protocadherin gamma subfamily B, 6*.
PCR: *polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.
PDCD1: *programmed cell death 1*
PDGFR: *platelet-derived growth factor receptor*
PDGFRA: *platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide*.
PD1: *programmed cell death 1, PDCD1*.
PDL1: *programmed death ligand 1, CD274 molecule*.
PEA15: *phosphoprotein enriched in astrocytes 15*
PET: *positron emission tomography*, tomografía por emisión de positrones.
PET-TC: *positron emission tomography associated with computed tomography*, tomografía por emisión de positrones asociada a tomografía computadorizada.
PGFR: *platelet growth factor receptor*
PIK3: *phosphoinositide 3-kinase*
PIK3CA: *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*.
PIK3R1: *phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)*.
PIK3R2: *phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)*.
PIM1: *pim-1 proto-oncogene, serine-threonine kinase*.
PIP₃: *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*.
PIWIL1: *piwi-like RNA-mediated gene silencing 1*
PLAGL2: *pleiomorphic adenoma gene-like 2*
PLCG1: *phospholipase C, gamma 1*.
PLUNC: *BPI fold containing family A, member 1, BPIFA1*.
pM: descriptivo metástasis en la estadificación quirúrgica y patológica
pN: descriptivo adenopatías en la estadificación quirúrgica y patológica
pN0(mol-): ganglios sin afectación histológica y sin afectación molecular
pN0(mol+): ganglios sin afectación histológica pero con afectación molecular
pN0(mol+ N1): ganglios sin afectación histológica pero con afectación molecular a nivel hiliar-pulmonar

pN0(mol+ N1-N2): ganglios sin afectación histológica pero con afectación molecular
pN0(mol+ N2): ganglios sin afectación histológica pero con afectación molecular a nivel mediastínico
pN1(mol- N2): algún ganglio hiliar o intrapulmonar con afectación histológica; ganglios mediastínicos asociados sin afectación molecular.
pN1(mol+ N2): algún ganglio hiliar o intrapulmonar con afectación histológica; ganglios mediastínicos asociados con afectación molecular.
poliA: poliadenosina
PPIA: *peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)*
PRKC: *protein kinase C*
PRKCIL: *protein kinase C iota/lambda*
PROM1: *prominin 1*
proSpB: *precursor surfactant B*
proSpC: *precursor surfactant C*
PRSS25: *HtrA serine peptidase 2*
PS: *performance status*
PSG: *pregnancy-specific glycoprotein*
pT: descriptivo tumor primario en la estadificación quirúrgica y patológica
PTB: *phosphotyrosine binding domain*
PTCH1: *patched 1*
PTCH2: *patched 2*
PTEN: *phosphatase and tensin homolog*
PTGES: *prostaglandin E synthase*
PTH LH: *parathyroid hormone-like hormone*
PTK: *protein tyrosine kinase*
pTNM: clasificación o estadificación quirúrgica y patológica
PTP: *protein tyrosine phosphatase*
PTPN11: *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*.
PVA: *pemphigus vulgaris antigen*
PVT1: *pvt1 oncogene (non-protein coding)*
PXN: *paxilin*
PYCARD: *PYD and CARD domain containing*

Q

qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*
QT: quimioterapia
Q3-Q1: rango intercuartilico

R

R: *right*, derecho; arginina; error medio, según el contexto.
RAF: *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*
RAF1: *Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase*.
RARB: *retinoic acid receptor, beta*.
RAS: *rat sarcoma viral oncogene homolog*
RASA1: *RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1*
RASSF1A: *Ras association domain family member 1A*
RB: *retinoblastoma*
RBM10: *RNA binding motif protein 10*
RB1: *retinoblastoma 1*
REG1A: *regenerating islet-derived 1 alpha*
REMARK: *reporting recommendations for tumor marker prognostic studies*

RET: *ret proto-oncogene*
RHAMM: *receptor for hyaluronic acid-mediated motility*
RHOD: *RAS homolog family member D*
RhoGDI: *Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha, ARHGDI A*
RIT1: *Ras-like without CAAX 1*
R_n: cantidad de señal fluorescente después de n ciclos
RNA: *ribonucleic acid*
Rnase: *ribonuclease*
RNASE7: *ribonuclease, RNase A family, 7*
RND3: *Rho family GTPase 3*
RNF4: *ring finger protein 4*
ROC: *receiver operating characteristic*
ROS1: *ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase*
RR: riesgo relativo
RRM1: *ribonucleotide reductase M1*
RRM2: *ribonucleotide reductase M2*
RT: *radioterapia, reverse transcription* (transcripción inversa), *reverse transcriptase* (transcriptasa inversa) según el contexto.
RTK: receptor tirosina quinasa
RT-PCR: *reverse transcription polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa previa.
RT-qPCR: *reverse transcription quantitative polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa previa y detección cuantitativa en tiempo real.
RUNX3: *runt-related transcription factor 3*
R₀: cantidad de señal fluorescente después de 0 ciclos

S

S: *synthesis*, replicación de DNA; sensibilidad, según el contexto.
s: segundos
SAGE: *Serial analysis of gene expression*
SAP: *Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung*; Sistemas, Aplicaciones y Productos en Procesamiento de Datos.
SBRT: *stereotactic body radiation therapy*
SCAT: *Spanish customized adjuvant treatment*
SCGB3A1: *secretoglobin, family 3A, member 1*
SD: *standard deviation*, desviación estándar.
SE: sobreexpresión
SEMA6A: *sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A*
SERPINB5: *serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5*
SETD2: *SET domain containing 2*
SFK: *SRC proto-oncogene non receptor tyrosine kinase, family kinases*
SFTP: *surfactant protein*
SFTPC: *surfactant protein C*
SFTPC-βA: *surfactant protein C* normalizada por la βactina
SFTPC-β2M: *surfactant protein C* normalizada por la β2microglobulina
SFTPD: *surfactant protein D*
SF3B1: *splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa*
SG: supervivencia global
SHH: *sonic hedgehog*
SHH-βA: *sonic hedgehog* normalizado por la βactina
SHH-β2M: *sonic hedgehog* normalizado por la β2microglobulina
SHP2: *shatterproof 2, PTPN11*
SHP2-βA: *shatterproof 2* normalizada por la βactina
SHP2-β2M: *shatterproof 2* normalizada por la β2microglobulina
shRNA: *short hairpin RNA*
SH2: *SRC homology 2*
SH3BGR: *SH3 domain binding glutamate-rich protein*
SIGLEC9: *sialic acid binding Ig-like lectin 9*
SLC1A7: *solute carrier family 1 (glutamate transporter), member 7*
SLC4A1: *solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1*
SLC4A3: *solute carrier family 4 (anion exchanger), member 3*
SLC7A5: *solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5*
SLIT: *slit homolog (Drosophila)*
SLITRK4: *SLIT and NTRK-like family, member 4*
SMAD: *mothers against DPP homolog (Drosophila)*
SMAD1: *SMAD family member 1*
SMAD2: *SMAD family member 2*
SMAD3: *SMAD family member 3*
SMAD4: *SMAD family member 4*
SMAD5: *SMAD family member 5*
SMAD8: *SMAD family member 8*
SMARCA4: *Swi/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4*
SMO: *smoothed, frizzled class receptor*
SNF: *sucrose non-fermenting*
SNP: *single nucleotide polymorphisms*
SOS: *son of sevenless*
SOX: *SRY (sex determining region Y)-box*
SOX2: *SRY (sex determining region Y)-box 2*
SOX3: *SRY (sex determining region Y)-box 3*
SOX4: *SRY (sex determining region Y)-box 4*
SOX7: *SRY (sex determining region Y)-box 7*
SOX9: *SRY (sex determining region Y)-box 9*
SOX11: *SRY (sex determining region Y)-box 11*
SOX17: *SRY (sex determining region Y)-box 17*
SOX17-βA: *SRY (sex determining region Y)-box 17* normalizado por la βactina
SOX17-β2M: *SRY (sex determining region Y)-box 17* normalizado por la β2microglobulina
SOX18: *SRY (sex determining region Y)-box 18*
S/P: según primer
SpC: *surfactant protein C, SFTPC*
SPECS: *strategic partnering to evaluate cancer signatures*
SPRR1A: *small proline-rich protein 1A*
SPRR1B: *small proline-rich protein 1B*
SPRR2A: *small proline-rich protein 2A*
SPRY2: *sprouty homolog 2 (Drosophila)*

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*
SRC: *SRC proto-oncogene non receptor tyrosine kinase*
STARD: *standards for reporting of diagnostic accuracy*
STAT: *signal transducer and activator of transcription*
STAT1: *signal transducer and activator of transcription 1*
STAT2: *signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa.*
STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)*
STK11: *serine/threonine kinase 11*
STMN2: *stathmin 2*
STX1A: *syntaxin 1A (brain)*
SuFu: *supressor of fused*
SUV: *standard uptake value*
SUVmax: *maximum standardized uptake value*
s/variable: según variable
SwI: *switching*
S100A10: *S100 calcium binding protein A10*

T

T: descriptivo tumor primario, treonina, timina, según el contexto.
TACSTD1: *tumor-associated calcium signal transducer 1, epitelial cell adhesion molecule, EPCAM.*
TACSTD2: *tumor-associated calcium signal transducer 2*
TB: *tasa bruta*
TBNA: *transbronchial needle aspiration*
TBP: *TATA box binding protein*
TC: *tomografía computadorizada*
TCGA: *The cancer genome atlas*
TE: *tasa estandarizada por población mundial.*
TEMLA: *transcervical extended mediastinal lymphadenectomy*
TGFB: *transforming growth factor beta*
TGFB1: *transforming growth factor, beta 1.*
TGFB2: *transforming growth factor, beta 2.*
TGFB3: *transforming growth factor, beta 3.*
TIMP: *plasma tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*
TIMP3: *TIMP metalloproteinase inhibitor 3*
TK: *tirosine kinase*
TKI: *tyrosine kinase inhibitor, inhibidor de la tirosina quinasa.*
TK1: *thymidine kinase 1, soluble.*
TLE: *tiempo libre de enfermedad*
TM: *tumores mixtos*
Tm: *melting temperature, temperatura de fusión.*
TMEM52B: *transmembrane protein 52B*
TMS1: *PYD and CARD domain containing*
TNFSF10: *tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10.*
TNM: *Tumor, node and metástasis classification of malignant tumors, clasificación tumor, adenopatías y metástasis de los tumores malignos.*
TOP2A: *topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa*
TPA: *tissue polypeptide antigen*
TPCA1: *2-[(aminocarbonylamino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxaminde*
TP63: *tumor protein p63*
TRIM14: *tripartite motif containing 14*

TRIM29: *tripartite motif containing 29*
TSC: *tuberous sclerosis complex*
TSC1: *tuberous sclerosis 1*
TSC2: *tuberous sclerosis 2*
TTF-1: *thyroid transcription factor 1, factor de transcripción tiroideo 1.*
TWIST1: *twist family bHLH transcription factor 1*

U

UBE2S: *ubiquitin-conjugating enzyme E2S*
UICC: *Union Internationale Contre le Cancer*
UMPS: *uridine monophosphate synthetase*
USA: *United States of America*
U2AF1: *U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1*

V

VAMLA: *video assisted mediastinal lymphadenectomy*
VEGFA: *vascular endothelial growth factor A*
VEGFB: *vascular endothelial growth factor B*
VEGFC: *vascular endothelial growth factor C*
VEGFD: *vascular endothelial growth factor D, c-fos induced growth factor, FIGF.*
VEGFR: *vascular endothelial growth factor receptor*
VEGFR3: *vascular endothelial growth factor receptor 3*
VPN: *valor predictivo negativo*
VPP: *valor predictivo positivo*
vs: *versus*

W

WNT: *wingless-type MMTV integration site family*
WNT3: *wingless-type MMTV integration site family, member 3A.*

X

XPO7: *exportin 7*

Y

Y: *tirosina*
y: *concentración absoluta*
YAP1: *Yes-associated protein 1*

Z

ZEB1: *zinc finger E-box binding homeobox 1*
ZNF236: *zinc finger protein 236*
ZNF264: *zinc finger protein 264*

β

β2M: *β2microglobulina*
βA: *βactina*

M

μg: *microgramos*
μL: *microlitros*
μmol: *micromoles*

NÚMEROS Y SÍMBOLOS

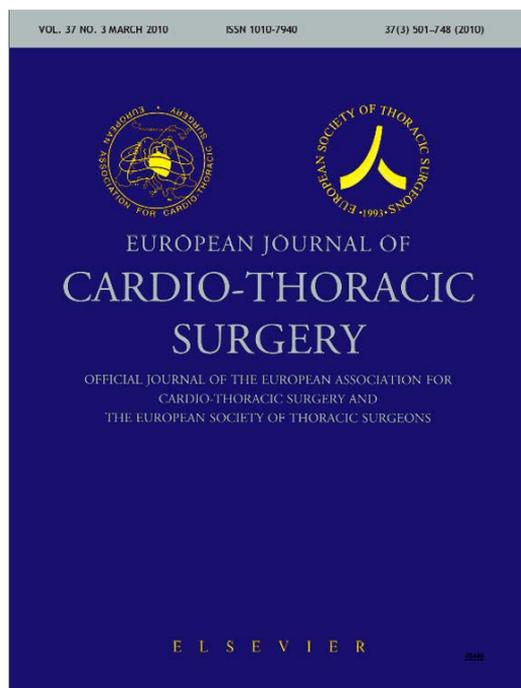
2^{-ΔΔC_t}: método de comparación de C_t
+: *positivo*
-: *negativo*

Anexos

Anexo 1. Artículo

Artículo "Quality study of a lung cancer committee: study of agreement between preoperative and pathological staging", **publicado en la revista European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2010; 37(3): 540-545.**

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

Author's personal copy



European Journal of Cardio-thoracic Surgery 37 (2010) 540–545

EUROPEAN JOURNAL OF
CARDIO-THORACIC
SURGERY

www.elsevier.com/locate/ejcts

Quality study of a lung cancer committee: study of agreement between preoperative and pathological staging

Ivan Macia^{a,*}, Juan Moya^b, Ignacio Escobar^b, Ricard Ramos^b, Cristina Masuet^c,
Cristina Gamez^d, Roger Llatjos^e, Ignacio Martinez-Ballarín^f

^aDepartment of Thoracic Surgery, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^bDepartment of Thoracic Surgery and School of Medicine of the University of Barcelona, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^cDepartment of Preventive Medicine and Biostatistics, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^dPET-CT Unit, Institut de Diagnòstic per la Imatge, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^eDepartment of Pathology, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

^fDepartment of Pulmonology, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals-Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Received 5 April 2009; received in revised form 29 June 2009; accepted 13 July 2009; Available online 21 August 2009

Abstract

Objective: Accurate preoperative staging is essential to provide the best treatment for lung cancer. The objective of the present study was to determine agreement between preoperative and surgical–pathological staging and to analyse the impact of any disparity on treatment. **Methods:** This is a descriptive study of a series of 176 lung cancer cases treated by surgery between 2005 and 2007. Preoperative staging was based on clinical information and computed tomography (CT), positron emission tomography (PET), PET-CT, bronchoscopy and mediastinoscopy. In all cases, surgical–pathological staging was based on the analysis of surgical samples and the findings during surgery. Both preoperative and pathological stage determination were based on the TNM (tumour, node, metastasis) classification established in 1997. Concordance was measured by calculating agreement rates and the kappa value. **Results:** Preoperative and surgical–pathological staging agreed in 102 cases, an agreement rate of 58% and kappa value of 0.54 (95% confidence interval (CI) 0.44–0.63). The highest kappa value (0.68, 95% CI 0.53–0.82) was obtained in stage IA patients. Patients who underwent PET or PET-CT had a better kappa index (0.56, 95% CI 0.45–0.67, vs 0.39, 95% CI 0.21–0.56). Surgical–pathological staging validated surgery in 145 cases (82%), while 21 (12%) were revised to stage IIIA N2 and 10 (6%) to non-surgical stages. **Conclusions:** Global agreement between preoperative and surgical–pathological staging was moderate. The best agreement was found in stages IV and IA.

© 2009 European Association for Cardio-Thoracic Surgery. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bronchogenic carcinoma; Neoplasm staging; Preoperative staging; Surgical–pathological staging; Surgery

1. Introduction

Accurate preoperative staging in bronchogenic carcinoma is essential in determining the true extent of disease; moreover, it is crucial if we are to provide patients with optimal treatment and a realistic prognosis. It is therefore imperative that preoperative staging coincide closely with pathological staging, which uses information obtained during surgery to provide the most accurate picture of disease extension. Preoperative and surgical–pathological staging

are currently based on the revised tumour-node-metastasis (TNM) classification system established by the American Joint Committee on Cancer (AJCC) and the International Union Against Cancer (UICC), which has been in effect since 1997 [1], although revised criteria have been proposed for 2009 [2]. According to the published studies, agreement rates range from 35% to 50% [3].

Preoperative staging has improved markedly in recent years with the emergence of new tools such as positron emission tomography (PET), used alone or in with computed tomography (PET-CT), virtual bronchoscopy, endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA) and endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of the upper digestive tract (EUS-FNA).

* Corresponding author. Address: Feixa Llarga, s/n 08907, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel.: +34 932607700; fax: +34 932607983.
E-mail address: ivanmacia@yahoo.com (I. Macia).

Author's personal copy

I. Macia et al. / *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 37 (2010) 540–545

541

The aim of the present study was to determine the degree of agreement between preoperative and surgical–pathological staging in bronchogenic carcinoma and to analyse the consequences of diagnostic connection with the surgical treatment carried out. This is not a study to assess, compare or validate tools like PET, CT, mediastinoscopy or EBUS; furthermore, this study does not expect to validate predictors of the descriptors T, N or M.

This is only a quality study of the staging carried out by a hospital lung cancer board (Lung Functional Unit) and the impact of these decisions in the surgical treatment performed.

2. Material and methods

2.1. Sample

This is a descriptive study of 176 patients diagnosed with lung cancer and treated by surgery with curative intent at our hospital between July 2005 and August 2007. Of the 176 cases, 173 had no prior history of lung cancer while three were second lung tumours (two of which were metachronous and one synchronous).

2.2. Inclusion and exclusion criteria

The initial sample included 190 patients who underwent surgery with curative intent for lung cancer. Prior to surgery, all patients presented a lung nodule suggestive of malignancy or a histologically confirmed neoplasm. Exclusion criteria were as follows: inability to determine one of the TNM descriptors during preoperative or pathologic staging (five cases); complete pathological response after neo-adjuvant treatment (two cases); exploratory thoracotomy (six cases), and stage 0 (one case). During the inclusion period, six additional patients underwent surgery due to a lung tumour recurrence while one patient had surgery for lung metastasis; none of these cases were included in the study.

All 176 patients in our series underwent both preoperative and pathological staging according to the guidelines published in the 6th edition of the TNM classification of malignant tumours, accepted by the UICC and AJCC for lung cancer and in effect since 1997 [1]. In the present study, preoperative staging was performed prior to surgery with curative intent under the supervision of the lung tumour board at our hospital. The tumour committee consists of a multidisciplinary team with specialists in respiratory medicine, radiodiagnostics, nuclear medicine, thoracic surgery, pathology, medical oncology and radiation oncology. Staging was performed by evaluating data from patient medical records and physical examination, bronchoscopy, chest radiograph, contrast-enhanced CT of the chest and upper abdomen, PET in two cases (1%), PET-CT in 135 cases (77%), mediastinoscopy in seven cases (4%) and brain magnetic resonance imaging (MRI) in cases with adenocarcinoma and/or clinical suspicion of advanced stage. Bone scintigraphy was not performed because PET scans are reported to be better than scintigraphy at detecting bone metastasis [4].

To determine whether the primary tumour (T) had invaded the mediastinum, we used the following criteria for no

invasion: less than 3 cm of tumour in contact with the mediastinum, presence of a fatty layer between the tumour and the mediastinum and less than 90° of circumferential contact with the aorta [5]. Cytological samples were obtained by bronchoscopic aspiration. Whenever possible, biopsy of the primary tumour was performed by bronchoscopy and/or CT-guided fine-needle aspiration (FNA) to obtain histological diagnosis prior to surgery.

For lymph node staging (N), all patients with a PET or PET-CT scan without evidence of thoracic or supraclavicular nodal uptake were considered cN0 as were patients with nodal uptake (after visual and semi-quantitative analysis and determination of the maximum standard uptake value (SUVmax)) of the radiolabelled glucose analogue fluorodeoxyglucose (FDG) at the mediastinal level but with a negative biopsy on mediastinoscopy. Evidence of uptake at the hilar level on the PET or PET-CT scan was considered sufficient for cN1 (hilar lymph node involvement) classification. Patients with positive mediastinal nodes on biopsy were considered cN2, although in certain cases we elected to perform surgery despite nodal involvement, for these cases, uptake identified by PET or PET-CT was deemed sufficient for cN2 classification.

To confirm the presence of neoplastic disease, all patients with evidence of mediastinal node uptake on PET or PET-CT underwent mediastinoscopy. If no evidence of disease was found on pathological examination of the resected samples, the patient was considered eligible for surgery, provided that assessment of the T and M descriptors supported this option. However, patients with confirmed nodal involvement were prescribed neo-adjuvant chemotherapy (with or without radiotherapy), after which restaging was performed. In cases without PET or PET-CT scan, nodal involvement detected by CT scan was considered pathological if the smallest diameter was greater than 1 cm in all nodal stations, except for the subcarinal level, where the minimum was 1.5 cm.

PET or PET-CT scans were used to assess distant metastasis (descriptor M). If FDG uptake suggestive of malignancy was detected in any region of the body, a comprehensive physical examination—including additional imaging tests and extraction of histological material (generally with fine-needle aspiration)—was performed. Other tests to rule out distant metastasis were performed in certain cases. In this study, all cases included with metastasis underwent resection of the metastatic tumour prior to thoracic surgery.

Patients at preoperative stages I, II and IIIA with hilar node involvement were deemed surgical candidates. Under certain conditions, other patients were also accepted for surgery: stage IIIA patients with mediastinal node involvement (major haemoptysis or involvement of a single station on PET or PET-CT with reduced metabolic activity of the affected nodes after neo-adjuvant treatment); stage IIIB cases with a diseased satellite node in the same lobe or vertebral involvement without mediastinal node involvement; stage IV patients with a single resectable brain metastasis; and patients with a single resectable suprarenal metastasis.

The 176 cases in our study underwent thoracotomy, lung resection and hilar and mediastinal lymphadenectomy. The lymphadenectomy was more than sampling [6,7]; all lymph nodes that were seen during surgery were removed. At least, lymph node stations must be explored and the lymph node

Author's personal copy

542

I. Macía et al. / European Journal of Cardio-thoracic Surgery 37 (2010) 540–545

removed at the anatomic level of the hilum and mediastinum (topographic) that correspond to the specimen (the lobe with the tumour) or lung section to be extirpated; at least three hilar lymph nodes and three mediastinal lymph node stations from these levels should be evaluated pathologically.

Fourteen patients (8%) received chemotherapy prior to surgery.

To assess the resected samples for pathology, all lymph nodes were individualised, fixed in 10% formaldehyde and completely embedded in paraffin. The paraffin blocks were cut into numerous 3- μ m sections (from two to eight sections per block) and then subjected to deparaffination and rehydration followed by conventional haematoxylin and eosin staining. Histological evaluation was performed by a single observer. Pathological staging, which followed the same TNM classification system used for preoperative staging, took into consideration information gathered during surgery.

2.3. Data collection

A rigorous protocol which included the following information: administrative data, demographic data, toxic habits, co-morbidities, additional tests performed, treatments prior to surgery, preoperative staging, surgery performed, pathological staging, histology and tumour location was developed for patient data collection.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis included descriptive statistics and agreement analysis. To compare the results of preoperative and pathological staging, the kappa index and the agreement rate (the number of cases in which preoperative and pathological staging coincided divided by the number of cases that underwent preoperative staging) were calculated. We have calculated global kappa and κ individual kappas for each category, named weighted kappa by Cohen [8].

According to published criteria, a kappa value less than 0 implies poor agreement; 0–0.2 indicates slight agreement; 0.21–0.4, fair; 0.41–0.6, moderate; 0.61–0.8, substantial and greater than 0.8 almost perfect agreement [9]. Statistical analysis was performed with SPSS[®] 12.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All patients signed the informed consent form and our institutional ethics committee on human research approved the study.

3. Results

Descriptive analysis of the population revealed 158 men (90%) and 18 women (10%), with a mean age of 62 years and a median age of 63 (range, 40–81 years) and a standard deviation of ± 9.4 years. Of these 176 patients, 89% were current or previous smokers and 1% were passive smokers. In addition, 47% had a prior history of respiratory disease and 46% a history of cardiocirculatory problems. Sixteen percent of the sample had a prior history of cancer. The remaining characteristics are described in Table 1. All patients underwent both preoperative and pathological staging (Table 2).

Table 1
Patient characteristics.

		n ^a	% ^b
Histology	Adenocarcinoma	66	38
	Squamous cell carcinoma	58	33
	Bronchioloalveolar adenocarcinoma	17	10
	Large-cell carcinoma	16	9
	Small-cell carcinoma	4	2
	Miscellaneous	15	8
Tumour location	Upper left lobe	56	32
	Upper right lobe	53	30
	Lower left lobe	36	21
	Lower right lobe	25	14
	Main and intermediate bronchi	4	2
	Middle lobe	2	1
Resection performed	Segmentectomy	7	4
	Standard and extended lobectomy	144	82
	Bilobectomy	7	4
	Standard and expanded pneumonectomy	18	10

^a n, number of patients.

^b %, percentage of patients.

Stage IB was the most common preoperative stage and stage IA the most common pathological stage. Mean time between preoperative staging and surgery was 21 days, with a median of 20 days (range, 2–66 days).

Preoperative and pathological staging coincided in 102 cases (Table 2) for an overall agreement rate of 58% and kappa value of 0.54, 95% CI 0.44–0.63. The agreement rate and kappa value for each stage are shown in Table 3. Stage IV had the highest agreement (100%), followed by stage IA (75%), although the best kappa index was observed in stage IA (0.68, 95% CI 0.53–0.82).

Preoperative understaging occurred in 53 cases (30%) and overstaging in 21 cases (12%). Of the 53 understaged cases, pathological examination confirmed that 22 (41% of that group) were surgical stages, while 21 (40%) were stage IIIA with mediastinal node involvement and 10 (19%) were stages IIIB or IV. All the overstaged cases were surgical candidates.

Preoperative and pathological staging for the descriptor T (primary tumour) coincided in 127 cases, for an agreement of

Table 2
Distribution by preoperative and pathological staging.

	cTNM ^a							Total	% ^d
	IA	IB	IIA	IIB	IIIA ^c	IIIB	IV		
pTNM ^b									
IA	38	10	0	0	0	0	0	48	27
IB	4	33	0	4	2	0	0	43	25
IIA	1	0	1	1	1	0	0	4	2
IIB	1	15	0	18	1	2	0	37	21
IIIA	5	8	1	8	6	0	0	28	16
IIIB	0	0	0	1	2	1	0	4	2
IV	2	2	0	1	1	1	5	12	7
Total	51	68	2	33	13	4	5	176	100
% ^d	29	39	1	19	7	2	3	100	

^a cTNM, preoperative staging.

^b pTNM, surgical–pathological staging.

^c The 13 cases at preoperative stage IIIA include 3 patients with hilar node involvement and 10 with diseased mediastinal nodes. The 28 cases at pathological stage IIIA include 2 with affected hilar nodes and 26 with mediastinal node involvement.

^d Percentage of cases.

Author's personal copy

I. Macía et al. / European Journal of Cardio-thoracic Surgery 37 (2010) 540–545

543

Table 3
Agreement by stage.

Stage	Agreement rate (%)	Kappa value	95% confidence intervals
IA	75	0.68	0.53–0.82
IB	49	0.42	0.28–0.56
IIA	50	0.32	0.18–0.46
IIB	55	0.39	0.25–0.54
IIIA	46	0.21	0.08–0.34
IIIB	25	0.23	0.09–0.38
IV	100	0.57	0.44–0.70

72% and a kappa value of 0.61 (95% CI 0.50–0.71). For the descriptor N (nodal involvement) agreement between preoperative and pathological staging was confirmed in 123 cases, an agreement of 69% and kappa index of 0.34 (95% CI 0.23–0.44).

For the group of patients who underwent a PET scan (PET alone or PET-CT), in 137 cases, agreement was 57% with a kappa value of 0.56 (95% CI 0.45–0.67). In contrast, agreement for those who did not undergo PET (39 cases) was 62%, with a kappa value of 0.39 (95% CI 0.21–0.56). Taking CIs into consideration, the differences between these two groups were not significant; $p > 0.05$.

After establishing the histological type of the resected tissue, we assessed agreement between preoperative and pathological staging as a function of tumour histology. Agreement between pre- and postoperative histological type was not assessed. The highest agreement (100%) and kappa values (1) were observed in bronchioloalveolar adenocarcinoma. Large-cell carcinoma had the second highest agreement (75%) and kappa values (0.74, 95% CI 0.42–1). Agreement rates for squamous cell carcinoma and adenocarcinoma were 55% and 47%, respectively, with kappa values of 0.55 (95% CI 0.38–0.72) and 0.42 (95% CI 0.26–0.57).

The lowest kappa value (0.14, 95% CI 0.01–0.26) occurred in the group that included the few patients with small-cell lung cancer. Of these four patients, there were three patients with localised small lung nodule without affected lymph nodes and without metastasis prior to surgery and one patient in whom the histology of small-cell lung cancer was discovered after surgery.

Tumours located in the lower right lobe gave a higher agreement (68%) and the highest kappa value, 0.67 (95% CI 0.41–0.93). The lowest kappa value (0.39, 95% CI 0.21–0.58) was observed in tumours of the lower left lobe. The 162 patients who did not receive neo-adjuvant chemotherapy presented a higher kappa value (0.53, 95% CI 0.43–0.62, vs 0.24, 95% CI 0.04–0.53) than those who received chemotherapy prior to surgery.

All patients underwent surgery, as described in Section 2.2. The pathology report confirmed that surgery was correctly indicated in 91 stage I cases, 41 stage II cases and two stage IIIA cases with nodal involvement at the hilum; this in addition to the selected cases at non-surgical stages that were accepted for surgery and confirmed the stage pathologically: five at stage IIIA with mediastinal lymph node involvement, one at stage IIIB and five at stage IV. In other words, 145 cases (82%) correctly underwent surgery according to their final pathological stage. Of the remaining 31 cases, 21 were pathological stage IIIA with diseased

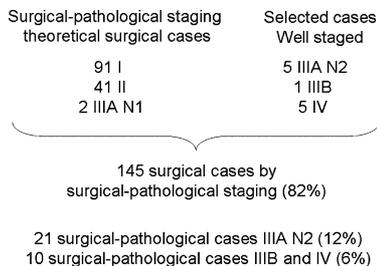


Fig. 1. Distribution of cases by pathological stage and clinical impact.

mediastinal nodes (12% of all cases) and 10 were stage IIIB or IV (6% of the total) (Fig. 1).

4. Discussion

In lung cancer, a preoperative staging that approximates the real anatomical extent of disease allows, *a priori*, each patient to receive optimal treatment. Moreover, with proper staging, the prognosis is realistic. Pathological staging, which includes information gathered during surgery, is the current gold standard in determining disease extension and is one of the main prognostic factors. As a result, obtaining good agreement between preoperative and pathological staging—that is, a high number of cases in which preoperative staging reflects reality—is essential.

The characteristics of the patients included in this study are similar in many ways to those we find in our daily practice in Spain, as evidenced by comparing our sample with the patient data provided by the member hospitals of the Bronchogenic Carcinoma Cooperative Group (GCCB-S) of the Spanish Society of Pulmonology and Thoracic Surgery (SEPAR) [3]. Our sample is similar to the GCCB-S group in many respects: men account for a large percentage of patients in both groups, the mean age (62 years vs 64 years in the GCCB-S) is similar, as is the percentage of current or past smokers (89% vs 87%), and both groups have high rates of respiratory or cardiocirculatory co-morbidities. In addition, distribution among early and late stages is similar in both series, with stage IB being the most common group on preoperative staging in both series. However, differences can be found in histological type—adenocarcinoma was the most common cancer in our study—and in the distribution of lung resections, with a lower percentage of pneumonectomies and more lobectomies in our series [3].

A review of the literature shows that overall agreement between preoperative and pathological staging is low, with reported rates ranging from 22% to 47% [3,10–13] and a kappa value of approximately 0.25 [3]. However, most of these studies did not use a PET scan or PET-CT fusion for preoperative staging. A PET or PET-CT was performed on most patients in our series, mostly as a consequence of the increasingly routine use of such scans at our hospital. The overall agreement (58%) and kappa index (0.54, 95% CI 0.44–0.63)—both of which indicate moderate agreement—observed in our study are better than the figures reported

Author's personal copy

544

I. Macia et al. / *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 37 (2010) 540–545

in other studies. While it is true that agreement was slightly higher in those group patients who did not undergo PET than in those who did, results of the derived kappa index show better agreement in the PET group (0.56, 95% CI 0.45–0.67, vs 0.39, 95% CI 0.21–0.56), although this difference was not significant. This study was not designed to compare PET or PET-CT versus no PET with regard to agreement between preoperative and surgical–pathological staging.

Although PET can be used to assess nodal stations throughout the body, fusion with CT makes more precise determination of the anatomical location. This is possible because fusion scans provide both morphological and metabolic information while CT alone is exclusively morphologic. In addition, with PET-CT, it is possible to identify disease in locations that were not initially suspected of involvement, especially nodal groups. Previously, our group carried out a preliminary study of 68 patients evaluated by PET-CT fusion and we found a high specificity (94%) and a negative predictive value (97%) in mediastinal staging with no association between SUVmax and mediastinal involvement by either PET-CT or surgery. However, some groups have found SUVmax to be a prognostic factor in lung cancer; with a higher SUVmax associated with a worse survival index [14]. Attempts have also been made to establish a specific SUVmax cut-off point that would indicate a higher probability of malignancy [15].

Considering all this, we can deduce that one factor that allows us to achieve a closer approximation to the real extent of the disease is the routine use of PET-CT for preoperative staging [16]. Although PET-CT is not a substitute for other tests, it can serve as a guide for other exploratory techniques that obtain histological material from the mediastinum and the hilum, such as mediastinoscopy and endobronchial ultrasound and endoscopic ultrasound of the upper digestive tract, serving to increase the yield of these techniques. The aim of such techniques is to serve as a complement to improve preoperative staging.

The highest levels of agreement were found at stage I, especially stage IA, with our results similar to those reported in the literature: there was agreement of approximately 60% for stage I and 75% for stage IA [17,18]; with kappa index of approximately 0.70 for stage IA [19]. On the other hand, agreement in more advanced stages—such as stage III—was worse. Stage IV is a special situation because extirpation of the metastasis prior to thoracic surgery influences agreement.

An analysis of the descriptors T and N show higher levels of agreement for T than for N, a fact previously described in the literature, with agreement rates of approximately 70% for the descriptor T and 50% for N [10]. In terms of the kappa index, the results presented here are better than previously reported series in terms of T and N [3]. A limitation of this type of study is the ethical impossibility of fully examining the pathological expression of metastasis since only those organs with a clinical suspicion of metastasis are examined.

It is worth pointing out that agreement analysis of all variables shows the best agreement in patients who did not receive neo-adjuvant chemotherapy and in those with bronchioloalveolar adenocarcinoma of the lower right lobe. The excellent agreement achieved in the 17 cases of bronchioloalveolar adenocarcinoma is surprising given the

considerable reported rate of false negatives on PET scans in such tumours [20]. It would be interesting to see if this agreement is maintained when we have a larger series of patients.

Surgery with curative intent in small-cell lung cancer is a matter of controversy. In this study, the few patients with small-cell lung cancer were selected cases with localised neoplasm or patients in whom the histology of small-cell lung cancer was discovered after surgery.

In cases with no agreement between preoperative and pathological staging, our analysis showed that the tendency was for preoperative understaging, a fact described previously in the literature [3,17]. Notably, about 60% of understaged cases in our series were, in the end, either non-surgical or initially non-surgical, mostly stage IIIA with mediastinal node involvement. When analysing false negatives on PET scans, it is important to keep in mind the poor sensitivity such scans have for detecting nodes smaller than 8 mm, necrosis or cystic components and certain histological types such as bronchioloalveolar adenocarcinoma. All of the overstaged cases were surgical candidates and so staging differences did not affect the therapeutic approach.

Despite the battery of modalities and the use of a variety of different techniques over the years, the information presented here demonstrates that some disease remains undetected. The increasing adoption of virtual bronchoscopy, endobronchial ultrasound and endoscopic ultrasound of the upper digestive tract with FNA as well as tools such as molecular markers should be considered as additional modalities to evaluate the true extent of disease [18,21,22]. Moreover, given the low rate of preoperative overstaging, few surgical candidates are excluded from surgery owing to doubts about resectability.

The most important aspect of the present study is to determine how lack of agreement influences patient treatment [18]. Despite the fact that the level of agreement (58%) in our study was only moderate, 82% of patients received the appropriate treatment. In many cases, stage migration occurred within surgical stages. However, post-surgical evaluation identified 12% of patients in our sample at stage IIIA with mediastinal node involvement who should have received neo-adjuvant treatment followed by subsequent restaging. In addition, 6% of patients should not have undergone surgery at all because they were pathological stage IIIB or IV (Fig. 1).

In terms of possible bias, the inclusion of patients with and without preoperative PET and patients who received neo-adjuvant treatment gave us a heterogeneous group of patients. However, such a diverse sample provides us with a broad view of preoperative and pathological agreement in surgically treated lung cancer.

In conclusion, agreement analysis of preoperative and pathological staging in lung cancer reveals the crude reality: despite our best efforts, preoperative staging is incorrect in approximately half of all patients. Nevertheless, the introduction in recent years of new imaging modalities and techniques has helped—and will continue to help—improve staging. Fortunately, our analysis of the impact of differences between preoperative and pathological staging on patient treatment allows us to make a relatively benign conclusion: surgery is appropriately indicated in most cases and only a

Author's personal copy

small portion of patients should have received a different treatment, at least in regards to the initial treatment. We believe that efforts aimed at extending and standardising newly emerging techniques should continue, and information that such techniques provide should be added to data collected by current techniques and should also be included in staging protocols [23]. Moreover, more research needs to be done to discover new and better ways to assess disease extent and complement the information currently obtained by pathologic staging.

Acknowledgements

Contributors: Susana Padrones^a, Ramón Palmero^b, María Dolores Arnáiz^c, Francesca Martínez-Torrens^d, Fernando Fernández-Alarza^d, Josep Saumench^e, Francisco Rivas^e, Anna Ureña^e, Gabriela Rosado^e, Rosa Villalonga^f

^aDepartment of Pulmonology, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals, Spain.

^bDepartment of Medical Oncology, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals, Spain.

^cDepartment of Radiation Oncology, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals, Spain.

^dDepartment of Radiodiagnosics, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals, Spain.

^eDepartment of Thoracic Surgery, Lung Functional Unit, Hospital Universitari de Bellvitge and Hospital Duran i Reynals, Spain.

^fDepartment of Anesthesiology, Hospital Universitari de Bellvitge, Spain.

References

- [1] Sobin LH, Wittekind CH, editors. UICC International Union Against Cancer, TNM classification of malignant tumours. Hoboken: Wiley & Sons; 2002.
- [2] Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, Postmus PE, Rusch V, Sobin L, International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007;2:706–14.
- [3] Lopez-Encuentra A, Garcia-Lujan R, Rivas JJ, Rodriguez-Rodriguez J, Torres-Lanza J, Varela-Simo G, Bronchogenic Carcinoma Cooperative Group of the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery. Comparison between clinical and pathologic staging in 2,994 cases of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2005;79:974–9.
- [4] Erasmus JJ, Macapinlac HA, Swisher SG. Positron emission tomography imaging in non-small cell lung cancer. *Cancer* 2007;110:2155–68.
- [5] Gamez C, Rosell R, Fernández A, Andia E, Arnáiz MD, Cardenal F, Lorenzo C. PET/CT fusion scan in lung cancer: current recommendations and innovations. *J Thorac Oncol* 2006;1:74–7.
- [6] Lardinois D, De Leyn P, Van Schil P, Rami R, Waller D, Passlick B, Zielinski M, Lerut T, Weder W. ESTS guidelines for intraoperative lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;30:787–92.
- [7] Grupo Cooperativo de Carcinoma Broncogénico de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Intraoperative lymph node staging in bronchogenic carcinoma surgery. Consensus report. *Arch Bronconeumol* 2001;37:495–503.
- [8] Cohen J. Weighted kappa: nominal scale agreement provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol Bull* 1968;70:213–20.
- [9] Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159–74.
- [10] Cetinkaya E, Turna A, Yildiz P, Dodurgali R, Bedirhan MA, Gürses A, Yilmaz V. Comparison of clinical and surgical–pathologic staging of the patients with non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:1000–5.
- [11] Gdeedo A, Van Schil P, Corthouts B, Van Mieghem F, Van Meerbeeck J, Van Marck E. Comparison of imaging TNM [(i)TNM] and pathological TNM [pTNM] in staging of bronchogenic carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;12:224–7.
- [12] Fernandes G, Sucena M, Lombardia E, Machado A, Hespagnol V, Queiroga H. Non small cell lung cancer – comparison between clinical and pathological staging. *Rev Port Pneumol* 2006;12:337–57.
- [13] Fernando HC, Goldstraw P. The accuracy of clinical evaluative intrathoracic staging in lung cancer as assessed by postsurgical pathologic staging. *Cancer* 1990;65:2503–6.
- [14] Berghmans T, Dusart M, Paesmans M, Hossein-Foucher C, Buvat I, Castaigne C, Scherpereel A, Mascaux C, Moreau M, Roelands M, Alard S, Meert AP, Patz Jr EF, Lafitte JJ, Sculier JP, European Lung Cancer Working Party for the IASLC Lung Cancer Staging Project. Primary tumor standardized uptake value (SUVmax) measured on fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) is of prognostic value for survival in non-small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review and meta-analysis (MA) by the European Lung Cancer Working Party for the IASLC Lung Cancer Staging Project. *J Thorac Oncol* 2008;3:6–12.
- [15] Lee BE, Redwine J, Foster C, Abella E, Lown T, Lau D, Follette D. Mediastinoscopy might not be necessary in patients with non-small cell lung cancer with mediastinal lymph nodes having a maximum standardized uptake value of less than 5.3. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;135:615–9.
- [16] Lardinois D, Weder W, Hany TF, Kamel EM, Korom S, Seifert B, von Schulthess GK, Steinert HC. Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computer tomography. *N Engl J Med* 2003;348:2500–7.
- [17] D'Cunha J, Herndon JE, Herzan DL, Patterson GA, Kohman LJ, Harpole DH, Kernstine KH, Kern JA, Green MR, Maddaus MA, Kratzke RA, Cancer and Leukemia Group B. Poor correspondence between clinical and pathologic staging in stage 1 non-small cell lung cancer: results from CALGB 9791, a prospective trial. *Lung Cancer* 2005;48:241–6.
- [18] Cerfolio RJ, Bryant AS, Ojha B, Eloubeidi M. Improving the inaccuracies of clinical staging of patients with NSCLC: a prospective trial. *Ann Thorac Surg* 2005;80:1207–14.
- [19] Santos PA, Rocha RS, Pipkin M, Silveira ML, Cypel M, Rios JO, Pinto JA. Concordance between clinical and pathological staging in patients with stages I or II non-small cell lung cancer subjected to surgical treatment. *J Bras Pneumol* 2007;33:647–54.
- [20] Heyneman LE, Patz EF. PET imaging in patients with bronchioalveolar cell carcinoma. *Lung Cancer* 2002;38:261–6.
- [21] Buendia E, Canto A, Mila J, Mestre M, Bas J, Moya J, Urbizondo L, Santamaria P, Arnau A. Tissue determination of carcinoembryonic antigen. A new approach to lung cancer diagnosis. *Res Surg* 1990;2:76–9.
- [22] Lopez-Encuentra A, Bülzebruck H, Feinstein AR, Motta G, Mountain CF, Naruke T, Sanchez JM, Tsuchiya R, Wittekind C. Tumour staging and classification in lung cancer. Summary of the International Symposium. *Lung Cancer* 2000;29:79–83.
- [23] De Leyn P, Lardinois D, Van Schil PE, Rami-Porta R, Passlick B, Zielinski M, Waller DA, Lerut T, Weder W. ESTS guidelines for preoperative lymph node staging for non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;32:1–8.

Anexo 2. Estadificación y mapa ganglionar

Clasificación TNM de las neoplasias pulmonares	
Descriptivo T	
Tx	El tumor primario no puede ser evaluado. Se ha probado la existencia de un tumor por células malignas en el esputo o en el lavado bronquioalveolar pero no se ha visualizado por imagen o por broncoscopia.
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor \leq 3 cm de eje mayor, rodeado de pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar o lobular. No afecta, por tanto, al bronquio principal. En los pocos casos de tumor que se extiende superficial con un componente invasivo limitado a la pared bronquial, aunque se extienda al bronquio principal.
	T1a Tumor \leq 2 cm de eje mayor
	T1b Tumor (2-3] cm de eje mayor
T2	Tumor (3-7] cm o tumor con cualquiera de las siguientes características: 1.- Afectación del bronquio principal a \geq 2 cm de distancia de la carina. 2.- Invasión de la pleura visceral. 3.- Atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar (subsegmentaria, segmentaria o lobar) pero que no compromete todo el pulmón.
	T2a Tumor de (3-5] cm de eje mayor
	T2b Tumor de (5-7] cm de eje mayor
T3	Tumor $>$ 7 cm o que invade directamente cualquiera de las siguientes estructuras: 1.- Pared torácica, incluyendo los tumores del sulcus superior. 2.- Diafragma 3.- Nervio frénico 4.- Pleura mediastínica 5.- Pericardio parietal 6.- Tumor en el bronquio principal a $<$ 2 cm de la carina pero sin afectarla. 7.- Atelectasia o neumonitis obstructiva que compromete todo el pulmón. 8.- Nódulo o nódulos separados en el mismo nódulo
	Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: 1.- Mediastino 2.- Corazón 3.- Grandes vasos (aorta, vena cava superior, vena cava inferior, tronco pulmonar, porciones intrapericárdicas de la arteria pulmonar derecha e izquierda, porciones intrapericárdicas de las venas pulmonares superiores e inferiores derechas e izquierdas. 4.- Nervio laríngeo recurrente 5.- Esófago 6.- Cuerpo vertebral 7.- Carina Nódulo o nódulos separados en diferentes lóbulos en el mismo hemitórax
Descriptivo N	
Nx	Los ganglios linfáticos no pueden ser evaluados
N0	No afectación neoplásica ganglionar
N1	Metástasis en ganglios linfáticos intrapulmonares, peribronquiales, interlobares o hiliares ipsilaterales. La extensión directa desde el tumor también se considera N1 (en las regiones descritas previamente).
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales
N3	Metástasis en ganglios linfáticos 1.- Mediastínicos contralaterales 2.- Hiliares contralaterales 3.- Escalenos 4.- Supraclaviculares
Descriptivo M	
Mx	Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas
M0	No metástasis a distancia
	Metástasis a distancia
M1	M1a Nódulo en un lóbulo del hemitórax contralateral Nódulos en pleura visceral o parietal Derrame pleural o pericárdico maligno. En caso de derrame sin evidencia de células neoplásicas, sin ser hemáticos ni exudados y cuando la clínica no sugiera malignidad, éste no se considerará M1a.
	M1b Metástasis a distancia, en otros órganos o estructuras diferentes a los citados, aunque sean en el tórax (costilla, vértebra, etc.)

Mapa linfático ganglionar. Estaciones ganglionares.				
Número	Nomenclatura quirúrgica	Descripción y límites	Nomenclatura anatómica	Zonas ganglionares
1R ¹ y L ²	Cervicales bajos Supraclaviculares De la escotadura yugular esternal	Superior: margen inferior del cricoides. Inferior: clavículas y la escotadura yugular esternal. La línea media de la tráquea es el límite entre ganglios derechos e izquierdos.	Mediastínicos anteriores	Zona supraclavicular
2R	Paratraqueales superiores derechos	Se incluyen los ganglios pretraqueales hasta el borde lateral izquierdo de la tráquea. Superior: ápex del pulmón derecho y del espacio pleural, en la línea media, la escotadura yugular esternal. Inferior: intersección del margen caudal de la vena braquiocefálica izquierda con la tráquea.	Laterotraqueales derechos	Zona superior
2L	Paratraqueales superiores izquierdos	Superior: ápex del pulmón derecho y del espacio pleural, en la línea media, la escotadura yugular esternal. Inferior: borde superior del arco aórtico.	Laterotraqueales izquierdos	
3a	Prevasculares	3a derechos. Superior: ápex del tórax. Inferior: carina. Anterior: cara posterior del esternón. Posterior: borde anterior de la vena cava superior. 3a izquierdos. Superior: ápex del tórax. Inferior: carina. Anterior: cara posterior del esternón. Posterior: arteria carótida común izquierda.	Prevasculares	
3p	Retrotraqueales	Superior: ápex del tórax. Inferior: carina.	Retrotraqueales	
4R	Paratraqueales inferiores derechos	Se incluyen los ganglios pretraqueales hasta el borde lateral izquierdo de la tráquea. Superior: intersección del margen caudal de la vena braquiocefálica izquierda con la tráquea. Inferior: borde inferior del arco de la vena álgigos.	Laterotraqueales derechos Pediculares o de la raíz del pulmón	
4L	Paratraqueales inferiores izquierdos	Incluye los ganglios a la izquierda del margen izquierdo de la tráquea, medial al ligamiento arterioso de Botal. Superior: borde superior del arco aórtico. Inferior: borde superior del tronco pulmonar.	Laterotraqueales izquierdos Pediculares o de la raíz del pulmón	
5	Subaórticos (ventana aortopulmonar)	Ganglios subaórticos laterales al ligamento arterioso de Botal. Superior: borde inferior del arco aórtico. Inferior: borde superior del tronco pulmonar.	Mediastínicos anteriores izquierdos	Zona AP
6	Paraaórticos (de la aorta ascendente o frénicos)	Nódulos anteriores y laterales a la aorta ascendente y al arco aórtico. Superior: una línea tangencial al borde superior del arco aórtico. Inferior: borde inferior del arco aórtico.	Mediastínicos anteriores izquierdos Prearteriales Preaortocarotídeos	

1, R: derecho; 2, L: izquierdo

Mapa linfático ganglionar. Estaciones ganglionares.				
Número	Nomenclatura quirúrgica	Descripción y límites	Nomenclatura anatómica	Zonas ganglionares
7	Subcarinales	Superior: cara inferior de la carina. Inferior: límite superior del bronquio lobar inferior izquierdo en la izquierda. Límite inferior del bronquio intermediario en la derecha.	Traqueobronquiales inferiores De la bifurcación Intertraqueobronquiales	Zona subcarinal
8	Paraesofágicos (por debajo de la carina)	Nódulos adyacentes a la pared del esófago, tanto a la derecha como a la izquierda de la línea media, excluyendo los ganglios subcarinales. Superior: límite superior del bronquio lobar inferior izquierdo en la izquierda. Límite inferior del bronquio intermediario en la derecha. Inferior: diafragma.	Mediastínicos posteriores	Zona inferior
9	Del ligamento pulmonar	Superior: vena pulmonar inferior. Inferior: diafragma.	Mediastínicos posteriores, del ligamento triangular	
10R ¹ y L ²	Hiliares	Nódulos adyacentes al bronquio principal y a los vasos hiliares incluyendo las porciones proximales de las venas pulmonares y el tronco pulmonar. Superior: cara inferior del arco de la vena ácigos en la derecha. Borde superior de la arteria pulmonar izquierda en la izquierda. Inferior: espacio interlobar.	Hiliares	Zona hilar e interlobar
11R y L	Interlobares	Entre los orígenes de los bronquios lobares y los vasos adyacentes. 11Rs: entre el bronquio lobar superior derecho y el bronquio intermediario. 11Ri: entre el bronquio lobar medio y el bronquio lobar inferior derecho.	Interlobares	
12R y L	Lobares	Adyacentes a los bronquios lobares	Lobares	Zona periférica
13R y L	Segmentarios	Adyacentes a los bronquios segmentarios	Segmentarios	
14R y L	Subsegmentarios	Adyacentes a los bronquios subsegmentarios	Subsegmentarios	

1, R: derecho; 2, L: izquierdo

Anexo 3. Informe del Comitè Ètic d'Investigació Clínica



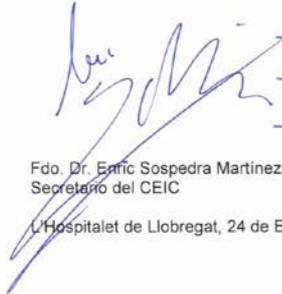
Comitè Ètic d'Investigació Clínica

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA SOBRE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

El Comitè Ètic de Investigació Clínica del Hospital Universitari de Bellvitge, con fecha de 24 de Enero de 2008, tras examinar toda la documentación presentada sobre el proyecto de investigación nuestra ref. **247/07**, titulado:

"EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO PULMONAR COMO INDICADOR DE AFECTACIÓN GANGLIONAR EN EL CARCINOMA DE PULMÓN NO CÉLULA PEQUEÑA"

Presentado por el Dr. Juan Antonio Moya Amorós del Servicio de Cirugía Torácica, ha considerado que no existe inconveniente ético para su realización y ha acordado dar su **APROBACIÓN DEFINITIVA** al mencionado proyecto.




Fdo. Dr. Enric Sospedra Martínez
Secretari del CEIC

L'Hospitalet de Llobregat, 24 de Enero de 2008



Hospital Universitari de Bellvitge
Feixa Jarguà s/n
08907 L'Hospitalet de Llobregat
Tel. 932 607 500
Fax 932 607 561
www.csub.sck.es

Anexo 4. Protocolos de recogida de datos

PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS GRUPO A (PACIENTES SIN NEOPLASIA)
Edad
Sexo
Tabaquismo
Antecedentes patológicos
Fecha de cirugía
Histología - Presencia de patología inflamatoria
Estación ganglionar recogida
Presencia de marcador/es

PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS GRUPOS B Y C (PACIENTES CON CPNCP)

Edad
Sexo
Tabaquismo
Antecedentes patológicos
Tiempo de enfermedad hasta cirugía
Fecha de cirugía
Resultado de PET-TC
Estadificación clínica: cTNM y cT, cN y cM por separado
Histología
Localización tumoral
Tamaño tumoral
Grado de diferenciación
Invasión vascular histológica parenquimatosa
Invasión linfática histológica parenquimatosa
Invasión perineural histológica parenquimatosa
Expresión tumoral del marcador y gen de referencia, concentración absoluta normalizada
Expresión tumoral del marcador y gen de referencia, concentración relativa
Metilación tumoral del marcador
Afectación ganglionar histológica
Número de ganglios afectados en histología
Estaciones ganglionares afectas en histología
Estadificación patológica: pTNM y pT, pN, pM por separado
Estación ganglionar recogida
Expresión ganglionar del marcador y gen de referencia, concentración absoluta normalizada
Expresión ganglionar del marcador y gen de referencia, concentración relativa
Región anatómica (N1 ó N2) afecta molecularmente por marcador y combinación
Clasificación molecular del paciente (molecular N0, N1, N2)
Clasificación molecular del paciente (molecular positivo, molecular negativo)
Resección realizada
Tratamiento adyuvante
Presencia de recidiva
Localización de la recidiva
Fecha de recidiva
Supervivencia
Fecha de éxito
Causa de éxito
Fecha de último contacto

PROTOCOLO DE RECOGIDA DE DATOS GRUPO D (PACIENTES ELEGIDOS CON CARCINOMA ESCAMOSO Y ADENOCARCINOMA)
Edad
Sexo
Tabaquismo
Antecedentes patológicos
Fecha de cirugía
Estadificación clínica: cTNM y cT, cN y cM por separado
Histología
Localización tumoral
Tamaño tumoral
Grado de diferenciación
Invasión vascular histológica parenquimatosa
Invasión linfática histológica parenquimatosa
Invasión perineural histológica parenquimatosa
Afectación ganglionar histológica
Número de ganglios recogidos
Estadificación patológica: pTNM y pT, pN, pM por separado
Expresión tumoral del marcador y gen de referencia, concentración absoluta normalizada
Expresión tumoral del marcador y gen de referencia, concentración relativa
Metilación tumoral del marcador
Resección realizada
Radicalidad de la resección
Tratamiento adyuvante
Presencia de recidiva
Localización de la recidiva
Fecha de recidiva
Supervivencia
Fecha de éxitus
Causa de éxitus
Fecha de último contacto

Anexo 5. Protocolos de extracción de RNA y DNA

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE RNA	
HOMOGENEIZACIÓN	
1	Descongelar la muestra a temperatura ambiente.
2	Dividir la muestra para RNA (60%) y DNA (40%).
3	En un nuevo eppendorf, se colocan 500 µL de trizol. La muestra no debe ser mayor del 10% del volumen de trizol utilizado.
4	En una placa de Petri, se coloca unos µL de trizol sobre la muestra y se homogeneiza con un bistrú.
5	Tras desmenuzar la muestra, se introduce en el eppendorf con trizol y se mezcla.
SEPARACIÓN	
6	Tiempo de incubación: 20 minutos a temperatura ambiente. Permite la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.
7	Añadir 100 µL de cloroformo y se agita suavemente 15 segundos. Cantidad: 1:5 respecto el trizol
8	Tiempo incubación: 10 minutos a temperatura ambiente.
9	Centrifugar la muestra a 13000 revoluciones durante 15 minutos a 6°C.
10	Los eppendorfs mostraran 3 fases: 1.- Fase acuosa, superior, contiene el RNA. 2.- Fase semisólida, intermedia, orgánica. 3.- Fase fenol-cloroformo, inferior, rosada, contiene los reactivos. Extraer la fase acuosa (60% del volumen del trizol utilizado) sin aspirar la fase orgánica.
PRECIPITACIÓN DE RNA	
11	Transferir la fase acuosa (sobrenadante) a un nuevo eppendorf.
12	Añadir isopropanol 250 µL. Cantidad: 1:2 respecto el trizol. Permite precipitar el RNA.
13	Agitar suavemente durante 15 segundos.
14	Tiempo incubación: 10 minutos a temperatura ambiente.
15	Centrifugar la muestra a 13000 revoluciones durante 10 minutos a 6°C. El RNA formará un <i>pellet</i> en la zona lateral del vértice del eppendorf.
LAVADO DEL RNA	
16	Eliminar el sobrenadante
17	Añadir 500 µL de alcohol al 70%. La cantidad de alcohol es de 1:1 respecto el trizol.
18	Despegar el <i>pellet</i> golpeando suavemente el eppendorf
19	Centrifugar la muestra a 5000 revoluciones durante 5 minutos a 6°C
REDISOLVER EL RNA	
20	Eliminar el alcohol.
21	Dejar secar el <i>pellet</i> de RNA a 8°C durante 2 horas. En un recipiente de hielo picado se coloca el eppendorf inclinado unos 45° con el <i>pellet</i> en la zona superior del vértice del eppendorf, para que el alcohol que se deslice no vuelva a contactar con el <i>pellet</i> . Es importante no secar completamente el <i>pellet</i> dado que esto disminuye su solubilidad.
22	Añadir varios µL de agua bidestilada/libre de RNAses en función de la cantidad de RNA- <i>pellet</i> obtenido.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA	
HOMOGENEIZACIÓN Y DIGESTIÓN	
1	Descongelar las muestras a temperatura ambiente.
2	Dividir la muestra para RNA (60%) y DNA (40%).
3	Preparar 1mL de trizol (muestras de <2 mm) ó 2 mL (muestras de 2-5 mm) en un eppendorf/tubo.
4	Añadir de 10-20 µL (según volumen) a 20 ng/mL.
5	En una placa de Petri, colocar unos 50 µL de trizol sobre la muestra y homogeneizar con bisturí.
6	Tras desmenuzar la muestra, se introduce en el eppendorf con trizol y se mezcla.
7	Mantener las muestras a 37°C en agitación durante 20-24h. En caso de tejidos pequeños, puede acortarse a 2-3h a 55°C.
SEPARACIÓN	
8	Añadir 50-100 µL (según volumen inicial) de NaOH 5 molar para ayudar a la precipitación del DNA
9	Añadir 1-2 mL de fenol y agitar suavemente.
10	Centrifugar la muestra a 15.000 revoluciones durante 15 minutos
11	Los eppendorfs mostraran 3 fases: 1.- Fase acuosa, superior, contiene el RNA. 2.- Fase semisólida, intermedia, orgánica. 3.- Fase inferior, contiene los reactivos. Extraer la fase acuosa sin aspirar la fase orgánica.
12	Añadir 1-2 mL de cloroformo (según volumen inicial) y agitar suavemente
13	Centrifugar la muestra a 15.000 revoluciones durante 15 minutos
14	Los eppendorfs volverán a mostrar 3 fases. Transferir la fase acuosa/sobrenadante a un nuevo eppendorf.
PRECIPITACIÓN DE DNA	
15	Añadir isopropanolol 1 mL (según volumen inicial). Permite precipitar el DNA. Agitar suavemente durante 15 segundos.
16	Habitualmente se identifica la medusa (hebra) de DNA. De no ser así se pueden mantener las muestras 24h a -20°C.
17	Centrifugar la muestra a 15.000 revoluciones durante 5 minutos.
LAVADO DEL DNA	
18	Eliminar el sobrenadante controlando el pellet que estará en la base del eppendorf.
19	Añadir 1-2 mL de alcohol al 70% (según volumen inicial). Cantidad: 1:1 respecto el trizol.
20	Despegar el <i>pellet</i> golpeando suavemente el eppendorf.
21	Centrifugar la muestra a 15.000 revoluciones durante 5 minutos.
REDISOLVER EL DNA	
22	Eliminar el alcohol.
23	Dejar secar el <i>pellet</i> de RNA a 8°C durante 2 horas. En un recipiente de hielo picado se coloca el eppendorf inclinado unos 45° con el <i>pellet</i> en la zona superior del vértice del eppendorf, para que el alcohol que se deslice no vuelva a contactar con el <i>pellet</i> . Es importante no secar completamente el <i>pellet</i> dado que esto disminuye su solubilidad.
24	Añadir varios µL de agua bidestilada/libre de RNAsas en función de la cantidad de RNA- <i>pellet</i> obtenido.

PROTOCOLO DEL BISULFITO (EZ DNA METHYLATION-GOLD™ KIT)	
PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE CONVERSIÓN	
1	900 µL de agua bidestilada, libre de RNAsas
2	300 µL de M-Dilution Buffer
3	50 µL de M-Dissolving Buffer
4	Agitar suavemente durante 10 minutos.
BISULFITACIÓN	
5	Añadir 130 µL del reactivo de conversión a 20 µL de muestra de DNA. Mezclar.
6	Mantener las muestras a las siguientes temperaturas: 1.- 98°C durante 10 minutos 2.- 64°C durante 2,5 horas Dejar a 4° C.
7	Añadir 600 µL de M-Binding Buffer a la columna Zymo-Spin™ IC.
8	Añadir la muestra. Agitar suavemente durante 15 segundos.
9	Centrifugar la muestra a 15.000 revoluciones durante 30 segundos.
10	Añadir 100 µL de M-Wash Buffer a la columna, agitar 30 segundos.
11	Añadir 200 µL de M-Desulphonation Buffer a la columna y esperar 15-20 minutos.
12	Centrifugar la muestra a 15.000 revoluciones durante 30 segundos.
13	Añadir 200 µL de M-Wash Buffer a la columna, agitar 30 segundos.
14	Añadir 200 µL de M-Wash Buffer a la columna, agitar 30 segundos.
16	Añadir 10 µL de M-Elution Buffer directamente a la matriz de la columna.
17	Colocar en un tubo de 1,5 mL. Agitar brevemente para separar el DNA.

Se obtuvieron tres valores sobre el RNA con el espectrofotómetro:

- 1.- Concentración.** En µg/mL.
- 2.- Razón 260/280.** Indica la pureza del RNA en relación a sustancias orgánicas. Los valores aceptables están entre 1,7-1,9; así sucedió en la mayoría de muestras.
- 3.- Razón 280/230.** Indica la pureza del RNA en relación a sustancias inorgánicas. Los valores aceptables están por debajo de 2,3; así sucedió en la mayoría de muestras.

La lectura del Nanodrop™ y correr la muestra en un gel de agarosa nos permitió valorar la integridad del RNA.

La extracción del RNA fue realizada principalmente por dos técnicos de laboratorio experimentadas y el doctorando. La extracción de DNA se realizó por las mismas dos técnicas de laboratorio, las cuales no tenían acceso a la información clínica de los pacientes.

Anexo 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Técnica de la PCR (309)

La PCR (*polimerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica ideada por Kary Mullis en 1984 que permite amplificar y detectar pequeñas cantidades de DNA. Si la PCR está precedida de la transcripción inversa del mRNA en cDNA, se conoce como RT-PCR; este es nuestro caso. La RT-PCR es mucho más sensible que la inmunohistoquímica, pues permite incluso amplificar una única molécula de DNA.

La PCR precisa de tres componentes básicos: los *primers forward* y *reverse*, los dNTPs (*deoxyribonucleosides triphosphate*, desoxirribonucleósidos trifosfato) y una DNA polimerasa estable al calor. Antes de empezar los ciclos de expansión del DNA, se realiza un ciclo de activación para desnaturalizar el DNA calentando la disolución a 96° durante 10 minutos. Un ciclo de PCR consta de las tres etapas siguientes:

- 1.- Separación de la hebra.** Las dos hebras de la cadena de DNA se separan mediante calentamiento de la disolución a 96°C durante 10 segundos.
- 2.- Hibridación de los *primers*.** La disolución se enfría bruscamente a la temperatura que permita al *primer forward* unirse a una hebra y el *primer reverse* unirse a la hebra complementaria. Cada primer tiene una temperatura óptima para unirse al DNA, que depende de los nucleótidos que lo forman. Los *primers* se diseñan para que *forward* y *reverse* tengan una temperatura similar y se produzca correctamente la hibridación de ambos a la misma temperatura. Ésta suele estar entre 55-60°C. El rigor de la alta temperatura hace que sólo se hibriden los *primers* y sólo se sintetice después la secuencia diana entre los *primers*. La duración de la hibridación es de 20 segundos.
- 3.- Síntesis del DNA.** La disolución se vuelve a calentar hasta 72°C, que es la temperatura óptima para que funcione DNA polimerasa. Esta DNA polimerasa se obtiene de la bacteria termófila *thermus aquaticus*. Se produce la síntesis de doble cadena de DNA, replicando las dos hebras iniciales de la secuencia diana. En nuestro caso, la secuencia diana tiene una longitud entre 150-200 bp, que nos permite una correcta y rápida amplificación. La síntesis de DNA se realiza en 20 segundos.

Estas tres etapas juntas forman un ciclo y se repiten en bucle cambiando la

temperatura hasta realizar 30-40 ciclos. Después del primer ciclo no es preciso añadir ningún reactivo.

Todas las hebras nuevas de DNA sirven como moldes en ciclos sucesivos. La colocación de los *primers* flanqueando la secuencia diana hace que ésta aumente exponencialmente con los ciclos, mientras que el resto de las secuencias de DNA aumentan sólo linealmente. En teoría, la secuencia diana se amplifica 2^n veces, donde n es el número de ciclos.

Tras los ciclos hay una fase de fusión o *melting*, donde las muestras pasan un minuto a 95° , luego 1 minuto a 65° y finalmente a 95° - 98° .

La PCR no necesita saber la secuencia de los nucleótidos de la secuencia diana y ésta puede ser larga. En los análisis por PCR se introduce un control negativo sin cDNA, que suele ser agua. El tamaño de las bandas se comprueba en un gel de agarosa al 1,5%.

PCR cuantitativa, real-time RT-PCR

Hay dos tipos de PCR, la cualitativa y la cuantitativa. La PCR cualitativa permite saber si hay o no hay DNA, pero no permite saber la cantidad de DNA que tiene la muestra. En cambio, la RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR), permite inferir la cantidad de DNA que presenta la muestra analizada y saber los niveles de expresión génica.

Detección de la cantidad de expresión

Para poder tener un registro de la cantidad formada de DNA, la RT-qPCR mide la fluorescencia emitida por un marcador fluorescente que se une al producto amplificado en cada ciclo. El *SYBR Green* es el fluorocromo más utilizado y se une al surco menor de la doble cadena de cDNA. Cuanto más DNA amplificado, más *SYBR Green* unido y más fluorescencia(310).

En los primeros ciclos la señal fluorescente es débil y no se distingue del fondo, dado que se sintetizan poco DNA, es la fase de fluorescencia de fondo. No obstante, llega un punto en que la reacción crece exponencialmente y se detecta ampliamente la fluorescencia superando la fluorescencia de fondo. Esta segunda fase es la fase logarítmica e idealmente en cada ciclo se dobla el contenido de DNA(311,312). El número de ciclos necesarios para llegar a

ese punto de crecimiento exponencial es el C_T o C_p (*threshold cycle*, usando el método de la segunda derivada o *crossing point*, utilizando el método de los *fit points*). Este punto es crucial y la cinética de la reacción se puede describir con la siguiente fórmula:

$$R_n = R_0 \cdot (1 + E)^n$$

n: número de ciclos

R_n : cantidad de señal fluorescente después de n ciclos

R_0 : cantidad de señal fluorescente después de 0 ciclos

E: eficiencia de la reacción

El crecimiento exponencial se visualiza como un recorrido semilogarítmico de la cinética de la curva, siendo la porción lineal del gráfico la fase de crecimiento exponencial. Para calcular el C_T/C_p se pueden utilizar dos métodos, el método de la segunda derivada y el método de los *fit points*.

El método de los *fit points* implica determinar una línea de corte horizontal que excluya el ruido de fondo de la reacción y una línea que recorra la porción exponencial de la curva de amplificación de cada muestra. El punto de intersección entre la línea de corte (*threshold line*) y la línea de la muestra (*log-line*) nos dará el C_p .

El método utilizado en este estudio para calcular el C_T es el de la segunda derivada, que es el máximo de la segunda derivada de la curva de intensidad de fluorescencia, es decir, el punto de la fase exponencial donde la intensidad de la fluorescencia crece más rápido.

Posteriormente se pasa a una tercera fase, de retraso de la reacción, donde se acumulan factores inhibidores de la PCR, se agota el enzima y los substratos para la PCR y se desacelera la reacción. Finalmente se llega a una fase estacionaria donde no se produce más DNA.

Las diferencias en expresión de las diferentes muestras se inferirán como resultado de comparar los diferentes C_T . A más concentración inicial de DNA, menor número de ciclos necesarios para llegar al crecimiento exponencial y a la saturación de la reacción.

Curvas de fusión o melting curves

La ventaja del *SYBR Green* es que permite optimizar fácilmente las reacciones; el inconveniente es que se une a dímeros de *primers* (*primer dimer*) o productos inespecíficos de la reacción. Estos inconvenientes se pueden controlar

evaluando las curvas de fusión o *melting curves*. La curva de fusión es el gráfico resultante de relacionar la temperatura con la cantidad de fluorescencia emitida. La temperatura a la cual se produce el pico de fluorescencia (T_m , *melting temperature*) es la temperatura en la que se produce la mayor cantidad de DNA. Cada DNA amplificado presenta su *melting curve* a una T_m determinada, depende de su composición. Los *primer dimers* presentan *melting curves* a unas T_m más bajas que el producto amplificado.

Cuantificación de la expresión génica

La cuantificación de la expresión génica implica la obtención de concentraciones de DNA, tras analizar el material amplificado por la RT-qPCR. La cuantificación de la expresión génica puede ser de dos tipos:

- **Absoluta.** Permite obtener un valor absoluto final de concentración o de copias de DNA por mL.
- **Relativa.** Compara los niveles de la expresión entre dos genes de manera que el resultado final es una razón entre la concentración del gen problema y el gen de referencia en cada muestra. El gen de referencia se presenta en una concentración constante en la tipo de muestra a analizar. Este es un control endógeno o interno y permite normalizar los resultados entre las muestras. Hay varios métodos o modelos matemáticos para obtener la concentración relativa, el más común es el método de comparación de C_T o también llamado método $\Delta\Delta C_T$. Un método más preciso y complejo es el *E-method*.

Cuantificación absoluta

Para poder obtener la concentración de DNA de cada muestra necesitamos una recta patrón o curva estándar. La recta patrón es el resultado de analizar una muestra de RNA del tejido a estudio a diversas concentraciones decrecientes conocidas. Las muestras se cuantifican por espectrofotometría y se realizan diluciones seriadas para obtener las diferentes concentraciones. Se analiza el RNA a 1000, 500, 250, 125 y 65 $\mu\text{g/mL}$, como mínimo por duplicado, idealmente por cuadruplicado. El coeficiente de variabilidad entre las réplicas a una misma concentración debería ser menor a 0,2.

Cada concentración estará relacionada con un determinado C_T y con estos datos se realiza una regresión lineal con ajuste a último punto. Por tanto, los resultados generan una recta donde el eje X es el logaritmo de la concentración y el eje Y el C_T .

Para obtener resultados precisos hay que tener en cuenta la eficiencia de la reacción. Idealmente, ésta debería ser cercana al 100%. Esto implica que se duplica el producto amplificado, durante la fase exponencial. La eficiencia de la reacción es muy importante, porque pequeñas variaciones en la eficiencia pueden generar diferencias importantes en los ratios de expresión aún teniendo la misma concentración de RNA/DNA al inicio de la reacción. Factores como el fenol, el etanol, la hemoglobina, la heparina e incluso la transcriptasa inversa alteran e inhiben la eficiencia de la *PCR*.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, la recta patrón nos permitirá obtener los valores de concentración aplicando la siguiente fórmula:

$$\log y = \frac{C_T - b}{m}$$

$\log y$: logaritmo de la concentración absoluta (y)

C_T : cycle threshold

b : log y -intersección de la recta patrón

m : eficiencia de la reacción o pendiente de la recta patrón

La cantidad inicial de DNA es la inversa del logaritmo, $10^{\log y}$.

Estos cálculos los realiza automáticamente algunos programas informáticos de las plataformas que realizan la PCR, como el LightCycler 480® (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

Este método nos aportará la cuantificación absoluta del gen en cada muestra. No obstante, en muchas ocasiones no nos interesan los valores absolutos de cada muestra, sino los valores relativos a un grupo o gen de referencia.

Normalización de la concentración absoluta por los genes de referencia

Para poder conocer los resultados reales de la expresión génica hay que corregir las variaciones que se pueden dar por la eficiencia de la reacción y por la cuantificación de la muestra individual. Hay que eliminar las diferencias en expresión debidas a la diferente concentración de DNA entre muestras, como resultado de una cantidad diferente de muestra, de recuperación de RNA o de síntesis diferente de cDNA. Dicho de otra manera, las variaciones en la concentración pueden venir, por ejemplo, por una mayor concentración inicial de RNA en la muestra y no por una mayor expresión del gen a estudio. Por tanto, la normalización de la concentración permite compensar las variaciones entre muestras y las variaciones entre experimentos.

Para normalizar los resultados de concentración obtenidos hay que relacionar los resultados obtenidos del gen problema con un gen de referencia (GR) o *housekeeping* (HK). El gen de referencia es un gen que se expresa de forma constante tanto en tejido normal como en tumoral y sirve de referencia. Este

gen se analiza en la PCR de forma apareada en una o dos alícuotas de cada una de las muestras que se han analizado para el gen problema. Ejemplos de genes de referencia son la **GAPDH** (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) o la β actina. La β actina, el **PPIA** (*peptidylprolyl isomerase A*) o la **IPO8** (*importin β*) se han demostrado útiles como genes de referencia para muestras pulmonares. La GAPDH se ha utilizado también como gen de referencia en el análisis de ganglios torácicos; no obstante, la GAPDH está en una región cromosómica frecuentemente deletada en cáncer de pulmón y tiene valor pronóstico por ella misma.

Las *melting curves* de los genes de referencia se presentan a diferente *melting temperature* que las muestras a estudio.

Cuantificación relativa. Comparación de la expresión génica entre muestras.

Para comparar las diversas muestras, en muchas ocasiones no sólo es necesario obtener las concentraciones relativas a un gen de referencia, si no también normalizarlas respecto a las concentraciones relativas (CR) de muestras de tejido sin la patología que estamos evaluando. Esto nos permitirá saber cuánto más o menos expresado está el gen a estudio en las muestras problema respecto la expresión del gen a estudio en las muestras normales.

Método de la comparación de C_T o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Este método obtiene la concentración relativa de las muestras teniendo en cuenta el C_T normalizado por un gen de referencia y relacionado a una muestra control. Este método asume que la eficiencia de la reacción para el gen a estudio es la misma que la del gen de referencia, y se asume que es de 2, lo cual implica que las moléculas se doblan en cada ciclo. Como ya hemos dicho antes, la eficiencia muchas veces varía sensiblemente produciendo notables variaciones de la concentración; este es el punto débil de este método. Si las eficiencias de la PCR del gen problema y del gen de referencia no son idénticas u óptimas, los resultados no serán precisos. Por otra parte, elimina los posibles errores que se cometan a la hora de realizar las rectas patrón.

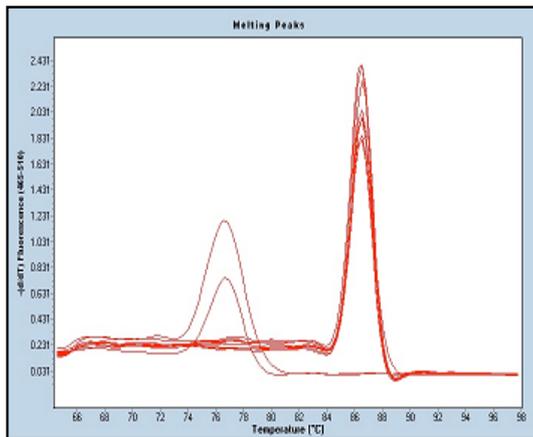
Método de la regresión lineal

Este método implica la linearización de la fase exponencial de la PCR y usando la regresión lineal se calcula la pendiente de la curva, el logaritmo de la cantidad de fluorescencia en cada ciclo y la eficiencia de la reacción para obtener la concentración relativa.

E-Method

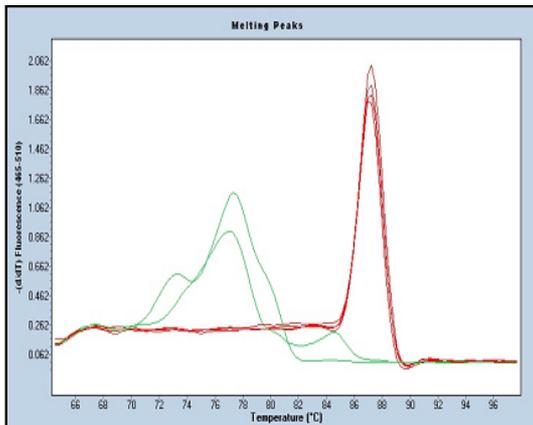
Este método compensa las diferencias en la eficiencia de la amplificación del gen problema y del gen de referencia, utilizando estándares relativos para generar la curva estándar.

Anexo 7. Curvas de fusión de los marcadores



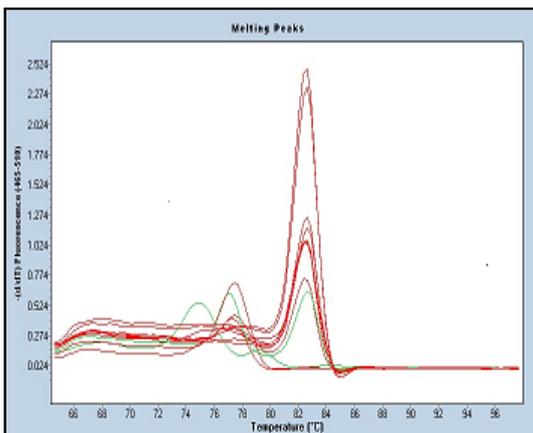
Cantidad	Componente
4 µL	SYBR Green
0,5 µL	Primer CEACAM5 Forward
0,5 µL	Primer CEACAM5 Reverse
0,8 µL	Mg Cl ₂
3,2 µL	H ₂ O
1 µL	cDNA
TEMPERATURA: 57° C	

Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de CEACAM5.



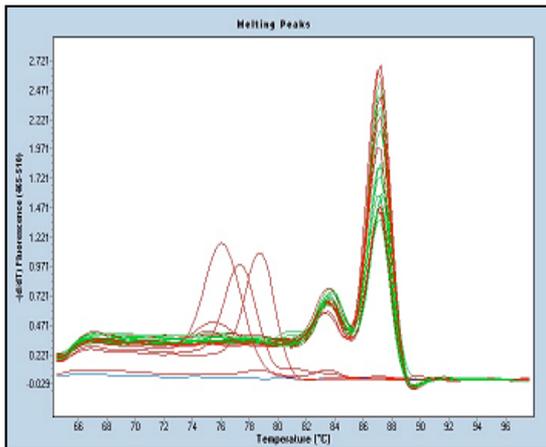
Cantidad	Componente
4 µL	SYBR Green
0,5 µL	Primer FGFR2b Forward
0,5 µL	Primer FGFR2b Reverse
0,8 µL	Mg Cl ₂
3,2 µL	H ₂ O
1 µL	cDNA
TEMPERATURA: 57° C	

Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de FGFR2b.



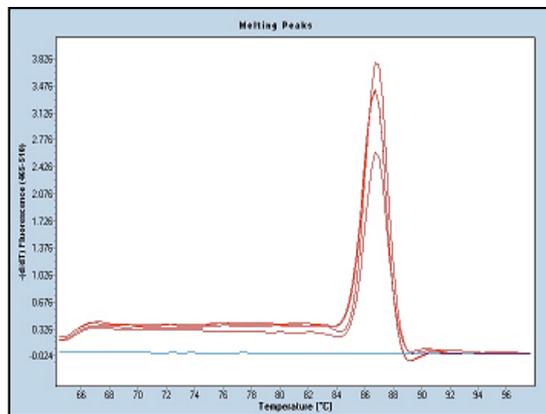
Cantidad	Componente
4 µL	SYBR Green
0,5 µL	Primer FRS2 Forward
0,5 µL	Primer FRS2 Reverse
0,8 µL	Mg Cl ₂
3,2 µL	H ₂ O
1 µL	cDNA
TEMPERATURA: 57° C	

Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de FRS2.



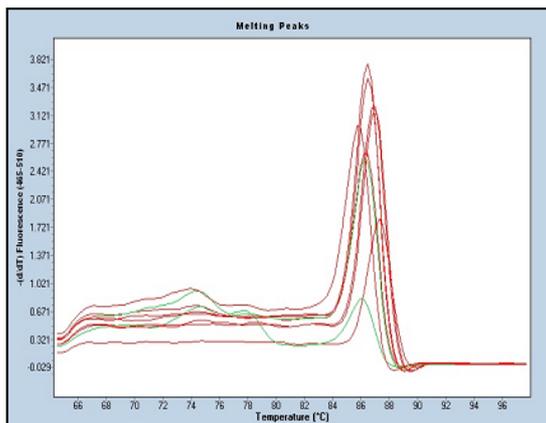
Cantidad	Componente
4 μL	SYBR Green
0,5 μL	Primer MYCN Forward
0,5 μL	Primer MYCN Reverse
0,8 μL	Mg Cl ₂
3,2 μL	H ₂ O
1 μL	cDNA
TEMPERATURA: 59° C	

Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de MYCN



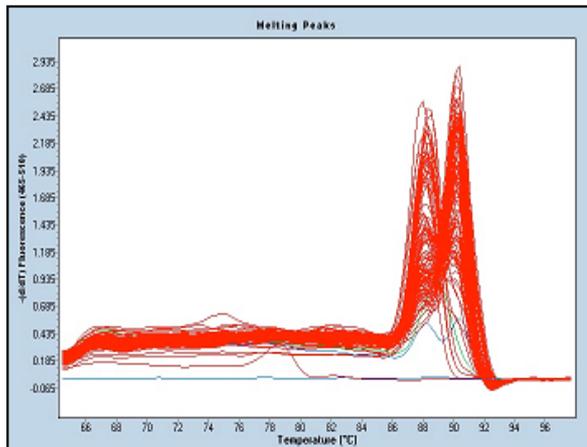
Cantidad	Componente
4 μL	SYBR Green
0,3 μL	Primer SFTPC Forward
0,3 μL	Primer SFTPC Reverse
0,8 μL	Mg Cl ₂
3,6 μL	H ₂ O
1 μL	cDNA
TEMPERATURA: 61° C	

Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de SFTPC



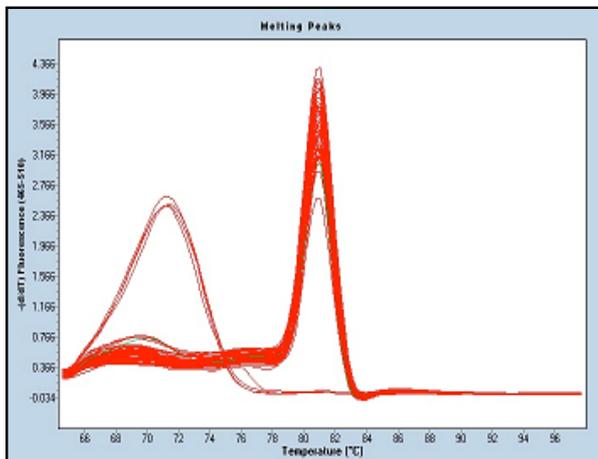
Cantidad	Componente
4 μL	SYBR Green
0,5 μL	Primer SHP2 Forward
0,5 μL	Primer SHP2 Reverse
0,8 μL	Mg Cl ₂
3,2 μL	H ₂ O
1 μL	cDNA
TEMPERATURA: 59° C	

Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de SHP2



Cantidad	Componente
4 µL	SYBR Green
0,5 µL	Primer SOX17 <i>Forward</i>
0,5 µL	Primer SOX17 <i>Reverse</i>
0,8 µL	Mg Cl ₂
3,2 µL	H ₂ O
1 µL	cDNA
TEMPERATURA: 59° C	

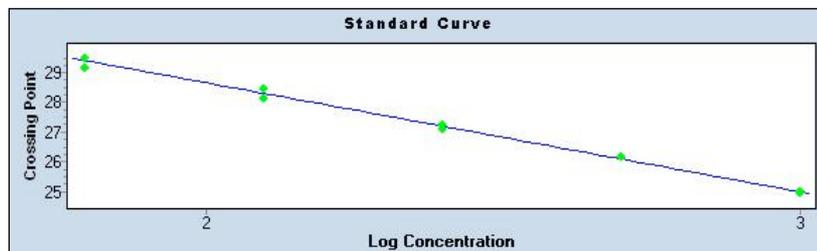
Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de SOX17



Cantidad	Componente
4 µL	SYBR Green
0,5 µL	Primer β2M <i>Forward</i>
0,5 µL	Primer β2M <i>Reverse</i>
0,8 µL	Mg Cl ₂
3,2 µL	H ₂ O
1 µL	cDNA
TEMPERATURA: 57° C	

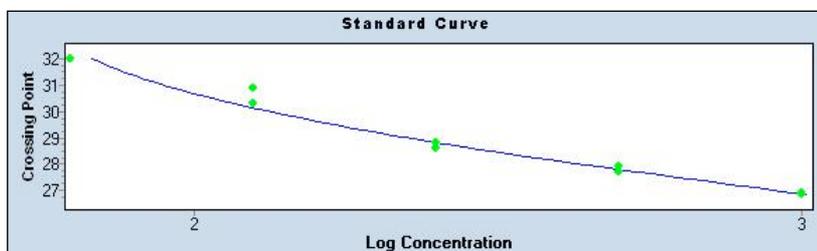
Curva de fusión y volumen de los componentes utilizados para obtener la mejor amplificación de β2microglobulina.

Anexo 8. Rectas patrón de los marcadores



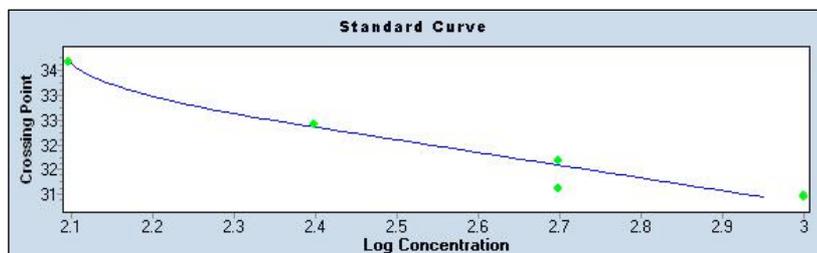
FGFR2b	Valor
Pendiente (m)	-3,63
Intersección y	35,74
Eficiencia	1,89
R ²	0,0063

Recta patrón para el FGFR2b. R: error medio.



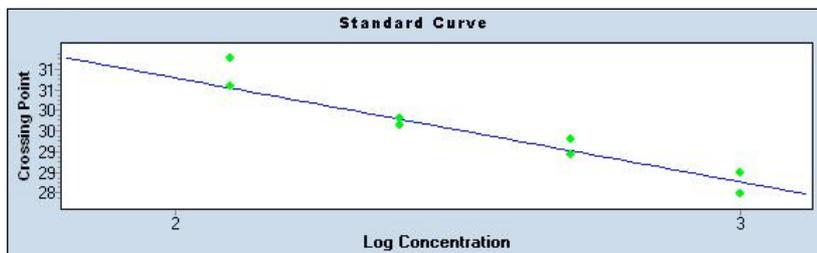
FRS2	Valor
Pendiente (m)	-3,08
Intersección y	39,56
Eficiencia	2,11
R ²	0,019

Recta patrón para el FRS2. R: error medio.



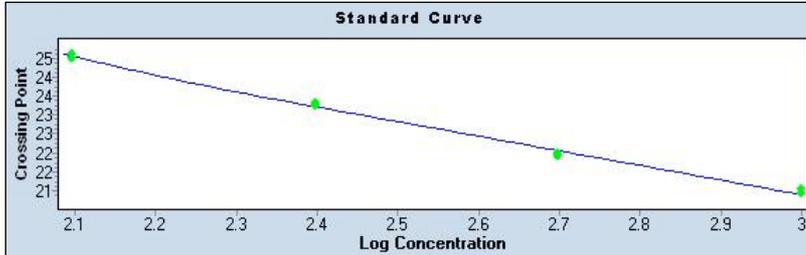
MYCN	Valor
Pendiente (m)	-2,57
Intersección y	39,92
Eficiencia	2,45
R ²	0,024

Recta patrón para MYCN. R: error medio.



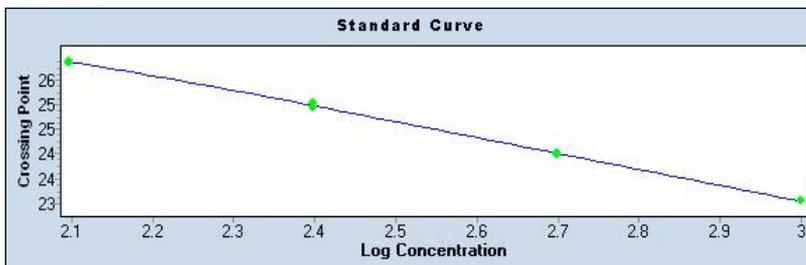
SFTPC	Valor
Pendiente (m)	-2,51
Intersección y	36,85
Eficiencia	2,5
R ²	0,04

Recta patrón para el SFTPC. R: error medio.



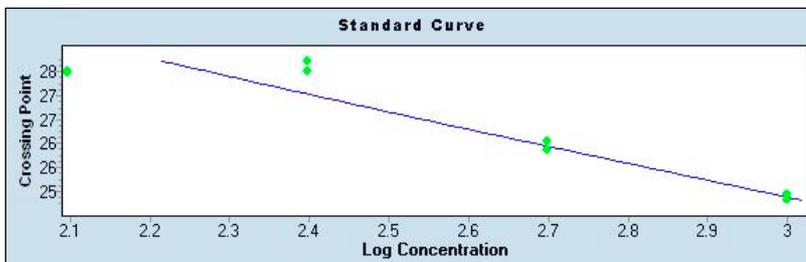
SHP2	Valor
Pendiente (m)	-3,83
Intersección y	32,85
Eficiencia	1,82
R ²	0,0097

Recta patrón para el SHP2. R: error medio.



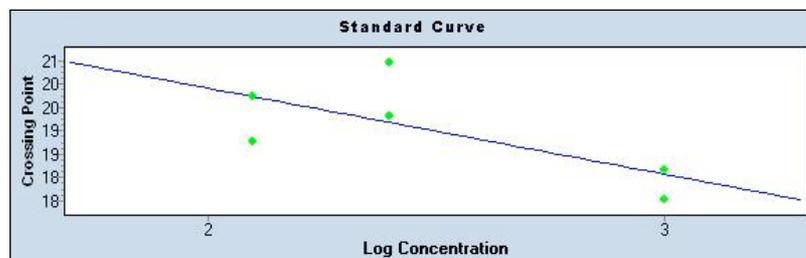
SHH	Valor
Pendiente (m)	-3,2
Intersección y	32,43
Eficiencia	2,05
R ²	0,0066

Recta patrón para el SHH. R: error medio.



SOX17	Valor
Pendiente (m)	-3,53
Intersección y	34,56
Eficiencia	1,92
R ²	0,059

Recta patrón para el SOX17. R: error medio.



$\beta 2M^1$	Valor
Pendiente (m)	-1,84
Intersección y	23,58
Eficiencia	3,5
R ²	0,3

Recta patrón para la $\beta 2$ microglobulina. R: error medio. 1, $\beta 2M^1$: $\beta 2$ microglobulina.

Anexo 9. Datos de expresión de los pacientes del estudio tumoral

Muestras tumorales

PACIENTE	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FRS2	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 1	0	4,48E-02	1,08E+00	9,10E+00	3,55E-01	7,40E+01	2,07E-46	5,53E+00	2,90E-01	Sin enfermedad	Éxito
Caso 2	0	7,72E-01	2,32E-04	6,01E-02	1,59E-01	1,60E-01	2,07E-108	4,66E+00	3,59E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 4	0	1,20E-01	1,40E-02	3,39E-02	5,73E-03	1,29E+01	2,07E-08	1,10E+00	1,21E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 5	0	1,56E+00	4,12E+00	9,47E-02	3,48E-01	4,45E-02	1,39E-07	4,30E-01	1,60E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 6	0	5,28E+00	1,16E-02	5,78E-01	3,84E+00	ND ¹	5,70E-06	3,01E+02	2,15E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 7	0	4,14E-02	6,03E-04	3,09E-05	5,68E-03	2,45E+01	5,32E-09	8,87E-01	8,02E-02	Sin enfermedad	Vivo
Caso 8	0	1,38E+00	2,66E-02	1,51E+00	4,12E+00	1,71E+02	1,74E-06	2,97E+01	1,19E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 10	0	1,31E+00	6,88E-01	8,15E+00	2,95E-01	1,03E+01	4,37E-08	8,54E-01	2,32E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 11	0	9,54E-02	1,72E-01	2,13E+00	2,18E+00	5,73E+00	1,06E-07	1,17E+00	1,27E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 13	0	5,36E-01	9,62E-04	7,79E+00	5,04E+00	4,22E+00	1,38E-08	1,23E+01	6,88E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 15	0	3,05E-01	1,10E-02	2,35E-01	1,95E-01	7,00E-01	5,02E-08	8,29E+00	4,20E-01	Sin enfermedad	Éxito
Caso 18	0	2,25E+01	7,59E-03	7,07E-09	1,53E+00	1,45E+00	1,86E-08	6,34E+00	1,17E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 19	0	7,31E+01	2,63E-02	1,06E+02	3,21E+01	1,99E+04	1,80E-05	6,97E+04	3,49E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 21	0	1,40E+00	1,99E-02	4,90E-04	1,20E+00	7,16E+01	1,04E-07	7,91E+00	2,46E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 23	0	1,24E-01	4,76E-03	1,59E-03	6,48E-02	3,60E-01	4,36E-08	2,31E+00	9,38E-02	Sin enfermedad	Vivo
Caso 24	0	5,27E+00	7,07E-03	1,68E-01	7,57E-03	2,40E-01	4,74E-09	9,25E-01	1,70E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 25	0	5,61E-02	2,41E-01	2,30E-01	1,59E-02	9,29E-03	8,58E-06	3,57E-01	2,23E-01	Sin enfermedad	Vivo

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración absoluta normalizada (CAN), referenciada al status de recidiva y supervivencia. 1. ND: no disponible.

PACIENTE	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FRSZ	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 26	0	1,53E+00	1,48E+00	16	2,02E+00	5,35E+01	1,46E-08	1,90E+00	5,49E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 27	0	6,80E-01	5,54E-01	1,04E-01	1,13E-01	6,89E-02	7,30E-250	2,78E+00	2,14E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 28	0	2,13E+00	2,28E-04	2,52E-02	5,10E-01	6,23E-01	6,57E-08	2,43E+00	7,29E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 29	0	1,45E-01	4,50E-04	3,36E-02	1,74E-01	9,57E-02	ND ¹	1,25E+00	8,46E-02	Sin enfermedad	Vivo
Caso 30	0	6,38E+00	8,20E-03	6,22E-06	2,99E+00	5,02E+00	3,21E-06	3,31E+02	1,53E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 32	0	3,97E-01	1,01E+01	2,09E-01	6,44E-02	9,57E-01	1,65E-27	1,11E+00	2,22E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 33	0	2,16E+00	7,14E-03	1,38E-03	3,97E-02	5,14E-02	1,53E-08	8,63E-01	2,89E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 34	0	7,27E+00	3,11E-02	1,35E-07	2,58E-02	9,81E-01	2,61E-08	1,32E+00	1,78E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 35	0	4,91E+03	3,99E-04	3,41E+02	4,21E+00	3,31E+03	5,85E-07	2,12E+02	4,05E+02	Sin enfermedad	Vivo
Caso 36	0	1,14E+02	1,21E+03	7,73E+02	1,87E+02	1,41E+02	6,15E+00	1,47E+04	7,05E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 37	0	1,31E-02	2,87E-01	1,67E-01	2,20E-02	2,09E-02	4,24E-94	2,88E+00	1,64E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 38	0	1,17E-01	4,68E-02	1,38E-01	7,32E-02	2,95E+01	2,98E-09	1,85E+00	8,45E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 39	0	5,84E+00	3,32E-02	1,81E-01	3,59E+00	1,08E+00	8,17E-09	1,26E+00	9,66E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 41	0	2,24E+02	2,13E-02	1,04E+03	2,78E+02	2,06E+02	1,28E+01	1,03E+04	4,68E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 44	0	1,06E-01	5,30E-02	9,80E-02	2,33E-02	7,89E-02	5,34E-08	2,03E+00	2,53E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 45	0	2,58E-01	4,04E-02	3,36E-01	1,14E+00	1,24E+00	3,02E-111	8,79E-01	3,93E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 46	0	2,19E-01	5,02E-03	3,50E-03	2,07E-01	5,92E+01	8,23E-09	5,69E+00	4,94E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 47	0	2,37E+00	2,07E-01	1,11E-01	5,91E-02	1,21E+01	6,22E-09	2,24E+00	7,33E-01	Sin enfermedad	Éxito
Caso 48	0	4,27E+01	2,95E-02	1,07E-01	9,82E-02	3,49E-01	2,65E-150	5,68E+00	6,56E-01	Sin enfermedad	Vivo

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración absoluta normalizada (CAN), referenciada al status de recidiva y supervivencia. 1, ND: no disponible

PACIENTE	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FRSZ	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 49	0	2,29E-01	3,27E-03	3,58E-03	4,64E-02	2,30E+01	1,06E-08	2,75E+00	4,22E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 50	0	3,88E-01	1,62E-02	2,12E-03	1,74E-01	2,05E+02	7,60E-08	4,85E+00	4,16E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 51	0	7,99E+01	8,51E+00	8,88E-01	9,75E+00	1,56E+02	1,53E-03	8,30E+04	5,60E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 52	0	4,62E+01	2,13E-02	1,22E-02	4,79E+01	6,16E+03	1,47E-05	3,85E+04	2,20E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 53	0	5,81E+00	1,34E-09	1,89E-07	2,89E+00	1,14E+01	1,86E-06	3,16E+03	2,43E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 54	0	5,06E-01	8,90E-04	4,27E-03	1,38E-01	1,67E-01	5,92E-08	8,62E+00	3,89E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 55	0	1,78E-01	1,37E+01	5,86E-01	3,86E-02	1,62E+02	2,04E-03	1,85E+01	2,67E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 57	0	1,68E+01	5,78E+00	1,10E-06	ND ¹	ND	4,62E-03	1,55E+04	1,52E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 58	0	6,15E-02	2,09E-04	1,05E-01	1,94E-02	3,38E+00	1,04E-08	2,22E+00	1,12E-01	Sin enfermedad	Éxito
Caso 59	0	3,93E-01	1,59E-03	6,64E-05	1,17E-01	3,27E+00	2,80E-08	6,49E+00	3,69E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 60	0	6,67E-01	5,13E-03	5,70E-01	6,65E-01	1,45E+01	1,51E-08	4,70E+00	3,12E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 62	1	8,09E-01	7,02E+00	5,07E-01	1,19E-01	1,85E+01	1,34E-132	1,89E+00	3,37E+00	Sin enfermedad	Éxito
Caso 62	1	1,16E-01	4,28E-05	1,20E-04	6,55E-01	ND	2,63E-08	2,01E+01	6,21E+00	Sin enfermedad	Éxito
Caso 63	1	1,49E+01	4,51E-03	5,80E-04	1,81E+00	1,12E+03	5,40E-06	6,82E+01	1,97E+01	Sin enfermedad	Éxito
Caso 63	1	6,45E-02	2,81E-02	3,50E-01	7,77E-01	1,09E+01	6,88E-01	4,75E-01	1,92E-01	Sin enfermedad	Éxito
Caso 68	1	8,83E-03	1,72E-03	5,37E-01	5,91E-02	6,43E-03	2,12E-08	7,21E-01	2,28E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 69	1	2,05E+00	7,03E-01	6,58E-01	2,52E-02	2,61E+00	3,20E-181	1,89E+00	8,28E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 70	1	1,38E-01	2,84E-02	3,44E-03	2,37E+00	2,55E+01	3,61E-08	2,37E+00	7,61E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 71	1	2,88E+01	2,23E+03	2,70E-01	6,83E+03	1,06E+04	9,34E-01	6,83E+03	3,85E+01	Sin enfermedad	Vivo

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración absoluta normalizada (CAN), referenciada al status de recidiva y supervivencia. 1, ND: no disponible

PACIENTE	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FRS2	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 72	1	3,64E+01	3,74E-04	1,70E-01	1,77E-01	4,25E-01	1,05E-08	4,02E+00	2,02E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 73	1	6,41E+00	1,26E-01	4,43E-07	7,92E+00	1,00E+01	7,73E-05	1,56E+04	1,18E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 75	1	1,35E-01	3,63E+01	1,40E-01	4,19E-01	2,61E-02	1,44E+00	6,85E-01	7,88E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 77	2	7,04E-01	5,74E-02	1,35E+00	1,90E-02	2,64E-01	4,41E-08	3,43E+00	3,09E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 78	2	9,82E-03	3,09E-05	1,34E+00	5,07E-03	2,55E-02	1,16E-303	1,67E+00	3,35E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 79	2	1,96E+01	1,30E-03	2,54E-01	4,84E+00	4,84E+03	1,26E-07	5,94E+00	4,59E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 80	2	5,58E+01	5,93E-03	1,19E-01	2,24E+00	3,42E+00	2,53E-08	1,66E+00	9,95E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 82	2	6,88E-02	4,31E-02	1,06E-01	1,62E-02	1,75E+01	1,52E-96	2,15E+00	4,45E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 82	2	1,03E-02	1,02E-03	2,50E-02	2,60E-01	8,97E-03	2,41E-08	7,03E-01	4,04E-01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 83	2	8,49E-01	5,60E-03	5,87E-06	8,99E-02	1,77E+00	8,81E-08	2,25E+00	1,34E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 84	0	2,26E+00	1,69E-01	2,58E+01	5,92E+01	4,94E+01	2,65E-05	3,28E+01	2,13E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 85	0	8,74E-01	2,85E-02	2,38E+01	3,42E+01	1,57E+03	1,31E-06	3,50E+01	3,45E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 86	0	8,75E-01	4,99E-01	2,34E+01	3,54E+04	3,68E-01	4,51E-05	2,68E+00	1,98E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 88	0	2,44E+00	5,11E+00	3,77E+01	4,87E+01	1,37E-01	1,72E-03	1,84E+01	4,03E+01	Sin enfermedad	Éxito
Caso 89	0	7,30E-02	2,90E-02	5,29E+01	3,57E+01	9,45E+03	2,33E-08	1,60E+00	5,69E+00	Sin enfermedad	Éxito
Caso 91	0	6,73E+00	2,54E-01	2,16E+02	3,27E+02	2,03E-01	1,38E-05	1,49E+01	2,65E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 92	0	2,98E+00	1,65E-02	4,88E+02	1,64E+02	3,46E+00	1,85E-04	1,27E+00	5,90E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 93	0	2,65E-01	4,74E-01	3,85E+01	5,93E+00	2,46E-01	5,69E-06	6,26E+00	6,68E+00	Sin enfermedad	Vivo
Caso 94	0	6,97E+01	9,71E-01	5,03E+01	7,15E+01	2,52E-01	6,91E-07	4,21E+01	1,18E+01	Sin enfermedad	Vivo

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración absoluta normalizada (CAN), referenciada al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FRS2	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 99	0	6,85E+00	2,09E+02	7,85E+01	5,28E+02	1,86E+00	9,38E-03	8,89E+02	2,21E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 100	0	3,57E+00	4,33E-02	1,55E+01	1,34E+02	8,61E-01	2,11E-08	1,88E+00	1,48E+01	Sin enfermedad	Vivo
Caso 3	0	1,45E-02	1,07E-02	3,25E-03	1,33E-01	5,12E+00	9,08E-09	2,89E-01	4,17E-01	Recidiva	Éxito
Caso 9	0	2,20E-02	1,42E-01	1,24E-01	4,70E-01	2,35E+01	2,06E-117	8,26E-01	3,65E-01	Recidiva	Vivo
Caso 12	0	1,11E+00	2,40E-02	8,14E+00	1,00E-01	1,46E+01	7,86E-09	1,52E+00	2,58E-01	Recidiva	Éxito
Caso 14	0	1,41E+00	3,25E-02	7,34E-02	1,30E-01	3,65E+01	4,95E-235	7,62E-01	1,79E-01	Recidiva	Vivo
Caso 16	0	1,83E+00	2,48E-04	7,92E-04	1,10E-01	1,37E+00	1,27E-07	3,49E+01	1,03E+00	Recidiva	Éxito
Caso 17	0	5,40E-01	6,62E-02	3,60E-01	1,48E-01	4,61E+00	2,91E-09	1,04E+00	4,83E-01	Recidiva	Éxito
Caso 20	0	1,48E+01	1,80E-01	5,73E-01	7,76E-02	1,06E+01	7,21E-09	2,04E+00	7,40E-01	Recidiva	Éxito
Caso 22	0	1,58E-01	4,56E-01	6,81E-02	4,21E-01	6,48E-01	6,15E-09	4,47E-01	2,74E-01	Recidiva	Vivo
Caso 31	0	5,29E+00	7,10E-03	4,82E-01	4,54E-01	2,57E-02	2,28E-07	1,54E+00	3,50E-01	Recidiva	Éxito
Caso 40	0	1,60E+01	3,16E-03	4,73E+00	3,36E+00	3,63E+00	1,52E-08	5,64E+00	2,26E+00	Recidiva	Éxito
Caso 42	0	9,71E-01	1,42E-01	3,78E+01	5,07E+00	1,79E+02	4,11E-02	5,81E+01	7,68E-01	Recidiva	Éxito
Caso 43	0	5,12E+00	7,10E-02	1,79E-01	6,59E-01	1,51E+01	1,48E-08	2,75E+00	6,40E-01	Recidiva	Éxito
Caso 56	0	3,93E+00	3,32E-03	3,31E-01	1,48E+00	1,65E+00	7,76E-07	1,20E+03	1,31E+00	Recidiva	Éxito
Caso 61	1	3,10E-01	1,05E-02	1,87E-01	3,13E-02	1,30E+01	4,67E-09	1,46E+00	3,70E-01	Recidiva	Vivo
Caso 64	1	4,39E-03	2,09E-03	7,19E-02	3,31E-02	2,09E-02	3,75E-09	6,43E-01	1,90E-01	Recidiva	Vivo
Caso 65	1	1,64E+00	9,07E-04	1,79E+00	3,57E+00	1,94E+03	1,06E-07	1,12E+01	9,12E+00	Recidiva	Éxito
Caso 66	1	3,18E-01	3,37E-03	5,90E-03	9,10E-01	2,70E+01	1,44E-07	1,03E+00	2,40E+00	Recidiva	Éxito

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración absoluta normalizada (CAN), referenciada al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FR52	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 67	1	2,33E-03	4,33E-04	2,47E-02	3,90E-02	3,77E+01	1,49E-08	6,83E-01	3,10E-01	Recidiva	Éxito
Caso 74	1	1,15E-02	1,39E-03	3,07E-03	5,45E-01	0,00E+00	3,75E-09	5,45E-01	2,55E-01	Recidiva	Éxito
Caso 74	1	7,71E+00	3,57E-01	1,16E-02	1,20E+01	6,90E+00	1,15E-07	1,20E+01	1,22E+00	Recidiva	Éxito
Caso 76	1	1,86E-02	3,26E-03	2,95E-02	2,09E-01	8,33E-03	1,53E-08	7,62E-01	2,48E-01	Recidiva	Vivo
Caso 81	2	1,15E+00	8,56E-02	1,75E-01	3,16E-01	6,19E+01	6,98E-09	2,59E+00	7,89E-01	Recidiva	Éxito
Caso 87	0	9,74E-01	6,16E-01	8,00E+01	1,21E+03	1,39E-02	4,07E-05	2,41E+00	1,42E+01	Recidiva	Éxito
Caso 90	0	1,71E+00	1,07E-01	3,84E+01	1,47E+01	9,64E+02	1,98E-05	7,67E+00	1,22E+01	Recidiva	Vivo
Caso 95	2	3,80E-02	3,52E-03	4,47E+00	2,49E+01	1,02E-01	1,02E-08	4,59E-01	1,83E+00	Recidiva	Éxito
Caso 96	2	3,75E-02	5,42E-03	4,92E+00	3,40E-01	3,92E-02	1,18E-07	4,57E-01	1,30E+00	Recidiva	Éxito
Caso 97	0	4,68E-01	3,02E-03	2,78E+01	1,07E+00	6,75E-02	2,71E-04	1,69E+00	7,43E+00	Recidiva	Éxito
Caso 98	0	2,84E-01	6,67E-02	4,78E+00	5,51E+00	3,50E-02	2,39E-06	7,65E-01	7,64E+00	Recidiva	Éxito
Caso 101	2	9,98E-02	1,04E-02	4,34E+00	7,34E-01	2,06E-03	2,48E-08	4,64E-01	2,28E+00	Recidiva	Éxito
Caso 102	0	2,43E-01	1,30E+01	8,03E-03	2,00E-01	3,02E+03	1,24E-04	1,14E+00	5,19E-01	Recidiva	Éxito

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración absoluta normalizada (CAN), referenciada al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	pN	CR CEA	CR FGFR2b	CR FRS2	CR MYCN	CR SFTPC	CR SHH	CR SHP2	CR SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 1	0	0,776	0,531	3,010	6,793	1,470	1,235	13,861	1,857	Sin enfermedad	Éxito
Caso 2	0	15,285	0,064	1,279	4,820	0,0002	80,430	9,082	1,407	Sin enfermedad	Vivo
Caso 4	0	1,897	0,341	0,963	1,265	0,083	0,607	2,537	0,556	Sin enfermedad	Vivo
Caso 5	0	29,121	0,869	0,541	3,821	0,0001	0,137	1,813	1,063	Sin enfermedad	Vivo
Caso 6	0	139,166	2,893	26,661	178,610	ND ¹	600,353	5,222	4,658	Sin enfermedad	Vivo
Caso 7	0	0,469	0,024	0,085	0,386	0,128	0,133	5,419	0,221	Sin enfermedad	Vivo
Caso 8	0	34,832	0,201	9,307	312,418	1,142	13,926	3,359	4,761	Sin enfermedad	Vivo
Caso 10	0	8,050	0,342	0,824	1,418	0,027	0,425	0,726	0,489	Sin enfermedad	Vivo
Caso 11	0	0,465	0,081	0,298	2,601	0,013	1,324	0,546	0,208	Sin enfermedad	Vivo
Caso 13	0	4,837	0,010	0,334	90,447	0,005	5,734	4,121	1,196	Sin enfermedad	Vivo
Caso 15	0	2,788	0,494	4,392	2,936	0,001	1,808	2,425	0,765	Sin enfermedad	Éxito
Caso 18	0	216,617	0,220	0,015	13,728	0,002	0,536	7,175	3,740	Sin enfermedad	Vivo
Caso 19	0	998,764	1,467	420,220	2,996,370	122,871	131,568	6,246	37,220	Sin enfermedad	Vivo
Caso 21	0	33,336	1,115	0,730	23,818	0,067	59,908	0,368	1,063	Sin enfermedad	Vivo
Caso 23	0	1,172	5,197	0,862	2,817	0,011	141,011	1,437	0,333	Sin enfermedad	Vivo
Caso 24	0	90,447	0,070	1,625	0,206	0,001	0,108	1,318	0,913	Sin enfermedad	Vivo
Caso 25	0	0,435	0,424	0,940	0,231	0,00002	4,154	0,992	1,611	Sin enfermedad	Vivo
Caso 26	0	26,983	2,458	5,426	28,920	0,544	0,177	3,912	3,134	Sin enfermedad	Vivo
Caso 27	0	14,460	2,046	3,160	2,013	0,0001	1,489	3,885	1,027	Sin enfermedad	Vivo
Caso 28	0	49,832	0,026	1,510	9,877	0,002	2,353	1,813	5,307	Sin enfermedad	Vivo

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración relativa (CR) referenciada al status de recidiva y supervivencia.
1, ND: no disponible.

PACIENTE	pN	CR CEA	CR FGFR2b	CR FRS2	CR MYCN	CR SFTPC	CR SHH	CR SHP2	CR SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 29	0	2,427	0,018	1,569	0,835	0,0001	ND ¹	0,828	0,304	Sin enfermedad	Vivo
Caso 30	0	68,072	0,726	3,193	111,353	0,013	65,104	3,912	2,904	Sin enfermedad	Vivo
Caso 32	0	2,916	5,288	0,157	0,823	0,004	2,419	2,663	0,670	Sin enfermedad	Vivo
Caso 33	0	17,679	0,198	0,141	0,530	0,00007	0,440	1,213	0,938	Sin enfermedad	Vivo
Caso 34	0	62,857	0,643	0,031	0,709	0,003	0,826	1,600	0,459	Sin enfermedad	Vivo
Caso 35	0	36.333,179	0,145	2,062,245	297,965	34,440	26,996	50,493	1.406,604	Sin enfermedad	Vivo
Caso 36	0	1.135,412	23,796	1.686,714	7.691,237	0,197	6.768,717	36,077	81,177	Sin enfermedad	Vivo
Caso 37	0	0,124	0,583	0,683	0,372	0,00004	3.665,176	5,252	5,109	Sin enfermedad	Vivo
Caso 38	0	0,388	0,362	0,642	0,455	0,097	0,527	1,442	1,378	Sin enfermedad	Vivo
Caso 39	0	21,025	0,226	0,584	21,466	0,002	0,146	1,048	1,645	Sin enfermedad	Vivo
Caso 41	0	2.302,523	4,587	1.355,867	15.489,468	0,386	5.237,515	51,912	44,570	Sin enfermedad	Vivo
Caso 44	0	0,564	0,661	1,261	0,481	0,00008	1,252	1,983	0,530	Sin enfermedad	Vivo
Caso 45	0	1,300	0,352	1,986	5,772	0,004	1,252	0,789	0,988	Sin enfermedad	Vivo
Caso 46	0	1,291	0,159	0,963	2,360	0,276	0,734	1,556	0,834	Sin enfermedad	Vivo
Caso 47	0	14,065	1,336	1,886	1,351	0,047	0,758	1,721	1,863	Sin enfermedad	Éxito
Caso 48	0	288,815	0,481	3,758	1,978	0,001	9,413	3,538	1,300	Sin enfermedad	Vivo
Caso 49	0	1,291	0,096	0,122	0,910	0,120	0,296	1,645	0,881	Sin enfermedad	Vivo
Caso 50	0	2,249	0,573	0,660	1,957	1,425	2,121	0,817	0,701	Sin enfermedad	Vivo
Caso 51	0	716,091	7,742	218,275	2.060,816	0,290	1.562,528	9,019	53,743	Sin enfermedad	Vivo
Caso 52	0	119,345	4,587	17,815	253,177	12,050	411,477	1,108	6,602	Sin enfermedad	Vivo

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración relativa (CR) referenciada al status de recidiva y supervivencia.
1, ND: no disponible.

PACIENTE	pN	CR CEA	CR FGFR2b	CR FRS2	CR MYCN	CR SFTPC	CR SHH	CR SHP2	CR SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 53	0	11,868	0,548	0,395	24,151	0,006	51,435	0,142	0,630	Sin enfermedad	Vivo
Caso 54	0	0,939	0,086	0,426	0,913	0,00004	1,879	0,271	0,178	Sin enfermedad	Vivo
Caso 55	0	0,290	0,108	0,521	1,845	0,405	9,611	0,345	0,065	Sin enfermedad	Vivo
Caso 57	0	35,977	7,274	2,799	ND ¹	ND	654,689	1,359	4,463	Sin enfermedad	Vivo
Caso 58	0	0,101	0,013	0,588	0,704	0,004	1,585	0,085	0,047	Sin enfermedad	Éxito
Caso 59	0	0,576	3,630	0,048	0,323	0,017	101,629	0,043	0,171	Sin enfermedad	Vivo
Caso 60	0	1,172	0,203	0,519	1,504	0,013	3,248	0,113	0,135	Sin enfermedad	Vivo
Caso 62	1	5,556	12,708	1,490	1,789	0,125	10,230	4,150	5,992	Sin enfermedad	Éxito
Caso 62	1	0,829	0,008	0,648	16,610	ND	0,074	4,326	10,289	Sin enfermedad	Éxito
Caso 63	1	37,897	0,875	4,213	99,664	0,133	0,319	29,764	3,134	Sin enfermedad	Éxito
Caso 63	1	1,568	0,341	1,860	ND	0,087	794,920	7,266	0,297	Sin enfermedad	Éxito
Caso 68	1	0,052	0,034	0,779	0,942	0,000006	5,539	1,966	0,303	Sin enfermedad	Vivo
Caso 69	1	4,067	1,703	0,566	0,131	0,004	1,235	2,924	0,397	Sin enfermedad	Vivo
Caso 70	1	8,465	9,239	0,153	0,238	0,050	25,319	1,589	0,307	Sin enfermedad	Vivo
Caso 71	1	92,990	26,404	75,584	266,686	26,557	0,084	9,082	6,955	Sin enfermedad	Vivo
Caso 72	1	101,758	0,018	1,057	1,101	0,0001	0,137	6,625	1,155	Sin enfermedad	Vivo
Caso 73	1	51,768	2,342	4,098	250,558	0,010	4,578	3,865	6,534	Sin enfermedad	Vivo
Caso 75	1	1,808	22,748	0,671	8,480	0,0001	156,919,668	5,326	2,894	Sin enfermedad	Vivo
Caso 77	2	8,248	1,023	6,543	1,049	0,001	0,809	5,909	9,468	Sin enfermedad	Vivo
Caso 78	2	0,101	0,002	5,260	0,086	0,00006	1,121	4,022	0,945	Sin enfermedad	Vivo

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración relativa (CR) referenciada al status de recidiva y supervivencia.
1, ND: no disponible.

PACIENTE	pN	CR CEA	CR FGFR2b	CR FRS2	CR MYCN	CR SFTPC	CR SHH	CR SHP2	CR SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 79	2	34,392	0,103	2,694	20,308	11,843	0,784	8,727	0,770	Sin enfermedad	Vivo
Caso 80	2	1.002,231	0,124	4,287	55,484	0,030	0,016	3,550	3,502	Sin enfermedad	Vivo
Caso 82	2	0,749	0,392	1,993	0,584	0,202	4,690	4,693	1,108	Sin enfermedad	Vivo
Caso 82	2	0,135	0,026	0,895	5,852	0,00001	0,271	4,541	1,359	Sin enfermedad	Vivo
Caso 83	2	54,910	90,677	14,723	17,679	1,236	0,352	4,978	59,219	Sin enfermedad	Vivo
Caso 84	0	18,558	4,416	5,187	25,795	152,113	46,355	0,598	1,493	Sin enfermedad	Vivo
Caso 85	0	2,660	0,854	1,558	10,921	811,248	8,967	1,703	0,831	Sin enfermedad	Vivo
Caso 86	0	2,364	12,403	2,667	248,827	0,641	5,896	0,328	4,604	Sin enfermedad	Vivo
Caso 88	0	7,118	105,615	4,579	6,793	0,560	454,982	3,048	8,271	Sin enfermedad	Éxito
Caso 89	0	0,162	0,610	5,134	1,536	0,032	0,530	1,078	1,123	Sin enfermedad	Éxito
Caso 91	0	19,213	6,159	25,723	19,080	0,545	8,875	9,273	4,901	Sin enfermedad	Vivo
Caso 92	0	5,839	0,271	5,537,427	643,145	330,613	3,260	50,493	169,249	Sin enfermedad	Vivo
Caso 93	0	2,304	17,724	6,964	1,884	1,082	16,389	4,121	2,996	Sin enfermedad	Vivo
Caso 94	0	334,648	30,120	5,187	13,680	1,128	23,178	3,953	2,310	Sin enfermedad	Vivo
Caso 99	0	38,626	3,952	1,796	109,820	9,057	354,506	17,729	4,935	Sin enfermedad	Vivo
Caso 100	0	32,200	0,897	12,597	23,247	5,975	0,471	19,067	40,448	Sin enfermedad	Vivo
Caso 3	0	0,259	0,327	0,263	3,408	0,038	4,301	0,185	3,006	Recidiva	Éxito
Caso 9	0	0,124	0,778	0,042	2,352	0,076	1,315	0,731	0,840	Recidiva	Vivo
Caso 12	0	7,408	0,314	1,028	0,952	0,034	0,210	1,163	0,519	Recidiva	Éxito
Caso 14	0	10,997	0,309	0,371	0,812	0,166	0,285	0,754	0,463	Recidiva	Vivo
Caso 16	0	11,306	0,061	1,288	12,545	0,001	4,578	3,048	1,622	Recidiva	Éxito

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración relativa (CR) referenciada al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	pN	CR CEA	CR FGFR2b	CR FRS2	CR MYCN	CR SFTPC	CR SHH	CR SHP2	CR SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 17	0	4,284	0,562	0,963	0,975	0,014	0,104	0,961	1,462	Recidiva	Éxito
Caso 20	0	134,737	0,621	0,367	1,017	0,001	0,163	1,617	2,270	Recidiva	Éxito
Caso 22	0	3,008	1,167	0,042	6,338	0,004	0,146	1,217	2,032	Recidiva	Vivo
Caso 31	0	45,538	0,169	3,945	3,528	0,00003	4,546	2,141	1,078	Recidiva	Éxito
Caso 40	0	62,423	0,145	17,630	22,146	0,005	4,941	2,635	3,701	Recidiva	Éxito
Caso 42	0	7,180	5,888	36,378	87,064	0,051	321,721	4,800	0,632	Recidiva	Éxito
Caso 43	0	33,336	0,751	0,793	4,904	0,077	0,413	2,170	1,605	Recidiva	Éxito
Caso 56	0	8,480	0,312	2,028	12,458	0,0005	27,948	0,185	0,325	Recidiva	Éxito
Caso 61	1	0,501	0,126	0,233	0,144	0,023	0,151	0,467	0,294	Recidiva	Vivo
Caso 64	1	0,024	0,032	0,618	0,457	0,00002	0,471	2,212	0,256	Recidiva	Vivo
Caso 65	1	18,240	0,084	15,032	151,062	5,506	0,365	11,596	12,933	Recidiva	Éxito
Caso 66	1	27,218	0,295	1,659	17,196	0,107	0,039	3,508	3,336	Recidiva	Éxito
Caso 67	1	0,011	0,010	0,238	0,365	0,324	17,505	2,455	0,461	Recidiva	Éxito
Caso 74	1	0,019	0,023	0,026	0,182	ND ¹	0,475	1,388	0,110	Recidiva	Éxito
Caso 74	1	18,883	5,493	0,774	6,382	0,006	0,054	3,453	0,369	Recidiva	Éxito
Caso 76	1	0,252	0,049	0,871	4,560	0,00002	2,620	4,742	0,744	Recidiva	Vivo
Caso 81	2	12,987	0,467	2,387	5,594	0,733	62,452	5,180	2,004	Recidiva	Éxito
Caso 87	0	3,603	15,754	8,000	21,993	0,048	16,618	1,514	3,267	Recidiva	Éxito
Caso 90	0	8,779	2,554	4,454	1,878	307,406	10,124	6,512	2,310	Recidiva	Vivo
Caso 95	2	0,171	0,064	0,563	1,075	0,154	0,202	0,444	0,471	Recidiva	Éxito

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración relativa (CR) referenciada al status de recidiva y supervivencia.
1, ND: no disponible.

PACIENTE	pN	CR CEA	CR FGFR2b	CR FRS2	CR MYCN	CR SFTPC	CR SHH	CR SHP2	CR SOX17	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 96	2	0,213	0,107	0,973	0,422	0,109	0,624	0,749	0,491	Recidiva	Éxito
Caso 97	0	2,369	0,047	4,141	0,228	0,179	6,679	3,638	3,563	Recidiva	Éxito
Caso 98	0	1,595	1,482	0,986	0,806	0,131	1,741	0,875	3,575	Recidiva	Éxito
Caso 101	2	1,038	0,214	0,747	0,148	0,012	0,572	0,189	0,900	Recidiva	Éxito
Caso 102	0	8,748	0,854	0,917	0,170	482,371	0,586	1,529	1,567	Recidiva	Éxito

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los tumores primarios, medida como concentración relativa (CR) referenciada al status de recidiva y supervivencia.

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en las muestras de pulmón normal apareado de algunos pacientes de la serie tumoral, medida como concentración absoluta normalizada (CAN).

Muestras de pulmón normal apareado

PACIENTE	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FRS2	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17
Caso 84	1,82E+00	7,71E+00	1,83E+01	1,10E+00	3,54E+01	1,46E-05	8,95E+01	1,48E-01
Caso 85	1,08E+01	3,65E+00	5,08E+01	9,94E-01	2,82E-01	2,54E-02	1,23E+03	1,32E-02
Caso 86	2,87E+00	1,24E+00	7,17E+00	1,19E+00	5,29E+03	7,64E-04	5,30E+01	1,44E-02
Caso 87	1,80E-01	4,07E-01	3,95E+00	4,83E-01	2,71E+00	3,08E-06	1,08E+01	6,68E-02
Caso 88	1,53E-01	1,39E+00	3,11E+00	1,65E-01	1,35E+00	2,25E-06	8,33E+00	6,20E-02
Caso 89	1,69E+00	1,69E+00	6,58E+00	8,97E-01	1,45E+01	9,94E-05	2,12E+01	9,22E-02
Caso 90	4,36E-02	6,55E-01	3,34E+00	4,41E+00	3,86E+01	8,51E-02	1,26E+00	3,89E-01
Caso 91	2,32E-02	2,37E-01	2,06E+00	3,68E-01	1,68E+01	1,00E-05	1,24E+00	1,31E-01
Caso 92	1,66E-01	3,60E-01	2,07E+00	1,15E-01	9,36E+01	5,53E-05	1,04E+00	1,41E-01
Caso 93	9,44E-02	1,35E+00	2,23E+00	3,80E-02	6,63E+01	1,53E-02	1,04E+00	8,24E-02
Caso 94	3,00E-01	7,93E-01	2,26E+00	3,16E-02	8,50E+01	6,45E-06	8,95E-01	4,35E-02
Caso 95	1,41E-01	1,30E+00	1,98E+00	7,44E-02	9,77E+01	3,54E-03	1,41E+00	5,28E-02
Caso 96	3,31E-02	1,93E-01	6,52E-01	1,31E-02	3,65E+01	3,15E-05	3,56E-01	2,86E-02
Caso 97	6,15E-01	3,79E+00	8,59E+00	2,75E+03	1,47E+05	8,20E-03	3,06E+01	3,93E+02
Caso 98	7,06E-02	1,12E+00	1,58E+00	8,28E-02	3,08E+01	6,09E-05	1,63E+00	8,95E-02
Caso 99	3,23E-01	3,04E+00	6,59E+00	5,10E-01	2,15E+01	8,83E-03	1,67E+01	7,08E-02
Caso 100	1,68E-01	1,97E+00	3,61E+00	2,67E-01	6,39E+00	7,82E-03	6,00E+00	7,44E-02
Caso 101	4,96E-01	1,40E+00	9,56E+00	1,20E+00	6,72E+01	5,43E-02	2,76E+01	1,64E-01
Caso 102	3,83E-01	2,76E+00	1,22E-02	3,39E-01	4,39E+03	6,86E-02	1,34E+00	1,93E-01

Datos de las réplicas del *pool* de pulmón normal para cada marcador embrionario. Se expresan como concentración absoluta normalizada (CAN). 1, ND: no disponible.

Réplicas del *pool* de pulmón normal

RÉPLICA	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN FRS2	CAN MYCN	CAN SFTPC	CAN SHH	CAN SHP2	CAN SOX17
1	0,366	1,599	0,425	0,037	2,003	0,423	3,564	9,572
2	0,250	1,379	0,265	0,030	2,003	0,283	9,936	11,596
3	0,282	1,346	0,203	0,025	2,028	0,296	3,812	13,730
4	0,307	1,258	0,327	0,020	2,369	0,381	11,336	8,613
5	0,471	2,013	0,630	0,023	2,138	0,565	4,924	6,000
6	0,410	2,009	0,633	0,018	2,031	ND ¹	10,637	6,520
7	0,480	1,993	0,684	0,021	1,761	ND	5,601	7,853
8	0,700	4,024	1,365	0,019	2,047	ND	11,420	7,484
9	0,413	1,833	0,569	0,029	2,100	ND	3,250	8,129
10	0,295	1,275	ND ¹	ND	ND	ND	10,920	ND

Anexo 10. Concentración absoluta tumoral según histología

CONCENTRACIÓN ABSOLUTA NORMALIZADA TUMORAL SEGÚN HISTOLOGÍA							
	Adenocarcinoma (n ¹ =44)		Carcinoma escamoso (n=50)		Carcinoma célula grande Tumores mixtos (n=8)		P
	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	
CEACAM5	2,01	6,91	0,76	2,13	0,68	31,19	0,24
FGFR2b	0,014	0,57	0,16	1,24	0,058	0,17	0,04
FRS2	0,11	1,14	0,34	23,39	0,18	3,6	0,08
MYCN	0,1	9,43	0,43	2,82	0,035	3,75	0,5
SFTPC	0,98	11,28	9,3	64,85	5,05	20,58	0,09
SHH	1,39·10⁻⁷	1,93·10 ⁻⁵	9,49·10⁻⁷	4,18·10 ⁻⁵	1,28·10⁻⁸	1,56·10 ⁻⁶	0,13
SHP2	2,19	5,17	2,76	17	2,75	4,24	0,62
SOX17	0,14	1,32	0,11	0,35	0,045	0,13	0,55

Anexo 11. Análisis de correlación

MARCADOR	CEACAM5		FGFR2b		FRS2		MYCN		SFTPC		SHH		SHP2		SOX17			
	Variable	n ¹	FC <0,5/>2	P														
Edad	<70 años	62	10/46	0,65	35/15	0,25	11/25	0,78	11/31	0,41	48/10	0,12	15/30	0,95	9/30	0,94	16/22	0,12
	≥70 años	40	7/27		16/12		8/18		3/25		30/3		9/21		5/19		4/15	
Histología	ADK	44	5/36		26/10		8/15		7/22		35/6		8/22		8/28		11/15	
	CE	50	10/32	0,29	21/17	0,1	9/25	0,51	4/31	0,23	36/6	0,57	13/26	0,69	5/16	0,3	7/18	0,49
Estadio patológico	CCG/CNCG/TM	8	2/5		4/0		2/3		3/3		7/1		3/3		1/5		2/4	
	IA	31	5/22		15/7		11/9		2/16		22/5		7/15		4/12		8/11	
	IB	26	2/21		11/11		2/12		5/17		19/4		4/17		1/16		4/10	
	IIA	25	5/18	0,55	12/8	0,33	3/13	0,28	3/16	0,13	18/3	0,8	8/12	0,39	5/13	0,3	6/11	0,35
	IIB	8	1/5		5/1		2/3		2/3		8/0		2/4		2/3		1/2	
Invasión linfática	III A/IV	11/1	3+1/7		7+1/0		1/6		2/4		10+1/1		2+1/3		1+1/5		0+1/3	
	Sí	17	3/11	0,58	12/3	0,22	3/9	0,57	9/5	0,1	14/2	1	6/8	0,45	4/9	0,26	4/6	0,88
Tipo de resección	No	85	14/62		39/24		16/34		47/9		64/11		18/43		10/40		16/31	
	Segmentectomía	5	1/3		4/1		1/1		0/2		5/0		2/3		0/3		0/1	
	Lobectomía	81	12/61	0,31	39/23	0,66	16/33	0,66	13/44	0,59	60/11	1	16/42	0,34	13/39	0,76	17/32	0,43
Recidiva	Neumonectomía	16	4/9		8/3		2/9		1/10		13/2		6/6		1/7		3/4	
	Local	12	3/6		8/2		4/2		1/7		10/2		6/4		3/5		3/5	
	Distancia	11	2/8	0,69	8/1	0,52	2/5	0,41	2/5	0,76	11/0	0,4	4/4	0,93	3/5	0,63	3/2	0,51
Ambas	6	1/5		2/1		0/2		2/2		5/1		2/2		0/2		0/3		

Factores asociados a expresión molecular tumoral. El análisis de SFTPC se realizó en base a 100 pacientes; el de SHH, en base a 101. 1, n: número de pacientes.

NIVELES DE CONCENTRACIÓN RELATIVA			CEACAM5-β2M			FGFR2b-β2M		
Variable		n ¹	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	P	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	P
Sexo	Hombre	86	6,35	44,12	0,23	0,55	2,24	0,34
	Mujer	16	16,45	82,86		0,37	0,41	
Edad	<70 años	62	7,69	64,74	0,41	0,39	1,72	0,26
	≥70 años	40	5,98	37,64		0,7	2,14	
Tabaquismo	Sí y pasivo	86	7,52	45,61	0,99	0,45	7,36	0,2
	No	16	4,91	62,84		0,61	2,85	
Estadio patológico	IA	31	9,2	80,43	0,9	0,53	1,6	0,099
	IB	26	22	84,61		0,8	2,4	
	IIA	25	6,8	47,35		0,61	10,64	
	IIB	8	3,04	7,91		0,3	0,56	
	IIIA	11	2,49	8,16		0,27	0,57	
	IIIB/IV	1	0,3	0		0,063	0	
Tamaño tumoral	≤2 cm	23	3,22	41,06	0,26	0,41	5,19	0,21
	(2-3] cm	25	23,61	83,32		0,78	1,99	
	(3-5] cm	29	8,58	61,53		0,48	2,25	
	(5-7] cm	20	5,39	44,33		0,55	0,77	
	>7 cm	5	2,40	11,45		0,064	0,41	
Histología	Adenocarcinoma	44	30,79	105,17	0,86	0,39	1,23	0,42
	Carcinoma escamoso	50	3,67	15,96		0,64	2,39	
	CCG/CNCG/Mixto	8	5,86	70,66		0,42	0,63	
Invasión vascular	Sí	22	4,97	38,75	0,21	0,26	0,43	0,02
	No	80	7,15	60,12		0,6	2,29	
Invasión linfática	Sí	17	5,48	39,59	0,51	0,26	0,96	0,15
	No	85	6,80	61,54		0,56	2,22	
Invasión perineural	Sí	5	22,19	38,04	0,76	0,31	1,9	0,69
	No	97	6,48	54,36		0,53	2,04	
Tipo de resección	Segmentectomía	5	4,81	151,69	0,73	0,48	1,2	0,56
	Lobectomía	81	9,20	63,48		0,55	2,32	
	Neumonectomía	16	2,04	19,13		0,52	0,98	
Recidiva	Sí	29	4,29	21,62	0,06	0,31	0,64	0,11
	No	73	9,20	71,6		0,57	2,42	
Tipo de recidiva	Local	12	1,66	4,8	0,64	0,26	0,47	0,26
	Distancia	11	9,83	42,53		0,26	0,47	
	Ambas	6	5,32	13,42		0,8	4,94	

Niveles de concentración relativa de CEACAM5 y FGFR2b según variables clínicas

NIVELES CONCENTRACIÓN RELATIVA		FRS2-βA				MYCN-β2M			
Variable		n ¹	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	p	n	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	p
Sexo	Hombre	86	1,28	4,55	0,62	86	3,17	21,35	0,53
	Mujer	16	0,92	3,04		15	1,96	21,13	
Edad	<70 años	62	1,16	4,05	0,86	62	2,19	17,15	0,19
	≥70 años	40	1,61	3,52		39	4,9	27,58	
Tabaquismo	Sí y pasivo	86	1,27	4,6	0,99	86	3,17	21,07	0,63
	No	16	1,27	2,9		16	1,88	89,43	
Estadio patológico	IA	31	0,71	2,71	0,5	31	2,35	101,2	0,07
	IB	26	1,4	4,4		25	9,88	3,39	
	IIA	25	2,03	4,08		25	6,79	21,66	
	IIB	8	1,11	3,64		8	1,34	2,96	
	IIIA	11	2,69	4,25		11	1,46	16,79	
	IIIB/IV	1	0,56	0		1	1,07	0	
Tamaño tumoral	≤2 cm	23	0,66	17,52	0,23	23	2,6	20,56	0,25
	(2-3] cm	25	0,99	2,83		25	2,41	30,96	
	(3-5] cm	29	2,69	4,55		28	2,5	21,85	
	(5-7] cm	20	2,73	3,57		20	3,47	15,05	
	>7 cm	5	1,26	2,04		5	0,48	2,57	
Histología	Adenocarcinoma	44	0,96	3,05	0,43	43	2,41	19,47	0,04
	Carcinoma escamoso	50	1,98	4,53		50	3,68	25,09	
	CCG/CNCG/Mixto	8	0,87	14,1		8	1,12	16,91	
Invasión vascular	Sí	22	1,58	4,51	0,85	22	2,18	23,44	0,95
	No	80	1,21	3,88		79	2,82	21,13	
Invasión linfática	Sí	17	2,03	6,53	0,25	17	3,53	118,79	0,76
	No	85	1,16	3,85		84	2,51	20,83	
Invasión perineural	Sí	5	2,03	8,06	0,75	5	17,2	77,95	0,4
	No	97	1,16	3,94		96	2,39	21,12	
Tipo de resección	Segmentectomía	5	0,94	2,08	0,79	5	1,98	56,56	0,76
	Lobectomía	81	1,06	3,96		80	2,51	21,18	
	Neumonectomía	16	2,56	4,21		16	2,88	22,36	
Recidiva	Sí	29	0,97	2,92	0,39	29	1,88	11,68	0,1
	No	73	1,56	4,59		72	2,88	24,27	
Tipo de recidiva	Local	12	0,85	1,32	0,44	12	2,88	15,03	0,51
	Distancia	11	1,16	3,38		11	1,71	11,44	
	Ambas	6	1,32	4,22		6	0,82	8,96	

Niveles de concentración relativa de FRS2 y MYCN según variables clínicas

NIVEL CONCENTRACIÓN RELATIVA		SFTPC-β2M				SHH-β2M			
Variable		n ¹	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	p		Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	p
Sexo	Hombre	85	0,0094	0,07	0,43	85	1,74	19,4	0,53
	Mujer	15	0,0015	0,026		16	4,5	7,56	
Edad	<70 años	61	0,0019	0,04	0,05	61	1,88	19,29	0,63
	≥70 años	39	0,016	0,096		40	4,05	15,29	
Tabaquismo	Sí y pasivo	86	0,0094	0,064	0,29	86	1,81	23,78	0,77
	No	16	8,58·10 ⁻⁴	0,13		16	4,5	8,66	
Estadio patológico	IA	31	0,016	0,11	0,75	30	2	16,47	0,48
	IB	24	0,0018	0,094		26	7,57	61,41	
	IIA	25	0,0033	0,058		25	1,81	23,93	
	IIB	8	0,013	0,061		8	2,94	5,55	
	IIIA	11	0,0014	0,013		11	0,78	3,22	
	IIIB/IV	1	1,57·10 ⁻⁴	0	1	0,2	0		
Tamaño tumoral	≤2 cm	23	0,011	0,24	0,42	22	1,6	12,81	0,48
	(2-3] cm	25	0,016	0,092		25	1,31	30,12	
	(3-5] cm	27	0,0019	0,053		29	2,35	12,8	
	(5-7] cm	20	0,0059	0,056		20	4,89	26,17	
	>7 cm	5	8,53·10 ⁻⁵	0,0059		5	1,58	42,64	
Histología	Adenocarcinoma	43	0,0019	0,031	0,49	43	2,12	126,73	0,14
	Carcinoma escamoso	49	0,014	0,1		50	2,84	16	
	CCG/CNCG/Mixto	8	0,0024	0,13		8	1,05	99,68	
Invasión vascular	Sí	22	0,0062	0,066	0,74	22	1,18	5,75	0,18
	No	78	0,008	0,11		79	3,25	24,75	
Invasión linfática	Sí	17	0,026	0,066	0,78	17	1,12	20,62	0,43
	No	83	0,0046	0,065		84	2,24	16,01	
Invasión perineural	Sí	5	0,063	0,19	0,04	5	27,95	77,33	0,77
	No	95	0,0033	0,052		96	2	14,2	
Tipo de resección	Segmentectomía	5	0,014	0,038	0,84	5	4,58	9,58	0,87
	Lobectomía	79	0,0047	0,065		80	2,39	20,89	
	Neumonectomía	16	0,0086	0,09		16	0,89	37,9	
Recidiva	Sí	29	0,0033	0,061	0,7	29	0,59	4,53	0,004
	No	71	0,0077	0,064		72	3,25	49,37	
Tipo de recidiva	Local	12	0,034	0,11	0,4	12	0,44	4,39	0,44
	Distancia	11	11	8,93·10 ⁻⁴		11	0,62	4,6	
	Ambas	6	6	0,0016		6	1,16	8,81	

Niveles de concentración relativa de SFTPC y SHH según variables clínicas

NIVELES DE CONCENTRACIÓN RELATIVA			SHP2-β2M			SOX17-β2M		
Variable		n ¹	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	P	Mediana (ng/μL)	Q3-Q1 (ng/μL)	P
Sexo	Hombre	86	0,93	3,67	0,55	1,13	4,03	0,86
	Mujer	16	0,76	0,79		1,32	1,73	
Edad	<70 años	62	1,05	3,69	0,52	1,34	3,45	0,97
	≥70 años	40	0,78	2,77		1,1	4,97	
Tabaquismo	Sí y pasivo	86	1	3,65	0,056	1,06	3,59	0,18
	No	16	0,53	1,21		1,89	6,75	
Estadio patológico	IA	31	0,63	0,94	0,82	1,03	1,99	0,7
	IB	26	1,15	4,82		1,98	5,4q	
	IIA	25	1,06	3,89		1,42	4,77	
	IIB	8	0,5	3,17		1,16	3,76	
	IIIA	11	1,15	4,05		0,82	4,05	
	IIIB/IV	1	0,024	0		0,99	0	
Tamaño tumoral	≤2 cm	23	0,68	2,89	0,55	0,86	1,32	0,53
	(2-3] cm	25	0,96	3		1,45	3,07	
	(3-5] cm	29	1,29	4,52		1,11	5,85	
	(5-7] cm	20	0,58	0,98		1,63	4,14	
	>7 cm	5	0,13	4,44		1,96	3,31	
Histología	Adenocarcinoma	44	1,21	4,09	0,52	1,66	4	0,83
	Carcinoma escamoso	50	0,78	2,44		0,91	2,22	
	CCG/CNCG/Mixto	8	1,04	5,06		2,12	3,19	
Invasión vascular	Sí	22	1	2,74	0,58	0,75	1,48	0,07
	No	80	0,78	3,5		1,48	4,01	
Invasión linfática	Sí	17	0,89	4,04	0,5	0,86	3,4	0,84
	No	85	0,9	2,79		1,42	3,99	
Invasión perineural	Sí	5	2,78	3,1	0,29	0,83	0,67	0,099
	No	97	0,88	2,96		1,42	3,96	
Tipo de resección	Segmentectomía	5	0,79	2,32	0,6	0,69	2,88	0,54
	Lobectomía	81	0,88	3,48		1,56	4,65	
	Neumonectomía	16	1,05	2,73		0,7	0,84	
Recidiva	Sí	29	0,65	0,83	0,02	1,11	2,21	0,89
	No	73	1,29	3,87		1,42	4,74	
Tipo de recidiva	Local	12	0,77	1,7	0,95	1,05	1,23	0,07
	Distancia	11	0,41	1,06		0,99	2	
	Ambas	6	0,52	2,28		2,65	8,81	

Niveles de concentración relativa de SHP2 y SOX17 según variables clínicas

Anexo 12. Análisis multivariante de correlación

Los análisis multivariantes de factores que se correlacionan con la expresión tumoral de los marcadores se realizaron mediante la regresión ordinal.

CEACAM5

La invasión vascular intratumoral se asoció de forma independiente a infraexpresión tumoral de CEACAM5. El motivo de incluir el estadio patológico, la histología y la recidiva fue porque son variables clínicamente relevantes.

Variable	p valor	Estimación	Intervalo de confianza 95%		
CEACAM5-β2M (n¹=94)					
Edad	0,49	-0,02	-0,09	0,04	
Sexo	0,95	0,056	-1,55	1,66	
Estadio	I	0,16	0,99	-0,38	2,36
	II	0,37	0,68	-0,81	2,18
Invasión vascular intratumoral	0,04	-1,05	-2,09	-0,02	
Adenocarcinoma	0,21	0,74	0,42	1,89	
Recidiva	0,8	-0,14	-1,2	0,92	

Análisis multivariante de variables asociadas a la expresión tumoral de CEACAM5. Referencia: CEACAM5 sobreexpresado, estadio III-IV, adenocarcinoma. Test de Pearson: p=0,3. Desviación: p=0,98. 1, n: número de pacientes. n=94 (excluidos 8 casos con CCG/TM).

FGFR2b

Se evidenció que los pacientes con invasión intratumoral, especialmente vascular, o recidiva se asociaban de forma independiente a infraexpresión tumoral de FGFR2b. En los modelos incluyendo el descriptivo pN, se aprecia que la afectación pN0 se asocia a mayor tendencia a sobreexpresión tumoral de FGFR2b que la afectación pN1-2 [0,99 (IC 95% -0,06-1,92), p=0,04].

Análisis multivariante de variables asociadas a la expresión tumoral de FGFR2b. Referencia: FGFR2b sobreexpresado. Test de Pearson: $p=0,82$. Desviación: $p=0,9$. 1, n: número de pacientes.

FGFR2b- β 2M (n ¹ =102)					
Variable	p valor	Estimación	Intervalo de confianza 95%		
Edad	0,19	-0,56	-1,4	0,28	
Sexo	0,14	0,93	-0,32	2,19	
Estadio I-II	0,1	1,21	-0,25	2,68	
Histología	Carcinoma escamoso	0,42	0,65	-0,92	2,22
	Adenocarcinoma	0,83	0,17	-1,4	1,74
Recidiva	0,049	-0,9	-1,8	-0,002	
Invasión vascular intratumoral	0,02	-1,24	-2,31	-0,18	

FRS2

Analizando el FRS2 con el gen de referencia β actina, se propuso un modelo con edad, sexo, pT y recidiva; ninguno de estas variables correlacionaba con la expresión de FRS2. En cambio, el mismo modelo reemplazando pT por tamaño tumoral, descubrió que los tumores >3 cm se asociaban de forma significativa a sobreexpresión de FRS2.

Análisis multivariante de variables asociadas a la expresión tumoral de FRS2. Referencia: FRS2 sobreexpresado. Test de Pearson: $p=0,12$. Desviación: $p=0,03$. 1, n: número de pacientes.

FRS2- β A (n ¹ =102)				
Variable	p valor	Estimación	Intervalo de confianza 95%	
Edad	0,97	-0,01	-0,77	0,74
Sexo	0,87	-0,08	-1,11	0,94
Tamaño tumoral >3 cm.	0,01	0,96	0,2	1,72
Recidiva	0,2	-0,54	-1,36	0,28

MYCN

Se evaluó un modelo que incluyó edad, sexo, tabaquismo, invasión intratumoral, estadio patológico e histología. Se incluyeron estos dos últimos ítems porque clínicamente eran interesantes y porque en el análisis univariante con los niveles, había asociación $p<0,1$. Sólo se evidenció una tendencia a la sobreexpresión tumoral de MYCN en los pacientes con carcinoma escamoso.

MYCN-βA (n ² =101)					
Variable	p valor	Estimación	Intervalo de confianza 95%		
Edad	0,3	0,03	-0,03	0,08	
Sexo	0,94	-0,05	-1,36	1,26	
Histología	Adenocarcinoma	0,15	1,06	-0,4	2,51
	Carcinoma escamoso	0,07	1,35	-0,12	2,83
Tabaquismo	0,17	0,89	-0,39	2,17	
Invasión intratumoral	0,66	0,19	-0,64	1,01	

Análisis multivariante de variables asociadas a la expresión tumoral de MYCN. Referencia: MYCN sobreexpresado, CCG/TM. Test de Pearson: p=0,28. Desviación: p=0,24. 1, n: número de pacientes. n=101 (1 caso perdido por no tener determinación de MYCN).

SFTPC

No se evidenciaron factores asociados a sobreexpresión o infraexpresión tumoral de SFTPC, aunque la recidiva tenía tendencia a asociarse a infraexpresión.

SFTPC-βA (n ² =100)				
Variable	p valor	Estimación	Intervalo de confianza 95%	
Edad	0,89	0,07	-0,92	1,05
Sexo	0,36	0,74	-0,85	2,33
Recidiva	0,097	-1,09	-2,37	0,2

Análisis multivariante de variables asociadas a la expresión tumoral de SFTPC. Referencia: SFTPC sobreexpresado. Test de Pearson: p=0,053. Desviación: p=0,052. 1, n: número de pacientes. n=100 (2 casos perdidos por no tener determinación de SFTPC).

SHH

La recidiva y la afectación histológica ganglionar se asociaron de forma independiente a infraexpresión tumoral de SHH.

SHH-β2M (n ² =101)				
Variable	p valor	Estimación	Intervalo de confianza 95%	
Edad	0,72	0,009	-0,04	0,06
Sexo	0,13	-0,9	-2,08	0,28
pN1-2	0,006	-1,26	-2,16	-0,37
Recidiva	0,03	-0,94	-1,79	-0,09

Análisis multivariante de variables asociadas a la expresión tumoral de SHH. Referencia: SHH sobreexpresado. Test de Pearson: p=0,33. Desviación: p=0,44. 1, n: número de pacientes. n=101 (1 caso perdido en ambos por no tener determinación de SHH).

SHP2

El carcinoma escamoso se asoció a mayor expresión tumoral de SHP2-βA, en comparación con el adenocarcinoma.

Análisis multivariante de variables asociadas a la expresión tumoral de SHP2. Referencia: SHP2 sobreexpresado.

Test de Pearson: $p=0,58$. Desviación: $p=0,44$. I, n: número de pacientes. $n=94$ (excluidos 8 casos con CCG/TM).

Variable	p valor	Estimación	Intervalo de confianza 95%	
SHP2-βA (n¹=94)				
Edad	0,06	-0,05	-0,11	0,001
Sexo	0,95	-0,04	-1,21	1,13
Carcinoma escamoso	0,03	0,46	0,11	1,9
Recidiva	0,21	-0,57	-1,36	0,4

SOX17

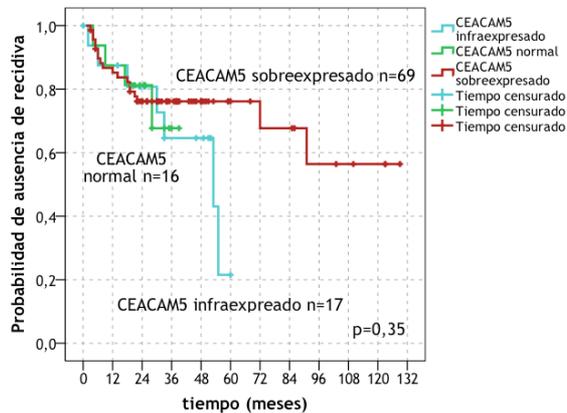
Para el SOX17, no se apreciaron variables asociadas a expresión. Sólo decir que los pacientes tratados con lobectomía o presentaban una tendencia a presentar mayor expresión de SOX17 (1,08 IC 95% -0,43-1,28, $p=0,052$) respecto la neumonectomía, mientras que los no fumadores estaban más sobreexpresados ($p>0,05$).

Anexo 13. Análisis del tiempo libre de enfermedad y supervivencia global según expresión tumoral de los marcadores en la serie global, según histología y según otras variables

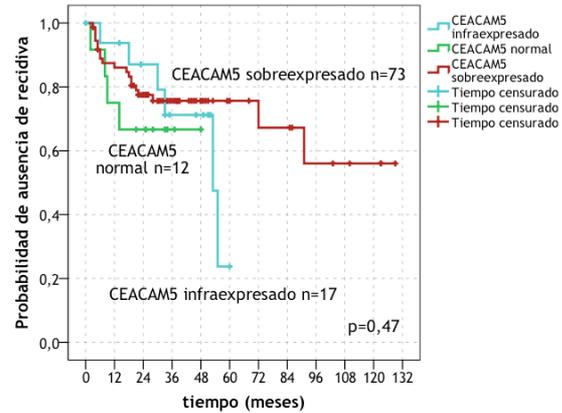
CEACAM5

Serie global

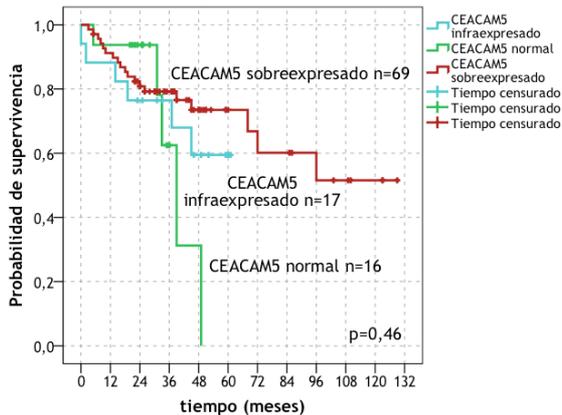
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE CEACAM5-βA



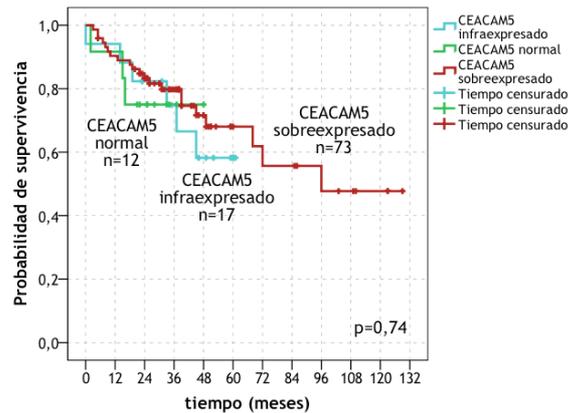
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, EXPRESIÓN SEGÚN CEACAM5-β2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE CEACAM5-βA



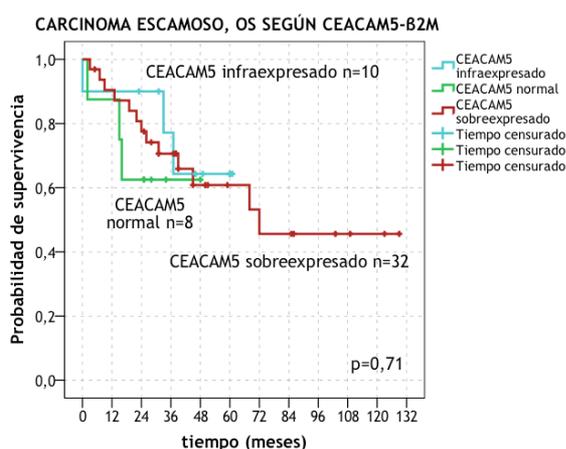
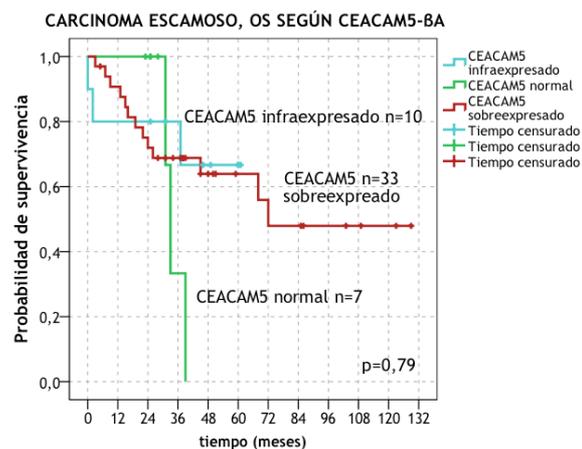
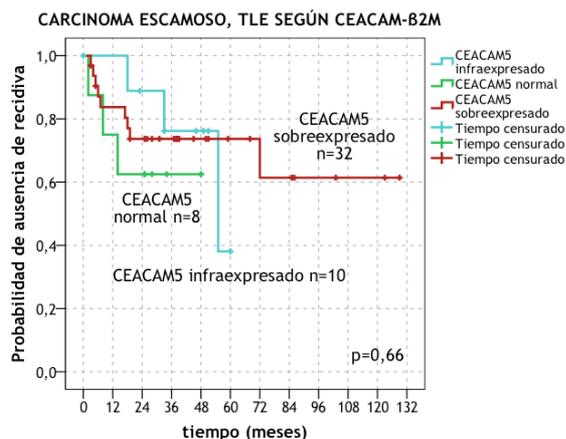
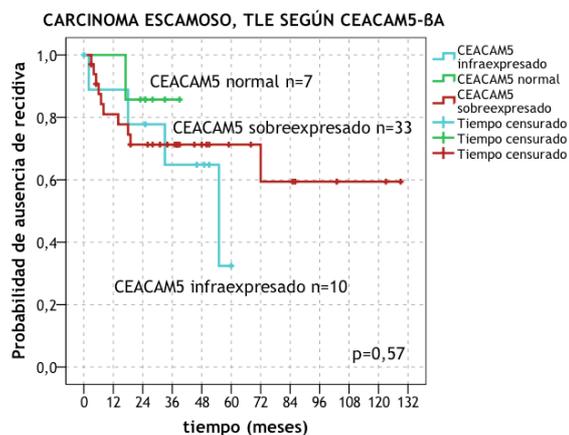
SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE CEACAM5-β2M



Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=102) según expresión tumoral de CEACAM5. 1: meses; 2, a: años.

CEACAM5	TLE					OS					
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a ²	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		43	5,1	88%	22%	-	45,3	5,5	88%	60%	-
Expresión normal		32,1	3	88%	-	-	37,8	4,2	94%	0%	0%
Sobreexpresado		91,7	8	85%	76%	56%	89,4	7,7	91%	74%	52%
Gen de referencia β2M	TLE					OS					
	Infraexpresado	46,5	4,4	94%	24%	-	46,7	4,9	94%	58%	-
	Expresión normal	34,7	5,5	75%	-	-	38,8	4,7	92%	-	-
Sobreexpresado	91,5	7,8	86%	76%	56%	86	7,6	90%	68%	48%	

Carcinoma escamoso

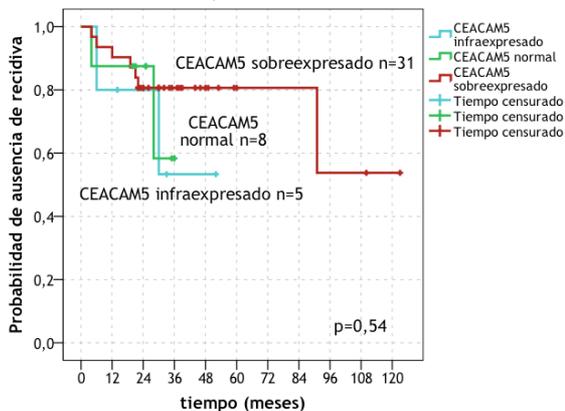


CARCINOMA ESCAMOSO											
CEACAM5	TLE					OS					
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		43,8	6,9	89%	32%	.	45,8	7,7	80%	67%	-
Expresión normal		35,9	2,9	100%	-	-	34,3	2,4	100%	0%	0%
Sobreexpresado		87,9	10,9	81%	71%	59%	80	10,2	91%	64%	48%
Gen de referencia β2M	TLE					OS					
Infraexpresado		50	4,9	100%	38%	-	48,2	6,5	90%	64%	-
Expresión normal		33	6,9	75%	-	-	34,1	6,5	88%	-	-
Sobreexpresado		90,7	10,9	84%	74%	61%	78,7	10,2	90%	61%	46%

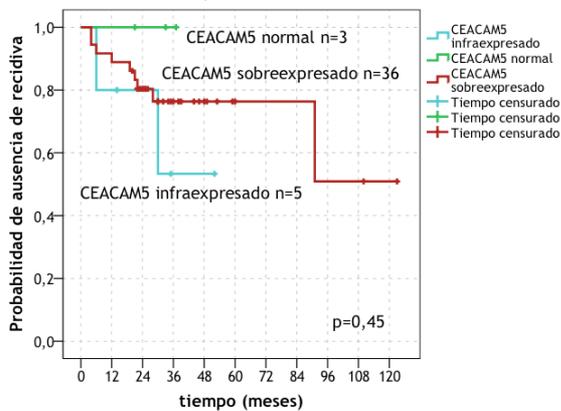
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) según expresión tumoral de CEACAM5. 1: meses.

Adenocarcinoma

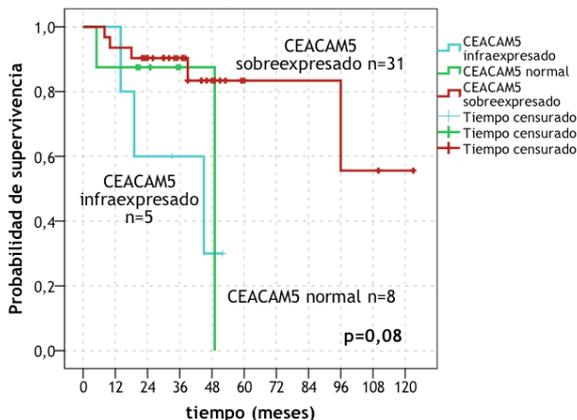
ADENOCARCINOMA, TLE SEGÚN CEACAM5-BA



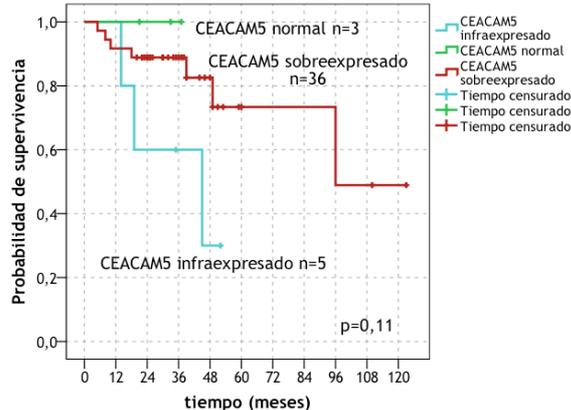
ADENOCARCINOMA, TLE SEGÚN CEACAM5-B2M



ADENOCARCINOMA, OS SEGÚN CEACAM5-BA



ADENOCARCINOMA, OS SEGÚN CEACAM5-B2M



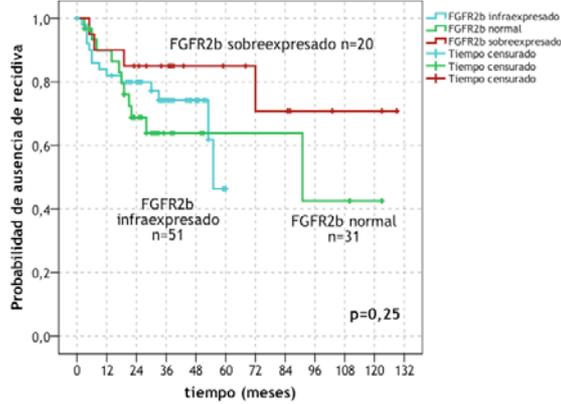
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=44) según expresión tumoral de CEACAM5.
1: meses.

ADENOCARCINOMA										
CEACAM5	TLE					OS				
Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado	36,9	8,4	80%	-	-	35,7	7,2	100%	-	-
Expresión normal	29,7	3,9	88%	-	-	43,5	7,3	88%	0%	0%
Sobreexpresado	93,3	9,9	90%	81%	54%	98,9	9,4	94%	83%	56%
Gen de referencia β2M	TLE					OS				
Infraexpresado	26,9	8,4	80%	-	-	35,7	7,2	100%	-	-
Expresión normal	-	-	100%	-	-	-	-	100%	-	-
Sobreexpresado	89,4	9,8	89%	76%	51%	91,7	10	92%	73%	49%

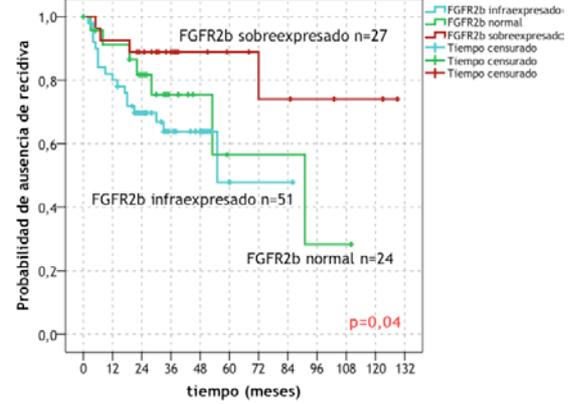
FGFR2b

Serie global

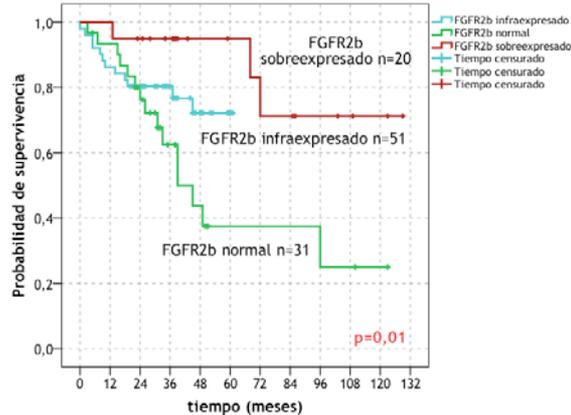
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE FGFR2b-βA



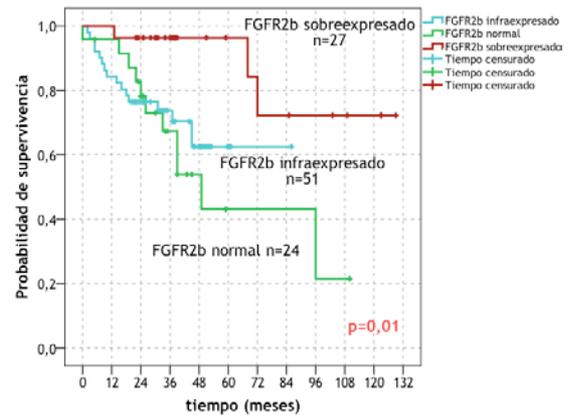
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE FGFR2b-β2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE FGFR2b-βA



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE FGFR2b-β2M

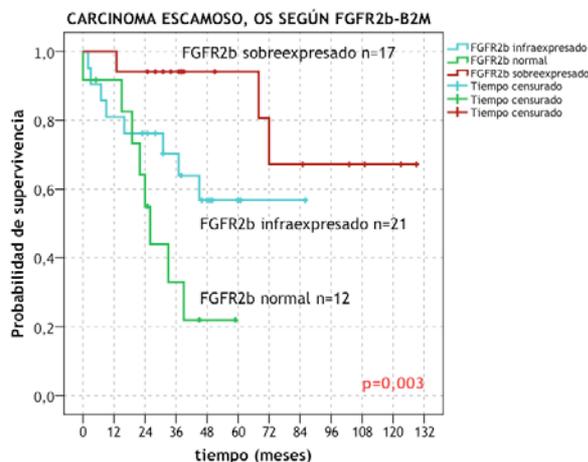
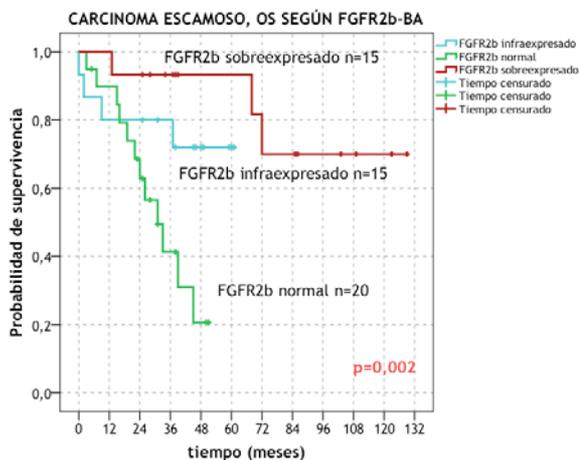
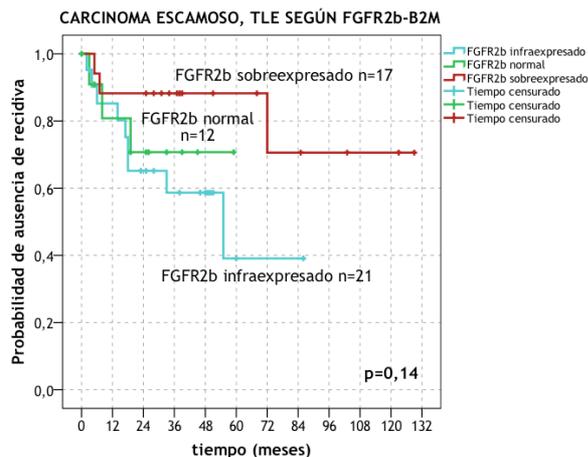
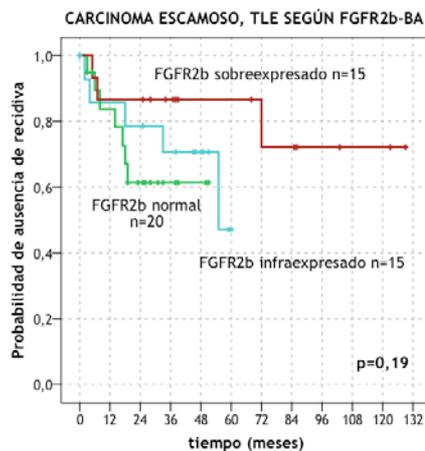


FGFR2b	TLE					OS					
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		46,1	3,1	82%	46%	-	49,2	3	86%	72%	-
Expresión normal		77,6	10,5	90%	64%	43%	61,3	9,7	93%	38%	25%
Sobreexpresado		103,1	11,4	90%	85%	71%	109,2	9,9	100%	95%	71%
Gen de referencia β2M	TLE					OS					
		Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		54,8	6,3	80%	48%	-	61,7	5	84%	63%	-
Expresión normal		71	11,1	91%	57%	-	61,7	9,6	96%	43%	-
Sobreexpresado		107,4	10,2	93%	89%	74%	110,5	9,4	100%	96%	72%

1. Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=102) según expresión tumoral de FGFR2b. 1: meses.

Si comparamos sobreexpresados e infraexpresados (βA n=71, β2M n=78), el mejor pronóstico de los sobreexpresados tendía a la significación estadística para FGFR2b-βA (OS p=0,07) y era significativo para FGFR2b-β2M (TLE p=0,01; OS p=0,02). Por su parte, los pacientes no infraexpresados presentaban mayor tiempo hasta la recidiva que los no infraexpresados (p=0,03).

Carcinoma escamoso

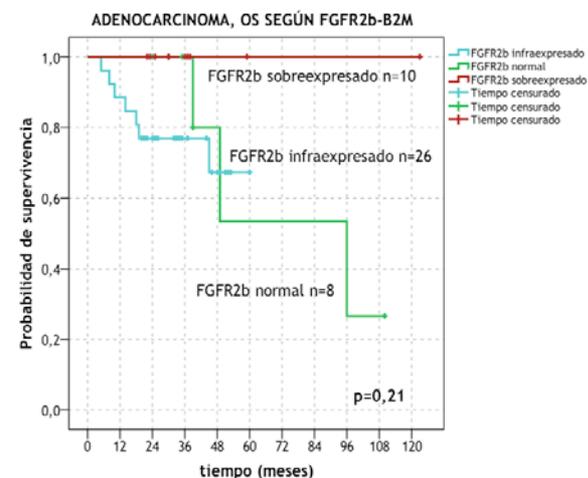
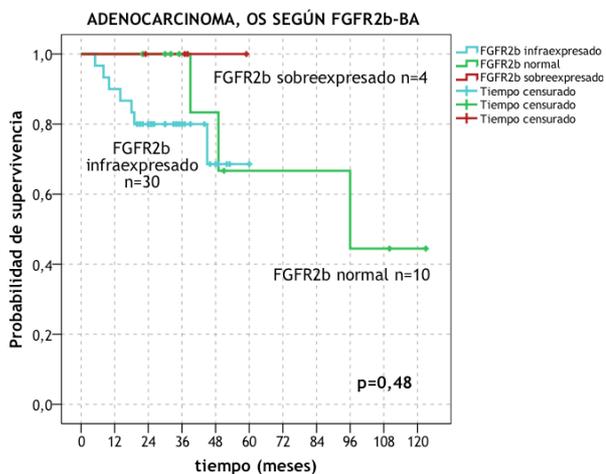
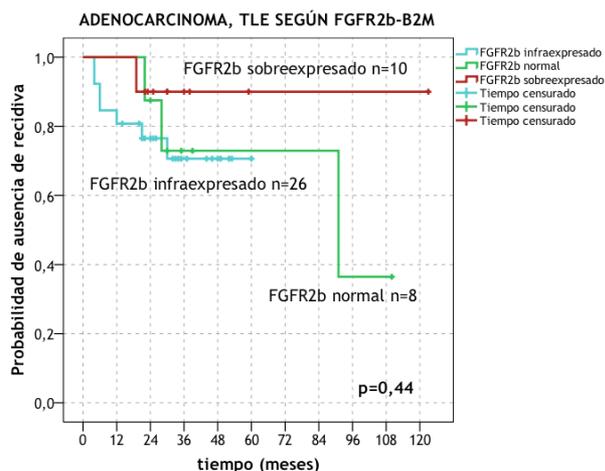
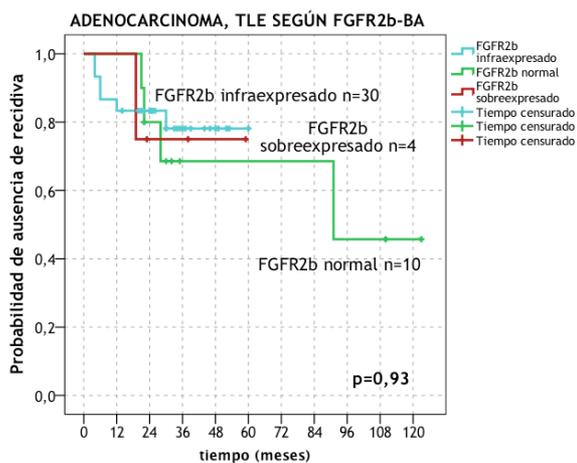


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) según expresión tumoral de FGFR2b. 1: meses.

CARCINOMA ESCAMOSO												
FGFR2b	TLE					OS						
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	
Infraexpresado		45,6	5,7	86%	47%	-	47,6	6	80%	72%	-	
Expresión normal		36,1	4,5	84%	-	-	31,4	3,6	90%	-	-	
Sobreexpresado		104,4	12,5	87%	87%	72%	107,5	10,7	100%	93%	70%	
Gen de referencia β2M	TLE					OS						
	Infraexpresado		50,5	8,5	85%	39%	-	58	7,7	81%	57%	-
	Expresión normal		44,7	7	81%	71%	-	31,1	5,4	92%	22%	-
	Sobreexpresado		104,5	12,5	88%	88%	71%	106,3	11	100%	94%	67%

El análisis entre sobreexpresión y no sobreexpresión, puso de manifiesto mejores TLE y OS ($p < 0,05$) para los pacientes sobreexpresados a nivel tumoral.

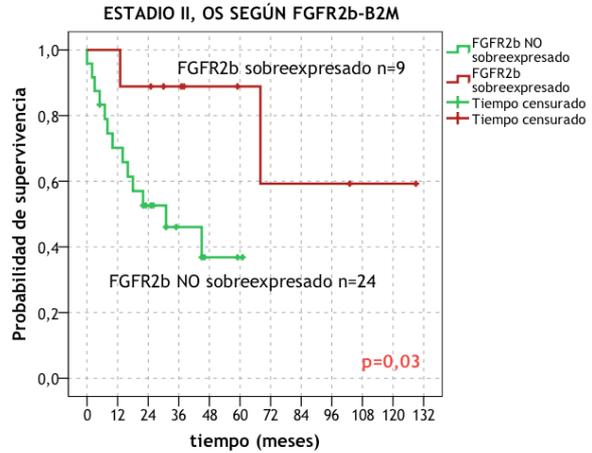
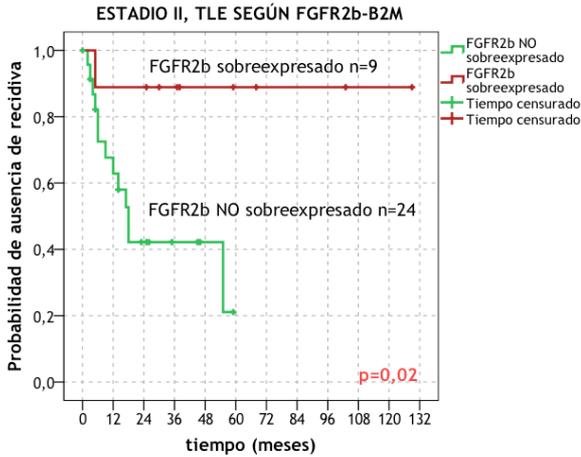
Adenocarcinoma



ADENOCARCINOMA										
FGFR2b	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Gen de referencia βA										
Infraexpresado	49,5	3,8	83%	78%	-	48,8	3,7	90%	69%	-
Expresión normal	84,5	14,6	100%	69%	46%	90,7	14,4	100%	67%	44%
Sobreexpresado	49	8,7	100%	100%	-	-	-	100%	100%	-
Gen de referencia β2M										
Infraexpresado	46,3	4,4	81%	71%	-	47,6	4	89%	67%	-
Expresión normal	80,1	13,3	100%	73%	-	75,8	14,6	100%	53%	-
Sobreexpresado	112,6	9,9	100%	90%	90%	-	-	100%	100%	100%

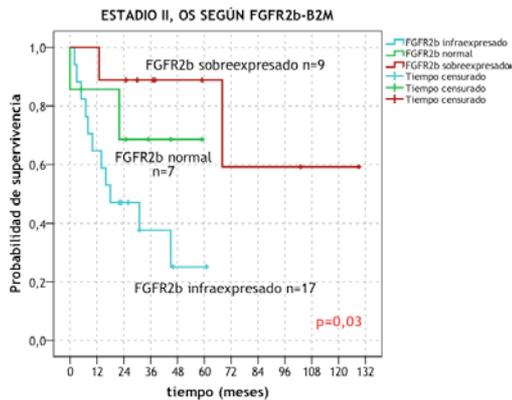
¹ Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=44) según expresión tumoral de FGFR2b. 1: meses.

Estadio II



ESTADIO II											
Expresión	TLE					OS					
	Gen de referencia $\beta 2M$	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
FGFR2b NO sobreexpresado		32,2	5,1	63%	-	-	33,2	5,2	70%	37%	-
FGFR2b sobreexpresado		111,3	16,4	89%	89%	89%	98	17,8	100%	89%	59%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con estadio II (n=33) según expresión tumoral de FGFR2b. 1: meses



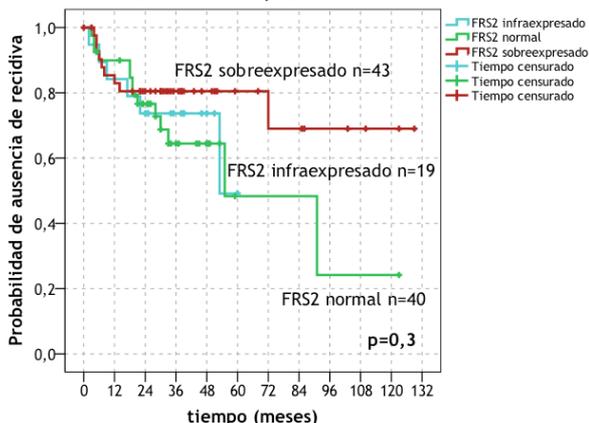
ESTADIO II					
FGFR2b	OS				
GR βA	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a
Infraexpresado	28,8	5,8	65%	38%	25%
Expresión normal	44,2	8,9	86%	69%	69%
Sobreexpresado	98	17,8	100%	89%	59%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con estadio II (n=33) según expresión tumoral de FGFR2b. 1: meses.

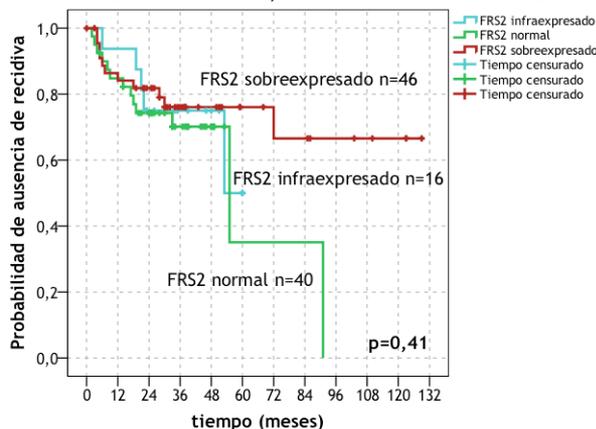
FRS2

Serie global

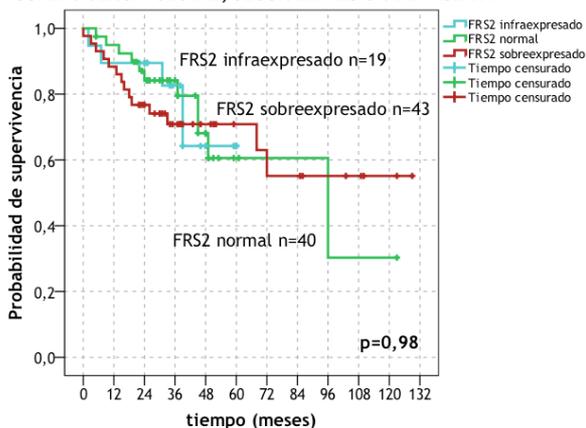
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE FRS2-BA



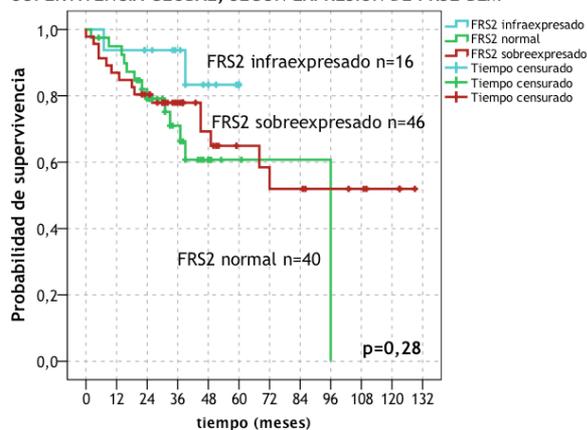
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE FRS2-B2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE FRS2-BA



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE FRS2-B2M



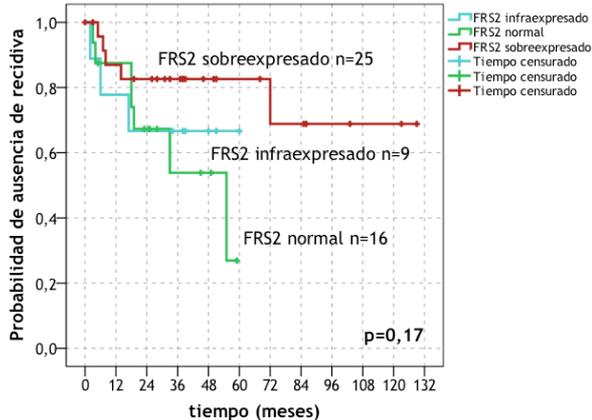
FRS2	TLE					OS				
Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado	45,4	5	84%	49%	-	48,3	4,5	90%	64%	-
Expresión normal	67,2	11,1	90%	48%	24%	79,4	9,9	95%	61%	30%
Sobreexpresado	98,8	9,3	83%	81%	69%	86,4	9,3	88%	71%	55%
Gen de referencia β2M	TLE					OS				
Infraexpresado	47,5	4,7	94%	50%	-	54,5	3,7	94%	83%	-
Expresión normal	55,2	10,4	85%	35%	0%	68	6,9	95%	61%	0%
Sobreexpresado	95,8	8,8	84%	76%	67%	84,5	9	87%	65%	52%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=102) según expresión tumoral de FRS2. 1: meses.

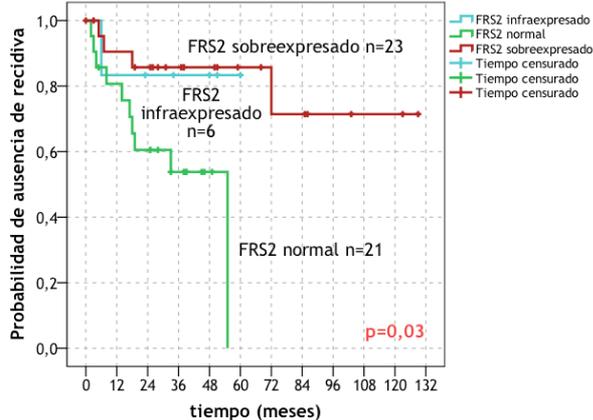
Carcinoma escamoso

Los pacientes con sobreexpresión tumoral de FRS2 presentaban mejor evolución (respecto los no sobreexpresados βA $p=0,07/\beta 2M$ $p=0,03$), mientras que destacaba la mala evolución de los pacientes con expresión normal ($\beta 2M$ $p=0,03$).

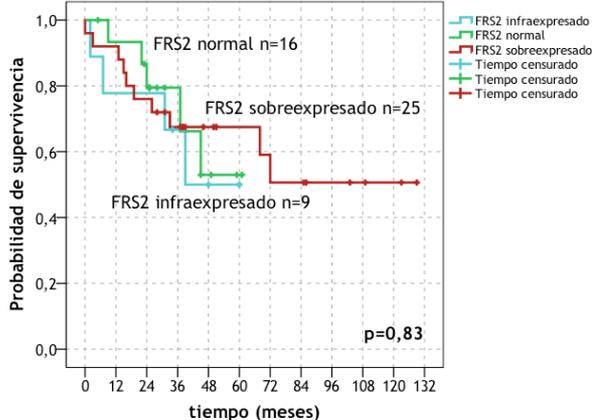
CARCINOMA ESCAMOSO, TLE SEGÚN FRS2-BA



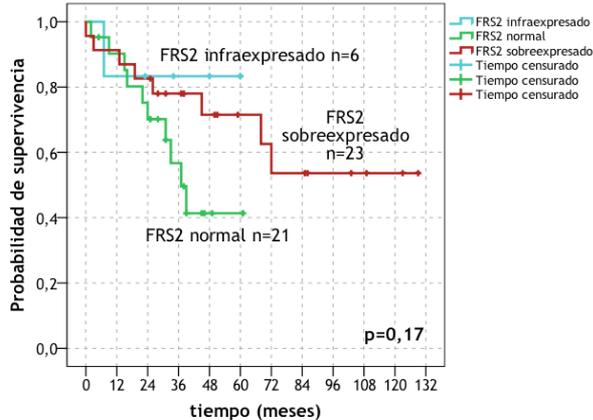
CARCINOMA ESCAMOSO, TLE SEGÚN FRS2-B2M



CARCINOMA ESCAMOSO, OS SEGÚN FRS2-BA



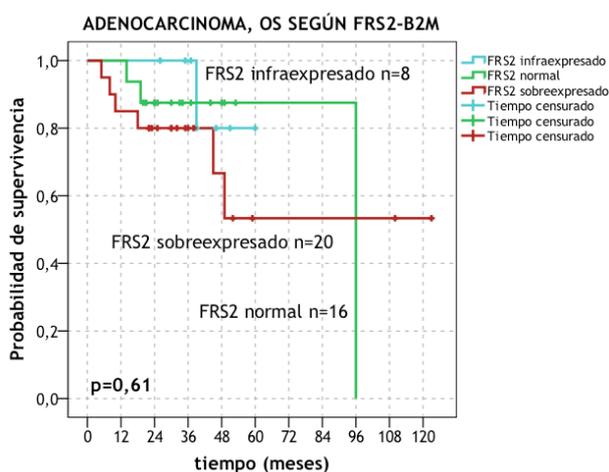
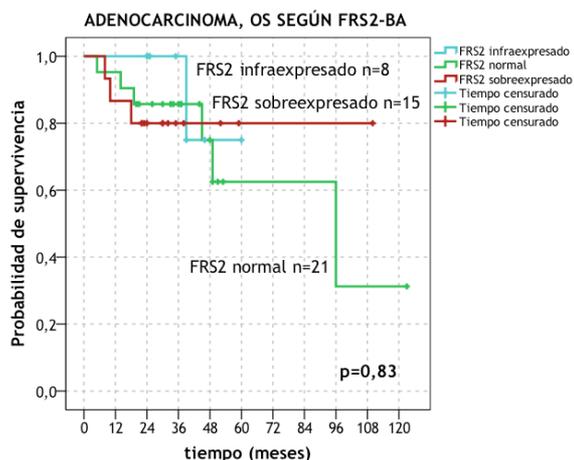
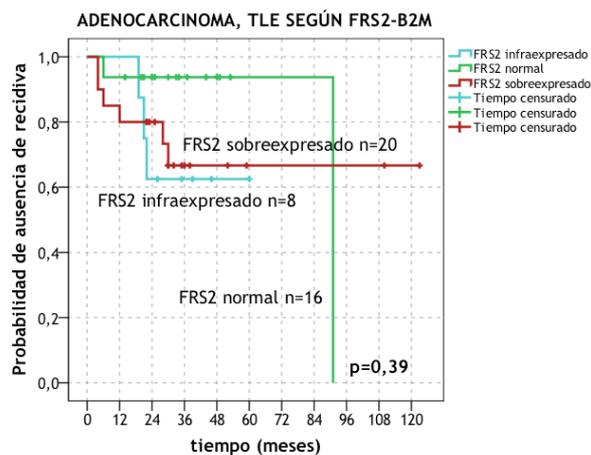
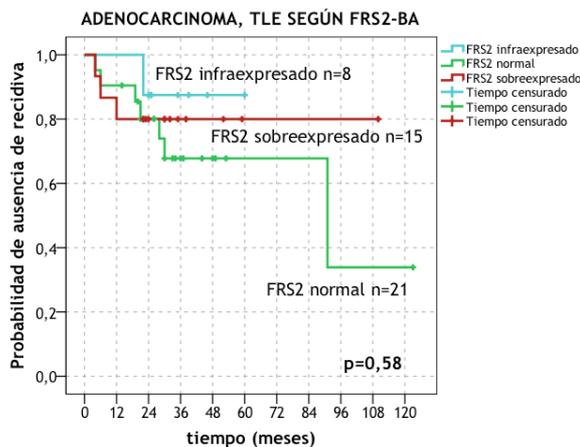
CARCINOMA ESCAMOSO, OS SEGÚN FRS2-B2M



Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) seg.n expresión tumoral de FRS2. 1: meses.

CARCINOMA ESCAMOSO											
FRS2	TLE					OS					
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		42,8	8,2	78%	67%	-	40,9	7,6	79%	50%	-
Expresión normal		39,3	5,7	88%	27%	-	47	5	93%	53%	-
Sobreexpresado		100,2	11,3	87%	83%	69%	82,3	11,2	92%	68%	51%
Gen de referencia $\beta 2M$	TLE					OS					
		51	8,2	83%	83%	-	51,2	8,1	83%	83%	-
Expresión normal		36,1	5,1	81%	0%	0%	39,8	4,7	90%	41%	-
Sobreexpresado		103,9	11,2	91%	86%	71%	87,3	11,4	91%	72%	54%

Adenocarcinoma



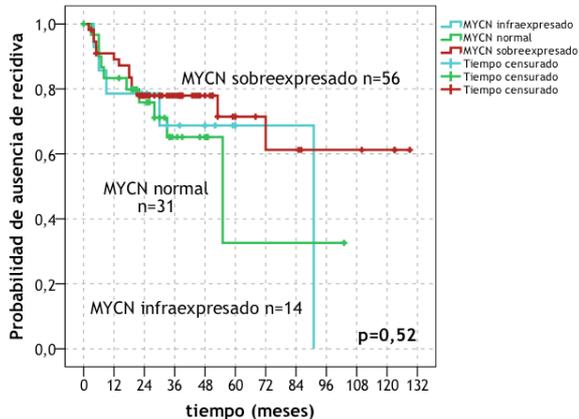
ADENOCARCINOMA										
FRS2	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Gen de referencia βA										
Infraexpresado	55,2	4,4	100%	88%	-	54,7	4,5	100%	75%	-
Expresión normal	78,7	12,3	91%	68%	34%	81,2	12,3	95%	63%	31%
Sobreexpresado	89,5	10,6	80%	80%	-	90,4	10,1	87%	80%	-
Gen de referencia β2M										
Infraexpresado	45,2	6,7	100%	63%	-	55,8	4,8	100%	80%	-
Expresión normal	85,7	7,3	94%	94%	0%	86,1	8	100%	88%	0%
Sobreexpresado	87,2	12,1	80%	67%	67%	80,2	14,1	85%	53%	53%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=44) según expresión tumoral de FRS2. 1: meses.

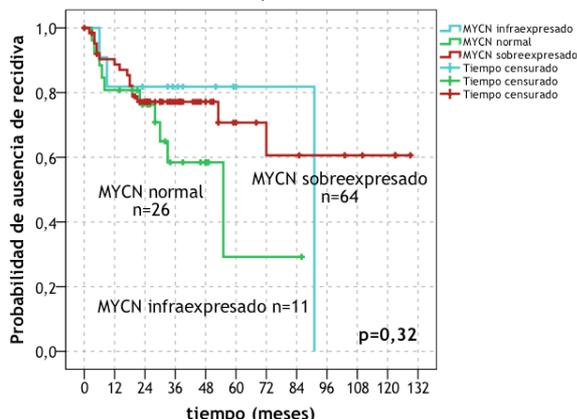
MYCN

Serie global

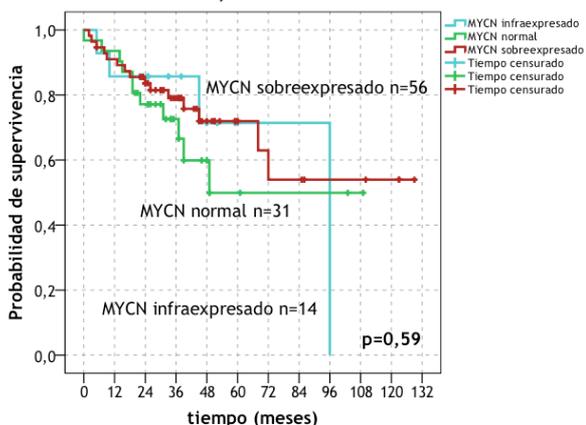
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE MYCN-BA



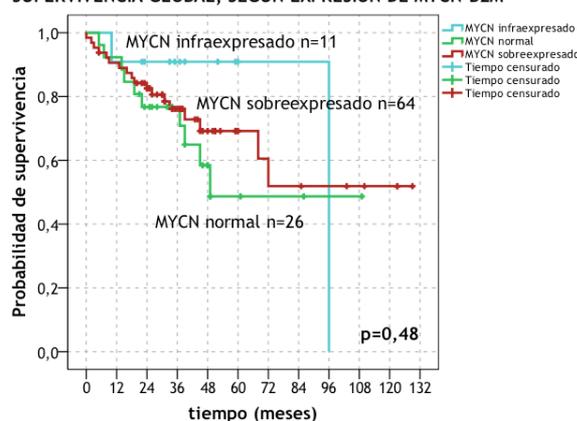
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE MYCN-B2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE MYCN-BA



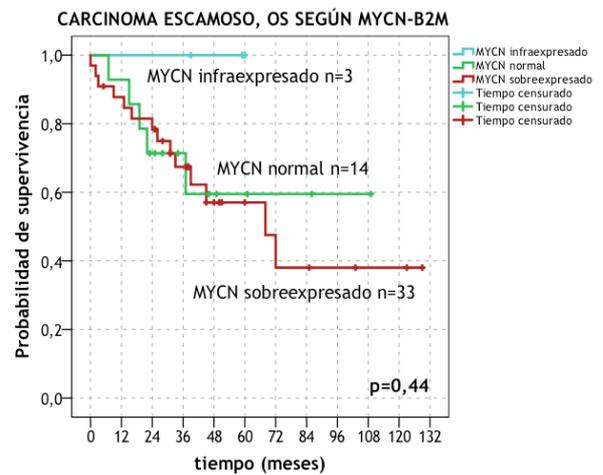
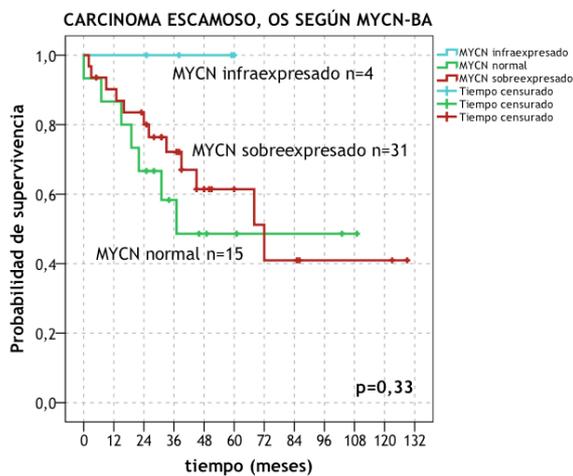
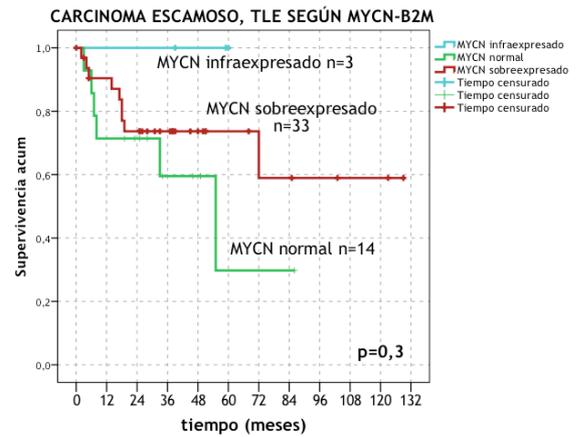
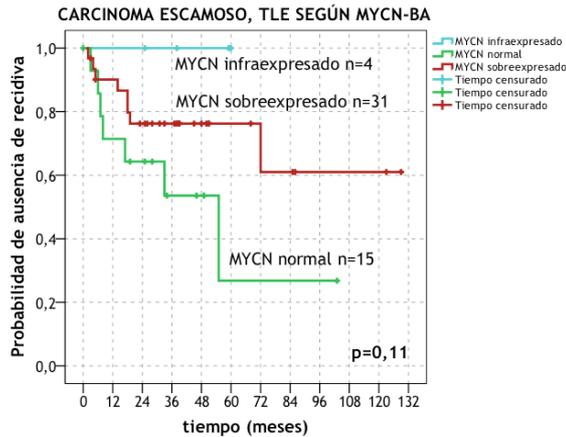
SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE MYCN-B2M



Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=101) según expresión tumoral de MYCN. 1: meses.

MYCN	TLE					OS					
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		66,9	11,3	79%	69%	0%	76,1	11,6	86%	71%	0%
Expresión normal		57,3	12,6	83%	33%	-	68,7	9,5	94%	50%	-
Sobreexpresado		92,4	9	89%	72%	61%	88,4	9	91%	72%	54%
MYCN	TLE					OS					
	Gen de referencia β2M	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		75,8	11,9	82%	82%	0%	88,2	10,5	91%	91%	0%
Expresión normal		48,7	8,6	81%	29%	-	68,4	9,7	92%	49%	-
Sobreexpresado		91,6	8,8	89%	71%	61%	85,8	8,8	91%	69%	52%

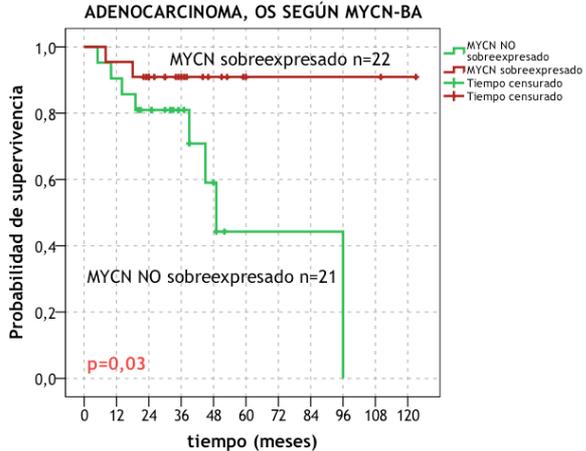
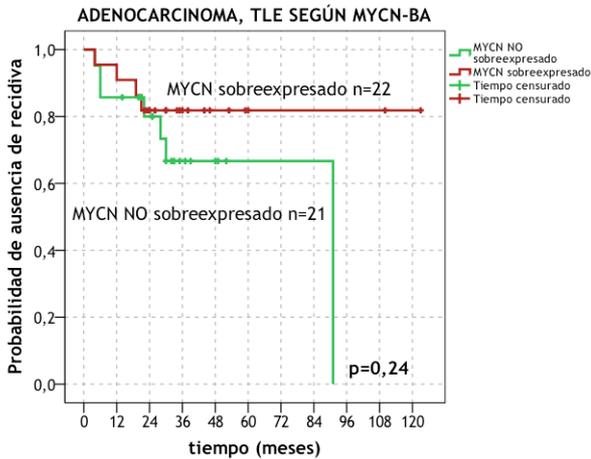
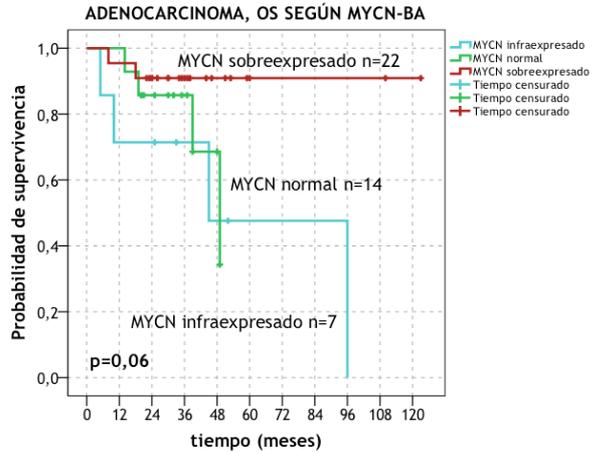
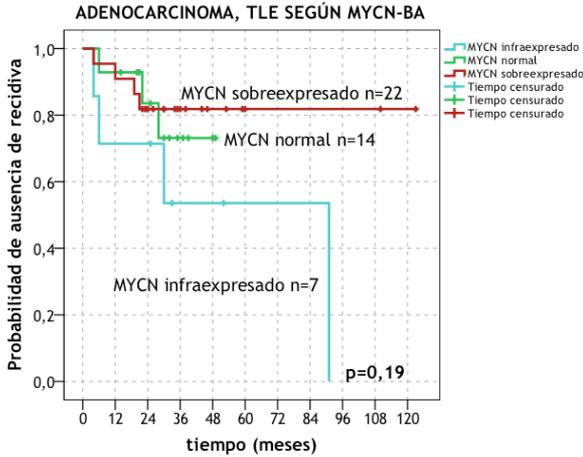
Carcinoma escamoso



CARCINOMA ESCAMOSO										
MYCN	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Gen de referencia βA										
Infraexpresado	-	-	100%	100%	-	-	-	100%	100%	-
Expresión normal	48,8	13	71%	27%	-	63,4	12,4	87%	49%	90%
Sobreexpresado	92,4	11,4	90%	76%	61%	76,3	10,9	90%	61%	41%
Gen de referencia β2M										
Infraexpresado	-	-	100%	100%	-	-	-	100%	100%	-
Expresión normal	47,6	10,4	71%	30%	-	73,8	12,6	93%	60%	-
Sobreexpresado	89,9	11,3	90%	74%	59%	72,1	10,6	88%	57%	38%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) según expresión tumoral de MYCN. 1: meses.

Adenocarcinoma



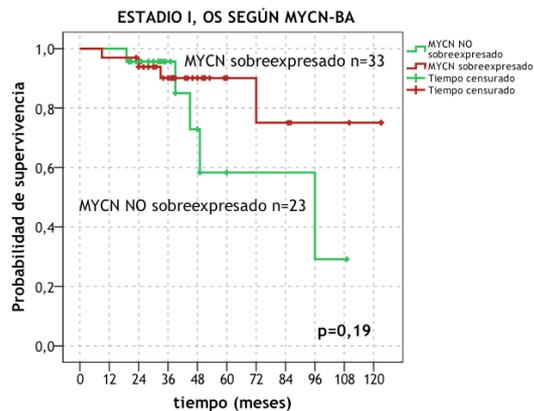
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=43) según expresión tumoral de MYCN. 1: meses.

MYCN	ADENOCARCINOMA										
	Gen de referencia β A	TLE					OS				
		Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado	55,5	17,7	71%	54%	0%	58,6	18,2	71%	48%	0%	
Expresión normal	41,2	3,9	93%	-	-	42,6	3,7	100%	-	-	
Sobreexpresado	103,2	9	91%	82%	82%	113	6,7	96%	91%	91%	
No sobreexpresado	66,5	8,9	86%	67%	0%	61,3	10,4	91%	44%	0%	
Sobreexpresado	103,2	9	91%	82%	82%	113	6,7	96%	91%	91%	

Los pacientes con adenocarcinoma presentaban un comportamiento evolutivo diferente a los carcinomas escamosos. Los pacientes con sobreexpresión presentan buena evolución, mientras que los infraexpresados presentan mala evolución; los pacientes la comparación entre ellos tiende a la significación

estadística para el TLE en MYCN-βA ($p=0,07$) y significativa para la OS ($p=0,02$). Esto se mantiene en el análisis entre sobreexpresados y no sobreexpresados (TLE βA y β2M $p=0,24$; OS βA $p=0,03$, β2M $p=0,04$).

Estadio I



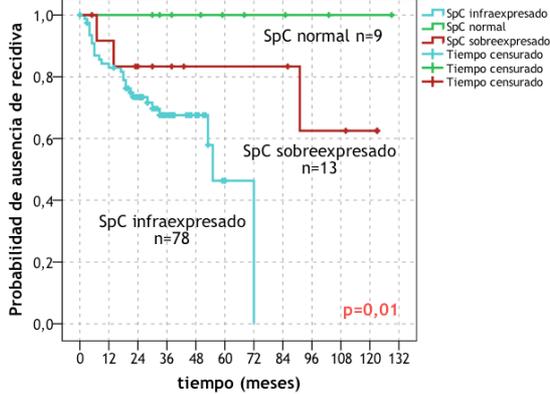
ESTADIO I						
Expresión	OS					
	GR βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
No sobreexpresado		77,3	10,6	100%	58%	-
Sobreexpresado		105,4	8,6	97%	90%	75%

Supervivencia global de los pacientes estadio I ($n=56$) según expresión tumoral de MYCN. 1: meses.

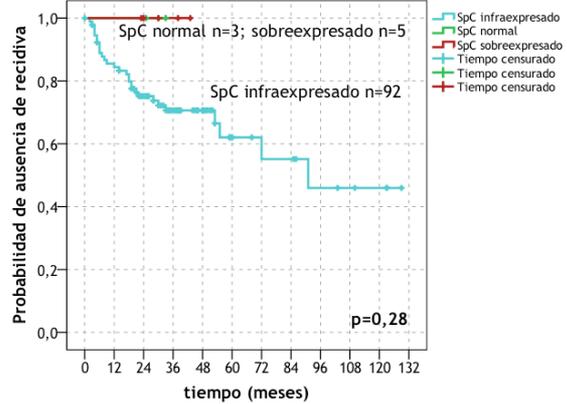
SFTPC

Serie global

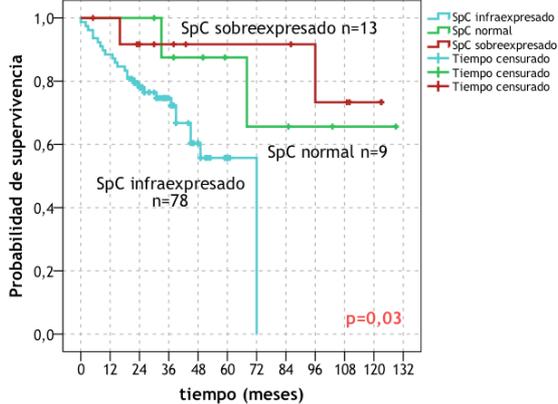
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE SpC-BA



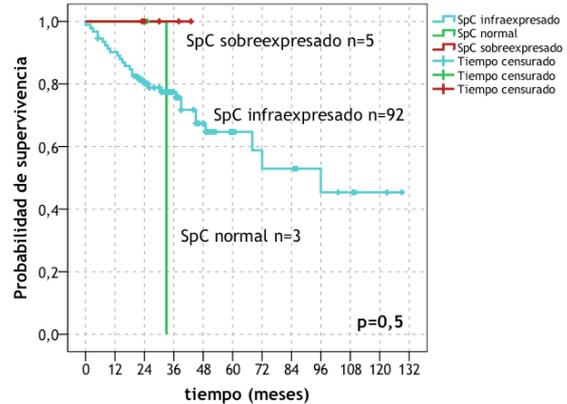
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE SpC-B2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE SpC-BA



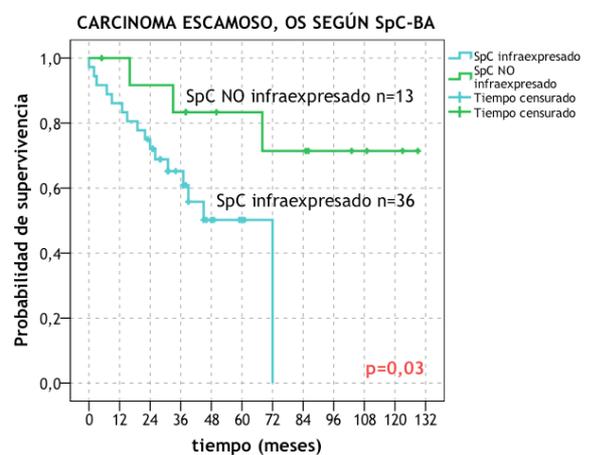
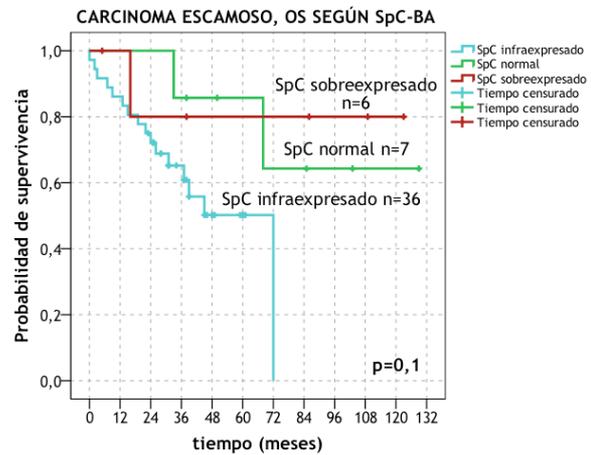
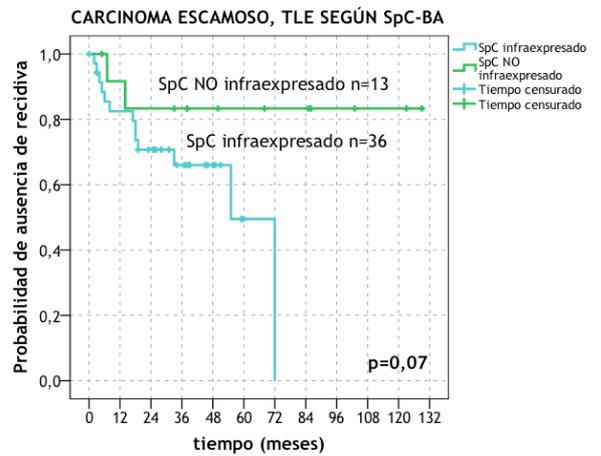
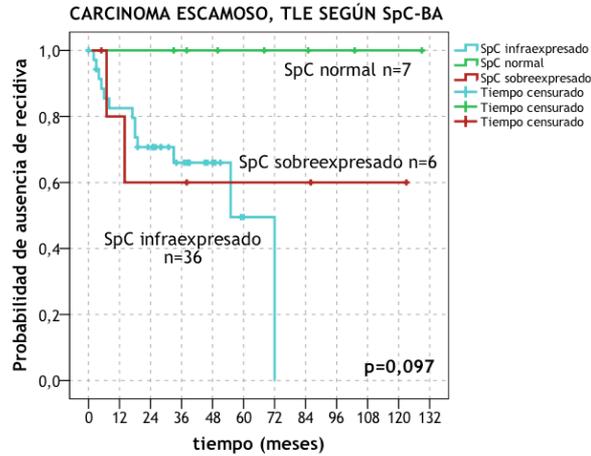
SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE SpC-B2M



Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=100) según expresión tumoral de SFTPC. 1: meses.

SFTPC	TLE					OS				
Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresada	-	-	83%	46%	0%	51,8	3,3	89%	56%	0%
Expresión normal	49,4	2,8	100%	100%	100%	103,7	14,9	100%	88%	66%
Sobreexpresada	97,6	12,6	92%	83%	63%	109,1	9,2	100%	92%	73%
Gen de referencia $\beta 2M$	TLE					OS				
Infraexpresada	81,2	7,5	84%	62%	46%	82,6	7	90%	65%	45%
Expresión normal	-	-	100%	-	-	-	-	100%	0%	0%
Sobreexpresada	-	-	100%	-	-	-	-	100%	-	-

Carcinoma escamoso



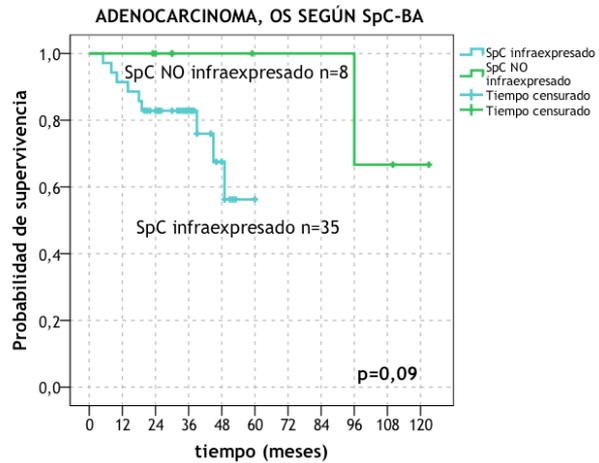
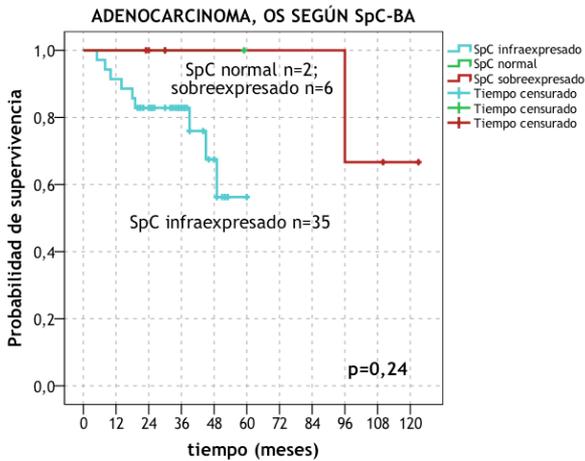
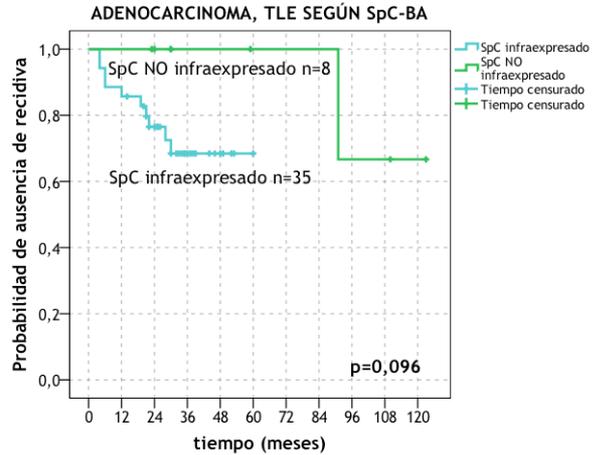
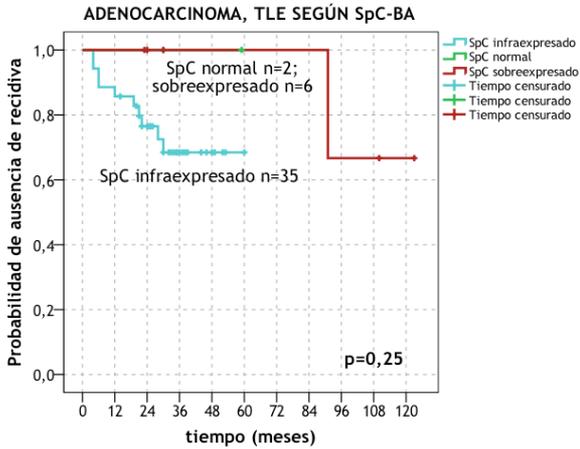
CARCINOMA ESCAMOSO										
SFTPC	TLE					OS				
Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresada	49,2	5,4	83%	50%	0%	47,4	5	86%	50%	0%
Expresión normal	-	-	100%	100%	100%	102,2	15,6	100%	86%	64%
Sobreexpresada	109,2	12,7	80%	60%	60%	101,6	19,1	100%	80%	80%
Infraexpresada	49,2	5,4	83%	50%	0%	47,2	5	86%	50%	0%
No infraexpresada	109,2	12,7	92%	83%	83%	104,3	12,3	100%	83%	71%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=49) según expresión tumoral de SFTPC. 1: meses.

Los pacientes con infraexpresión de SFTPC presentan peor tiempo libre de enfermedad y peor supervivencia. Esto se repite cuando comparamos entre infraexpresados y no infraexpresados (TLE βA p=0,07; β2M p=0,31; OS βA p=0,03; p=0,99).

Adenocarcinoma

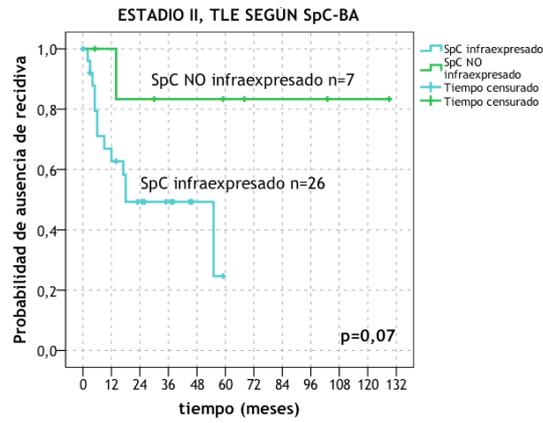
Los pacientes infraexpresados presentaban franco peor TLE y OS que los no infraexpresados (βA $p=0,096$; $p=0,09$; $\beta 2M$ $p=0,29$; $p=0,42$).



Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=43) según expresión tumoral de SFTPC. 1: meses.

SFTPC	ADENOCARCINOMA									
	TLE					OS				
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a
Infraexpresada	-	-	86%	69%	-	-	-	91%	56%	-
Expresión normal	-	-	100%	100%	-	-	-	100%	100%	-
Sobreexpresada	-	-	100%	100%	67%	-	-	100%	100%	67%
Infraexpresada	46,2	3,7	86%	69%	-	47,9	3,4	91%	56%	-
No infraexpresada	112,3	8,7	100%	100%	67%	114	7,3	100%	100%	67%

Estadio II



ESTADIO II					
SFTPC	TLE				
GR β A	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresada	32,6	5,1	63%	25%	-
No infraexpresada	109,8	17,5	100%	83%	83%

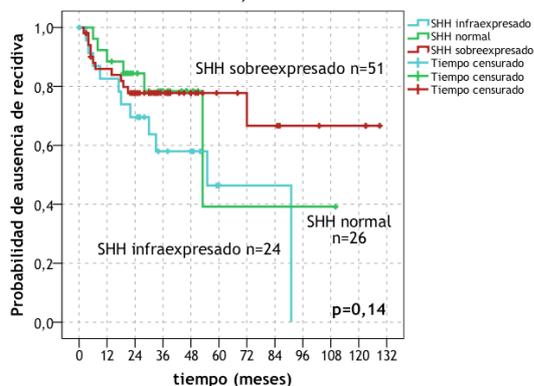
Tiempo libre de enfermedad de los pacientes estadio II (n=33) según expresión tumoral de SFTPC. 1: meses.

SHH

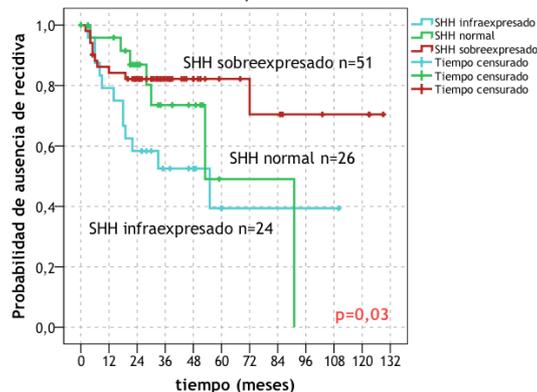
Serie global

Al comparar los sobreexpresados con los infraexpresados, las diferencias en el TLE a favor de los sobreexpresados tienden a la significación para β actina ($p=0,06$) y son significativas para β 2microglobulina ($p=0,01$). La comparativa entre infraexpresados versus no infraexpresados, evidenció peor TLE para los infraexpresados de forma significativa (β A $p=0,048$; β 2M $p=0,01$), aunque las supervivencias fueron similares ($p=0,39$; $p=0,34$).

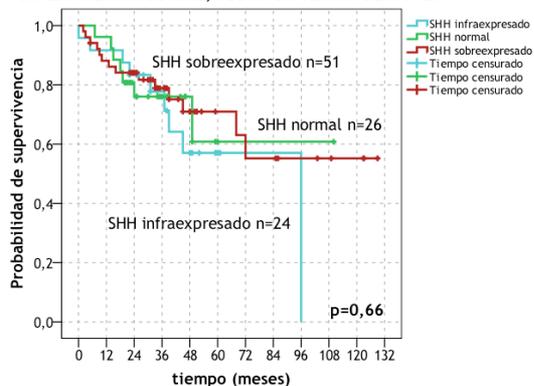
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHH-BA



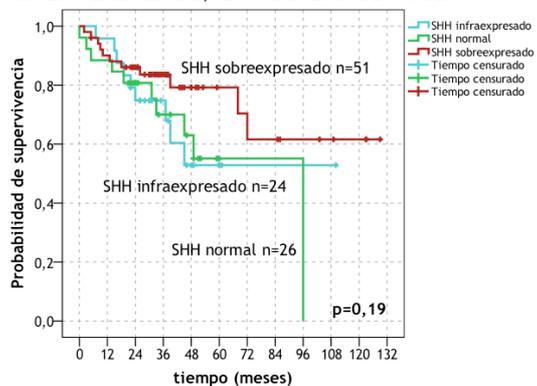
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHH-B2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHH-BA



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE SHH-B2M

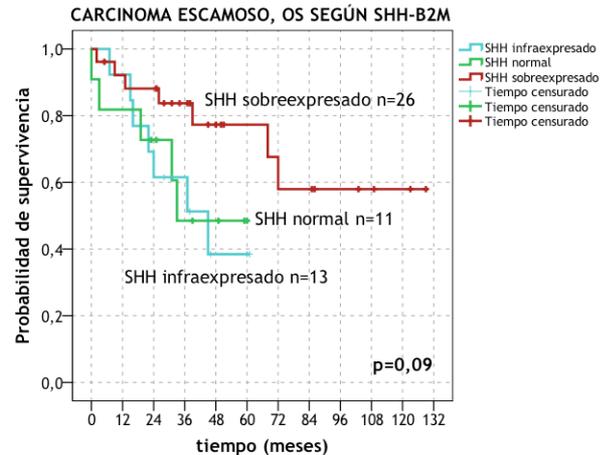
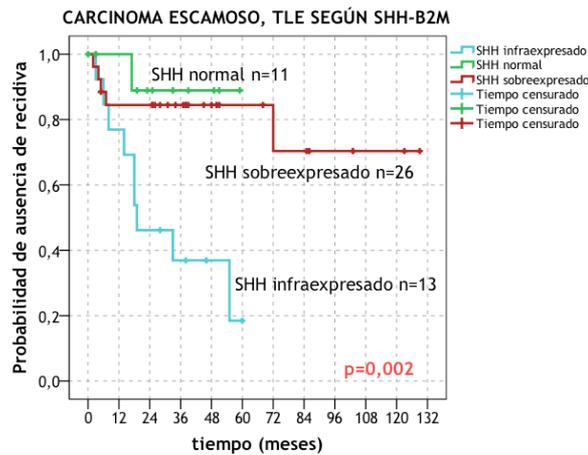


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=101) según expresión tumoral de SHH. 1: meses.

SHH	TLE					OS					
	Gen de referencia β A	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		55,7	8,6	83%	46%	0%	57,6	10,6	79%	39%	-
Expresión normal		67,4	16,8	89%	39%	-	63,3	10,4	96%	49%	0%
Sobreexpresado		96,1	8,8	86%	78%	67%	100,6	8,7	84%	82%	70%
SHH	TLE					OS					
	Gen de referencia β 2M	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
	Infraexpresado	6	6,8	8,6	92%	57%	0%	71,4	9,9	96%	53%
Expresión normal		78,3	10,8	96%	61%	-	64,9	8,5	88%	55%	0%
Sobreexpresado		88,4	9	88%	71%	55%	95,4	9	90%	79%	62%

Carcinoma escamoso

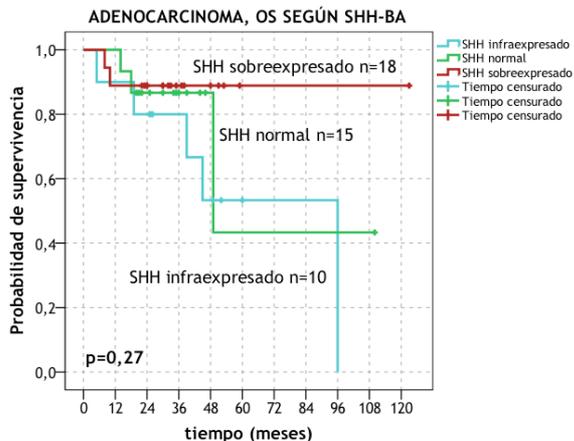
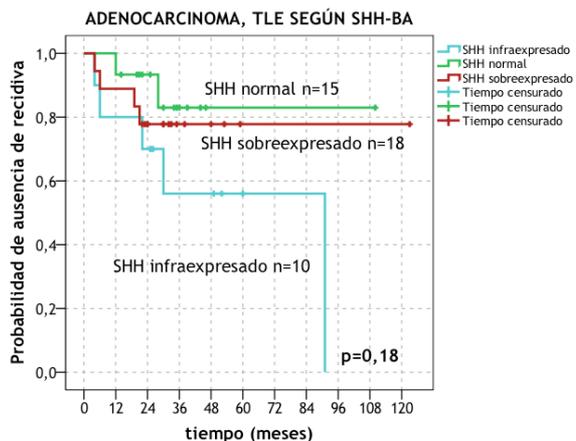
La sobreexpresión de SHH se asoció a mayor TLE y la infraexpresión, a menor TLE (βA $p=0,23$; $\beta 2M$ $p=0,002$). En cuanto a la supervivencia, los resultados eran similares para los tres estratos de expresión para SHH- βA , mientras que la sobreexpresión de SHH- $\beta 2M$ estaba asociada a mejor evolución ($p=0,09$). Entre los sobreexpresados y los no sobreexpresados había diferencias en el TLE y OS, significativas para $\beta 2M$ ($p=0,04$, $p=0,03$).



CARCINOMA ESCAMOSO											
SHH	TLE					OS					
	Gen de referencia $\beta 2M$	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		30,9	6,1	77%	19%	-	39,5	5,7	92%	39%	-
Expresión normal		54,3	4,4	100%	89%	-	38,8	7,1	82%	49%	-
Sobreexpresado		101,6	11	84%	84%	70%	92,9	11	92%	77%	58%
No sobreexpresado		40,3	4,8	87%	38%	-	42,8	5,1	90%	55%	-
Sobreexpresado		101,6	11	84%	84%	70%	82,6	10,5	90%	65%	49%

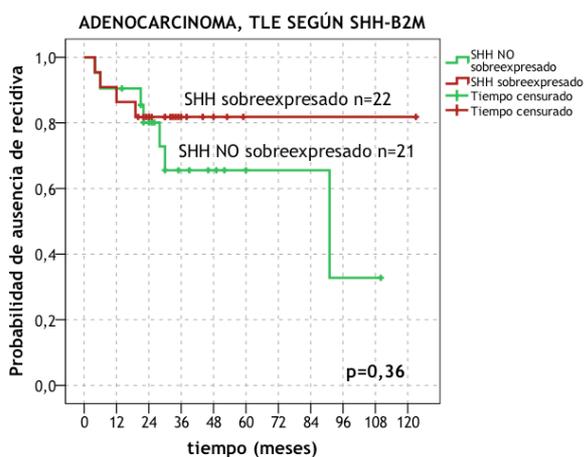
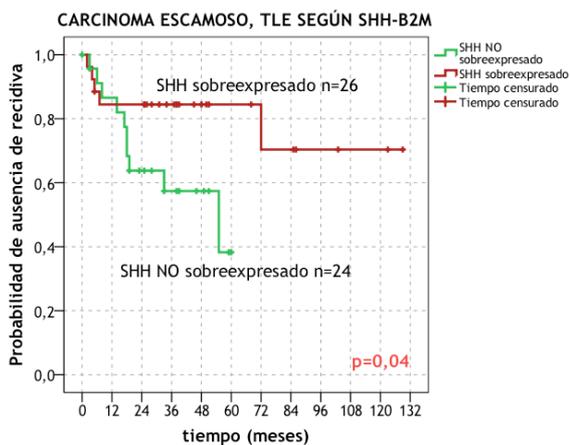
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) según expresión tumoral de SHH. 1: meses.

Adenocarcinoma



Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=43) según expresión tumoral de SHH. 1: meses.

ADENOCARCINOMA											
SHH	TLE					OS					
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		58,4	14	80%	56%	0%	64,8	13,2	90%	53%	0%
Expresión normal		95	9,8	93%	83%	-	71	19	100%	43%	-
Sobreexpresado		98,4	10,9	89%	78%	78%	110,3	8,4	89%	89%	89%
No sobreexpresado		72,8	10,4	91%	66%	-	74,7	9,7	95%	59%	-
Sobreexpresado		102,5	9,3	86%	82%	82%	107,9	8,1	91%	86%	86%

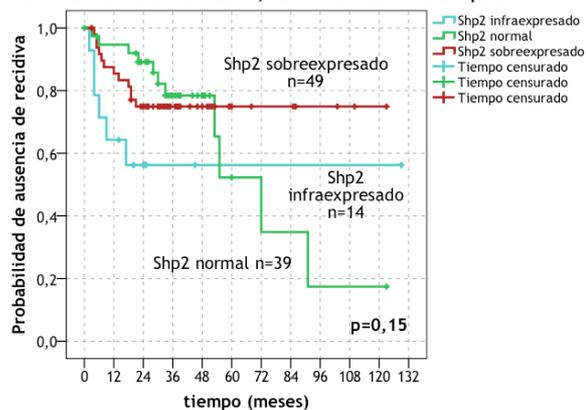


Tiempo libre de enfermedad de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) y adenocarcinoma (n=43) comparando sobreexpresados versus no sobreexpresados. 1: meses.

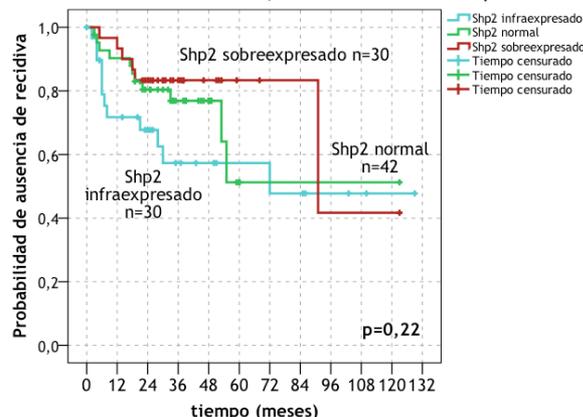
SHP2

Serie global

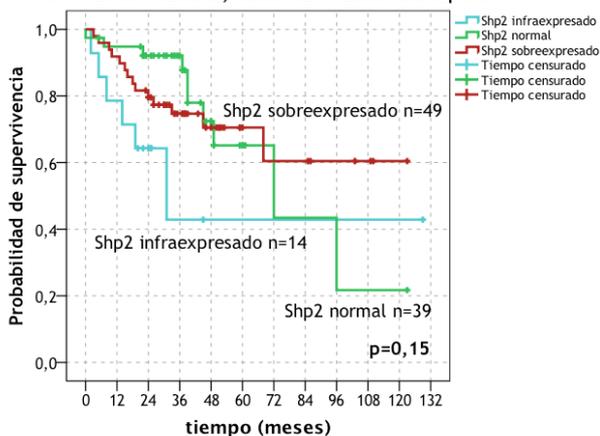
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE Shp2-BA



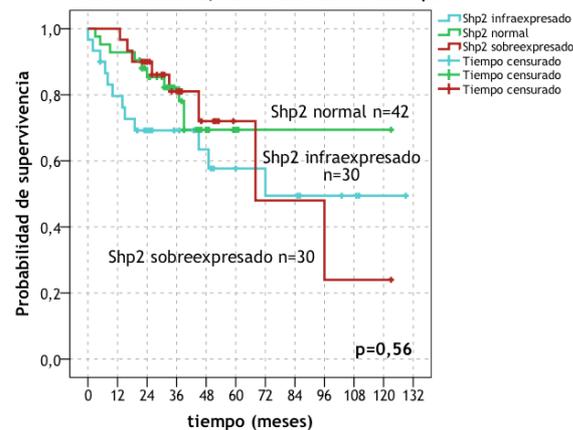
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE Shp2-B2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE Shp2-BA



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE Shp2-B2M

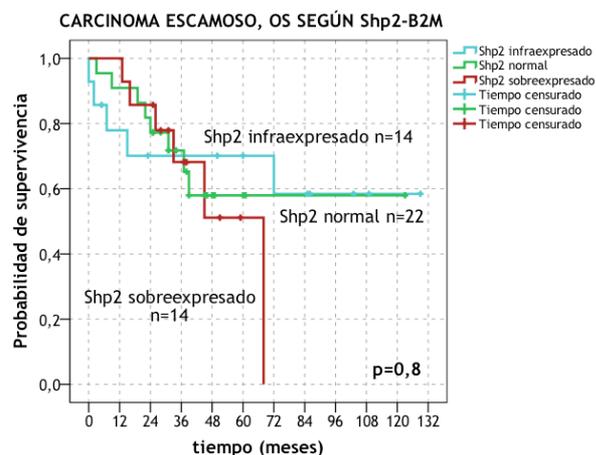
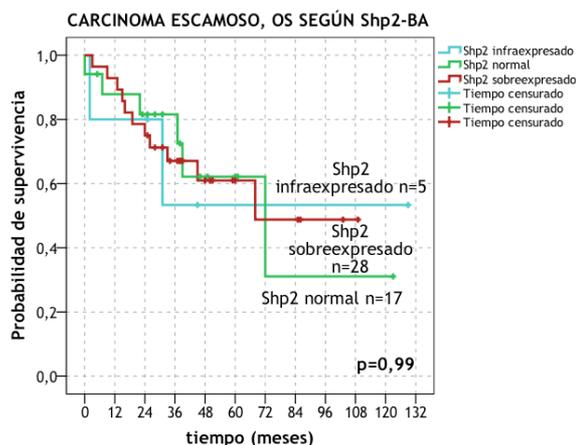
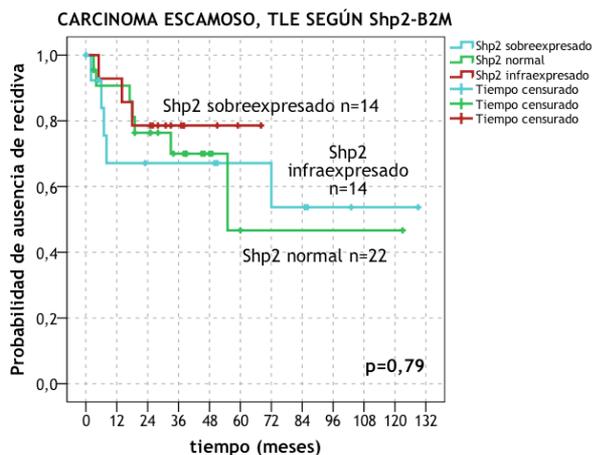
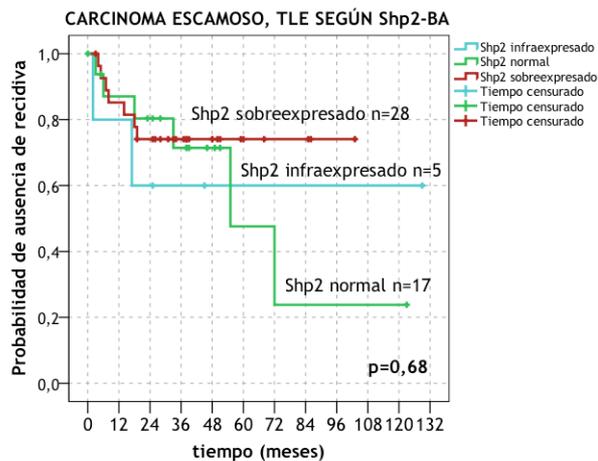


Expresión	TLE					OS						
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	
Infraexpresado		75,7	16,4	64%	56%	56%	65,4	20,4	79%	43%	43%	
Expresión normal		68,6	9,9	95%	52%	17%	75,5	10,1	95%	65%	22%	
Sobreexpresado		95,1	7	85%	75%	75%	87,2	8,4	92%	71%	60%	
Gen de referencia β2M	TLE					OS						
	Infraexpresado		73,9	11,8	72%	57%	48%	77,9	11	80%	58%	49%
	Expresión normal		80,4	11,7	90%	51%	51%	93,3	8,1	93%	69%	69%
	Sobreexpresado		91,4	11,4	93%	83%	42%	77,2	11,5	100%	72%	24%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=102) según expresión tumoral de SHP2. 1: meses.

Al comparar infraexpresados y sobreexpresados, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en el TLE (β2M p=0,08) ni en la supervivencia.

Carcinoma escamoso

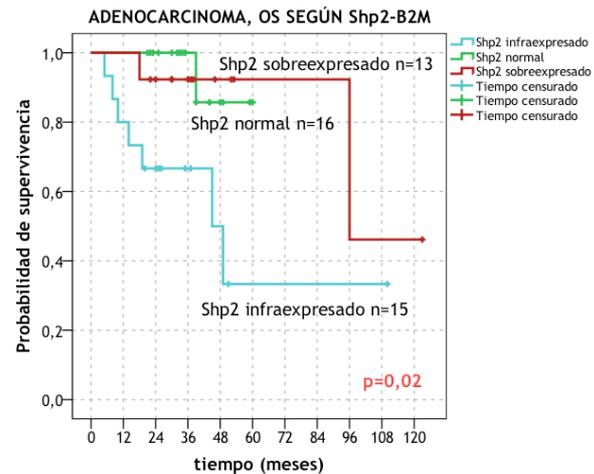
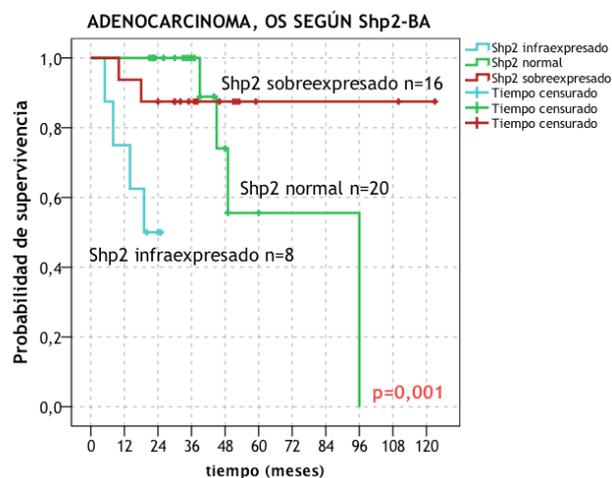
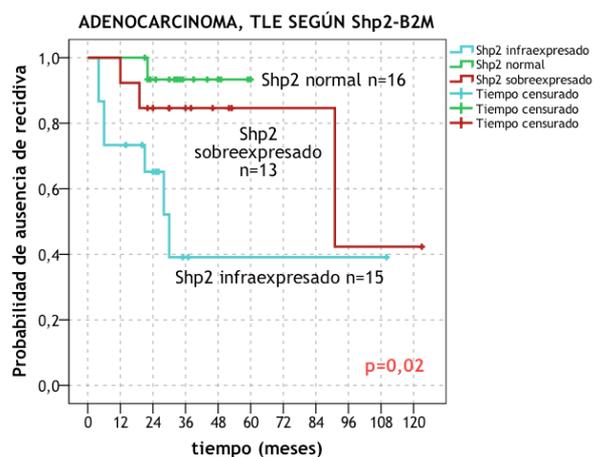
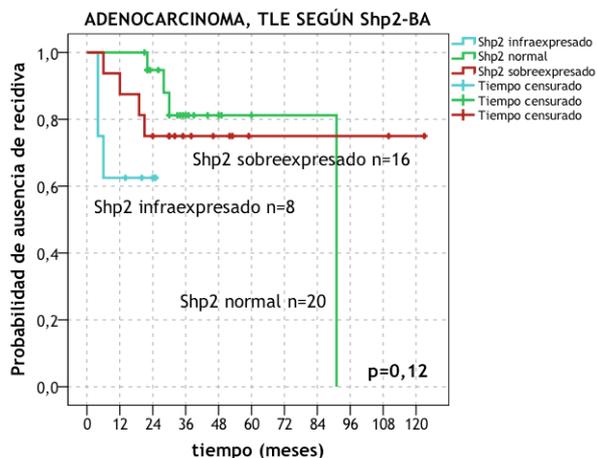


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) según expresión tumoral de SHP2. 1: meses.

CARCINOMA ESCAMOSO										
SHP2	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Gen de referencia βA										
Infraexpresado	81,2	26,3	80%	60%	60%	77,5	27,2	80%	53%	53%
Expresión normal	64,3	14,5	87%	48%	24%	69,8	15,1	88%	62%	31%
Sobreexpresado	79,1	7,8	85%	74%	74%	70,1	9	93%	61%	49%
Gen de referencia β2M										
Infraexpresado	80,9	16,6	67%	54%	54%	85,7	15,5	78%	70%	58%
Expresión normal	75,2	15,6	91%	47%	47%	81,8	11,5	91%	58%	58%
Sobreexpresado	56,1	6,1	93%	79%	-	49,7	6,9	100%	51%	0%

Adenocarcinoma

Cuando comparábamos infraexpresados vs no infraexpresados, el peor pronóstico de los infraexpresados era significativo (TLE βA $p=0,04$; $\beta 2M$ $p=0,007$, OS $p<0,05$).



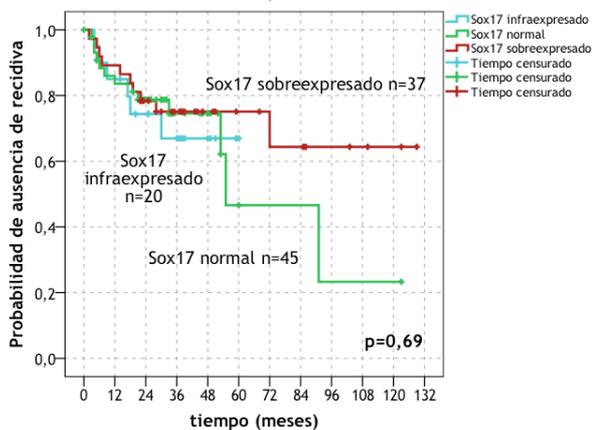
ADENOCARCINOMA												
SHP2	TLE					OS						
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	
Infraexpresado		17,4	3,5	63%	-	-	18,2	2,7	75%	-	-	
Expresión normal		79	7,3	100%	81%	0%	73,4	11,6	100%	56%	0%	
Sobreexpresado		95,9	11,8	88%	75%	75%	109,4	9	94%	88%	88%	
Gen de referencia $\beta 2M$	TLE					OS						
	Infraexpresado		53,6	14,5	73%	39%	-	56,1	13,3	80%	33%	-
	Expresión normal		57,5	2,4	100%	93%	-	57	2,8	100%	86%	-
	Sobreexpresado		92,9	13,2	92%	85%	42%	102,5	11,1	100%	92%	46%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=44) según expresión tumoral de SHH. 1: meses.

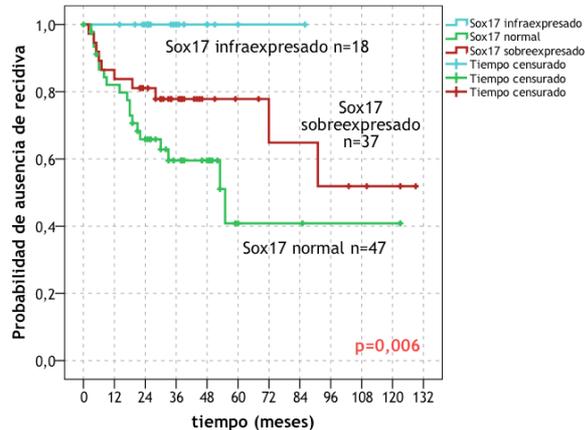
SOX17

Serie global

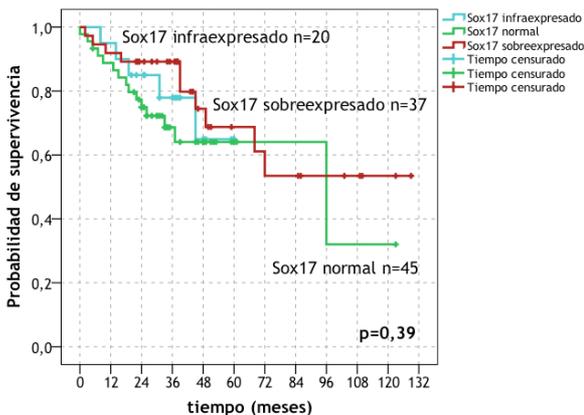
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE Sox17-BA



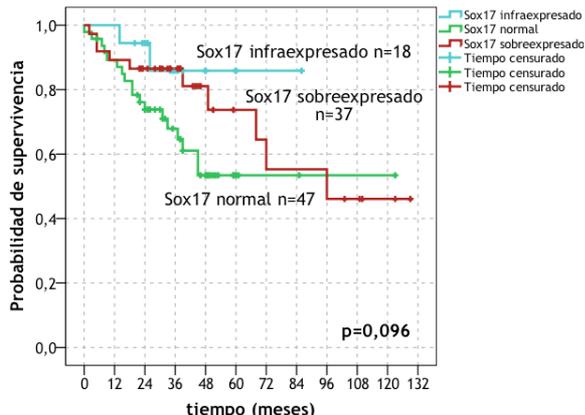
TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN EXPRESIÓN DE Sox17-B2M



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE Sox17-BA



SUPERVIVENCIA GLOBAL, SEGÚN EXPRESIÓN DE Sox17-B2M



Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes (n=102) según expresión tumoral de SOX17. 1: meses.

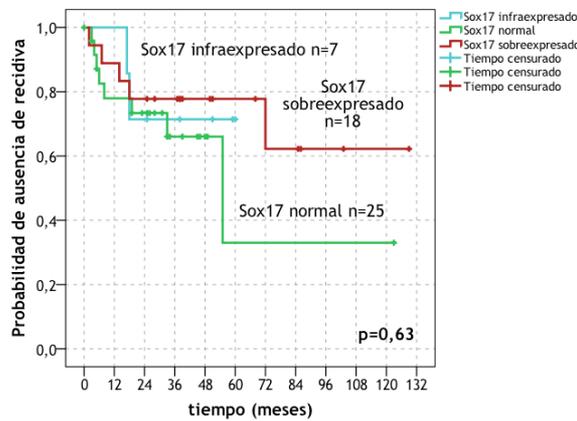
SOX17	TLE					OS					
	Gen de referencia β A	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Infraexpresado		45,2	5	85%	67%	-	49	4,2	95%	65%	-
Expresión normal		68,3	11,2	84%	47%	23%	76,8	9,5	89%	64%	32%
Sobreexpresado		94,2	9,6	89%	75%	64%	89,4	9,8	92%	69%	54%
Gen de referencia β 2M	TLE					OS					
Infraexpresado		-	-	100%	100%	-	76,8	6,1	100%	86%	-
Expresión normal		66,3	10,1	82%	41%	41%	77	8,3	89%	53%	53%
Sobreexpresado		90,5	10,2	84%	78%	52%	88	10,1	89%	74%	46%

La evolución de los pacientes infraexpresados era diferente según el gen de referencia utilizado.

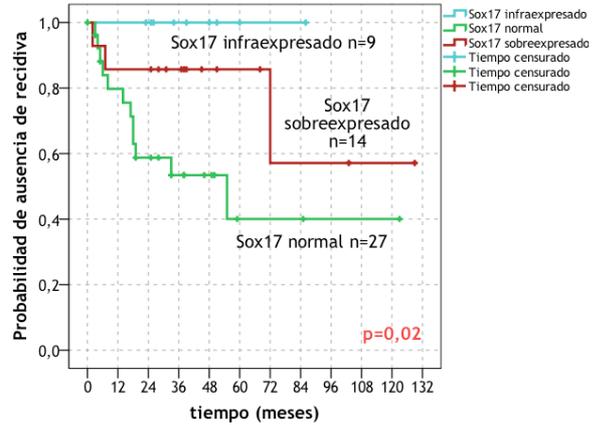
Carcinoma escamoso

Esta diferente evolución de los pacientes infraexpresados se mantenía para los carcinomas escamosos y los adenocarcinomas.

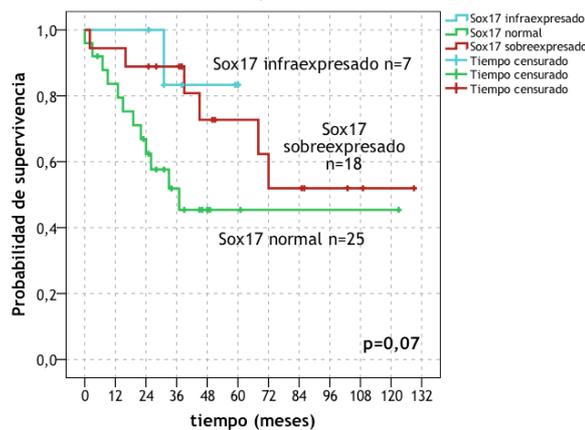
CARCINOMA ESCAMOSO, TLE SEGÚN Sox17-BA



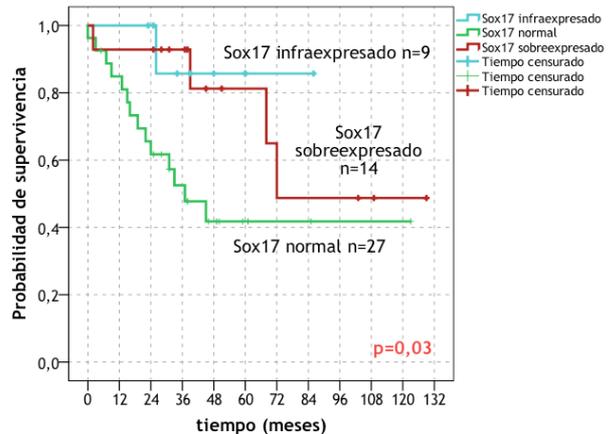
CARCINOMA ESCAMOSO, TLE SEGÚN Sox17-B2M



CARCINOMA ESCAMOSO, OS SEGÚN Sox17-BA



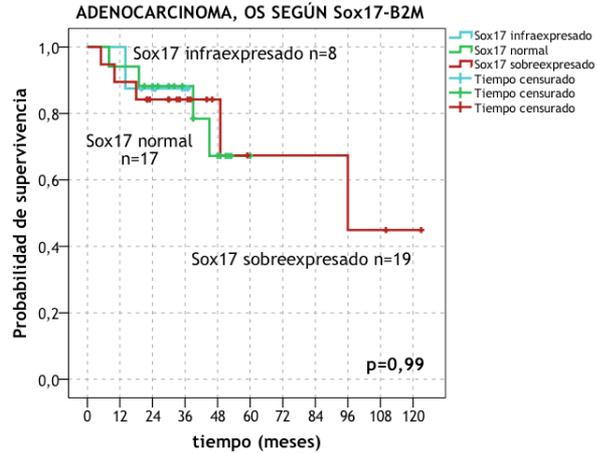
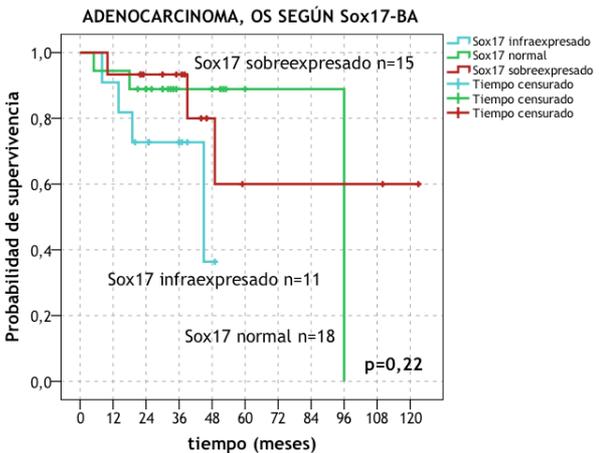
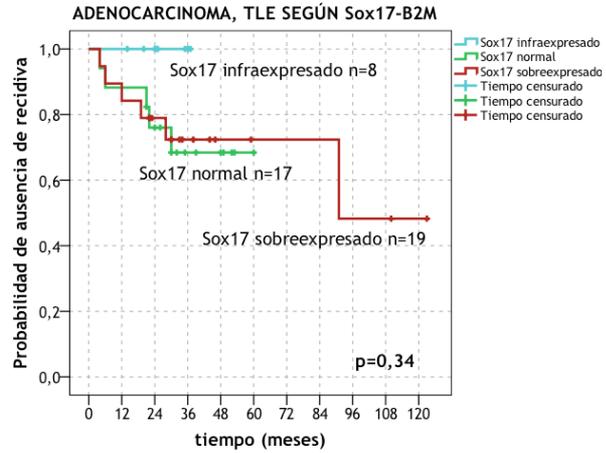
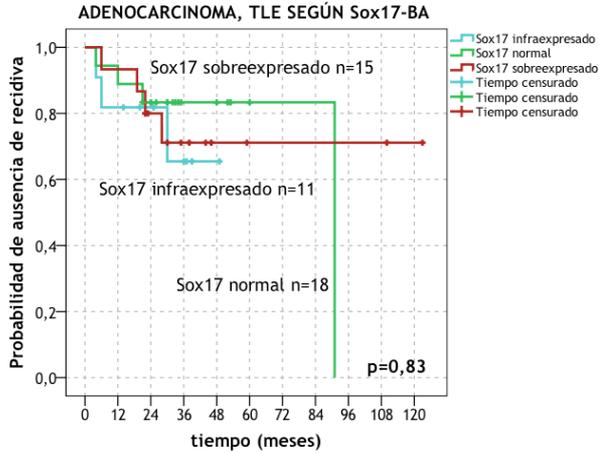
CARCINOMA ESCAMOSO, OS SEGÚN Sox17-B2M



CARCINOMA ESCAMOSO										
SOX17	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
Gen de referencia βA										
Infraexpresado	47,9	7,3	100%	71%	-	55,2	4,4	100%	83%	-
Expresión normal	63,2	17,8	78%	33%	33%	66,1	11,5	84%	45%	45%
Sobreexpresado	93,7	13,2	89%	78%	62%	89,3	12,3	94%	73%	52%
Gen de referencia β2M	TLE					OS				
Infraexpresado	-	-	100%	100%	-	77,4	7,9	100%	86%	-
Expresión normal	-	-	80%	40%	40%	63,7	10,6	85%	42%	42%
Sobreexpresado	-	-	86%	86%	57%	90,3	14,3	93%	81%	49%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con carcinoma escamoso (n=50) según expresión tumoral de SOX17. 1: meses.

Adenocarcinoma



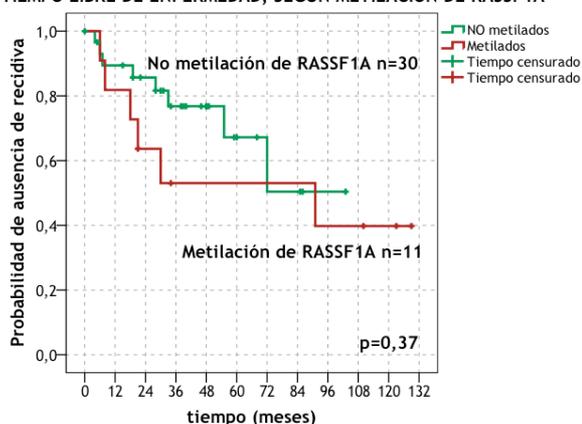
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes con adenocarcinoma (n=44) según expresión tumoral de SOX17. 1: meses.

ADENOCARCINOMA												
SOX17	TLE					OS						
	Gen de referencia βA	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a	
Infraexpresado		37,9	5,4	82%	-	-	37,9	4,6	91%	-	-	
Expresión normal		77,9	8	89%	83%	0%	86,6	7,7	94%	89%	-	
Sobreexpresado		93,7	13,2	93%	71%	71%	89,5	16,1	93%	60%	60%	
Gen de referencia β2M	TLE					OS						
	Infraexpresado		-	-	100%	-	-	34,1	2,7	100%	-	-
	Expresión normal		46,5	5,1	88%	68%	-	50,8	4,1	94%	67%	-
Sobreexpresado		85,3	12,1	84%	72%	48%	86,8	13,3	90%	67%	45%	

Metilación de DNA

Para validar los resultados de expresión, se analizó la metilación de DNA del promotor de RASSF1A en las muestras del grupo A y en 43 tumores con confirmación histológica. Ninguna muestra de ganglios normales estaba metilada (0/21). Ninguna de las muestras de pulmón normal estaba metilada (0/20). Se apreció que 11 de 41 muestras tumorales válidas presentaban metilación de RASSF1A, un 27%. Ninguno de estos pacientes presentó metilación ganglionar. Las curvas de supervivencia fueron similares en términos de supervivencia global aunque algo mejor la de los no metilados respecto el tiempo libre de enfermedad.

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD, SEGÚN METILACIÓN DE RASSF1A



Marcador	TLE				
	Media ¹	SD ¹	1 a	5 a	10 a
NO metilado	73,3	8,4	89%	67%	-
Metilado	71,4	16,5	82%	53%	40%

Tiempo libre de enfermedad según metilación tumoral del promotor de RASSF1A (n=41). 1: meses.

Anexo 14. Modelos multivariantes con la combinación de marcadores y por histología

Combinación de marcadores

TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD (n ¹ =99)						
Variable		Error típico	p valor	Hazard ratio	Intervalo de confianza 95%	
Edad		0,02	0,22	0,97	0,93	1,02
Sexo		0,55	0,84	0,89	0,3	2,64
Estadio patológico ¹	I	0,6	0,2	0,47	0,14	1,52
	II	0,59	0,55	1,42	0,45	4,52
SFTPC-SHH-SHP2, 1(SFTPC)-3 marcadores con signo adverso		0,84	0,01	8,63	1,67	44,73

Análisis multivariante de factores asociados a la recidiva en la serie tumoral, incluyendo la firma (n=99; 3 casos perdidos por imposibilidad técnica de la determinación de algún marcador de la firma). 1: referencia, estadio III-IV. Prueba ómnibus: p=0,005. -2 log de la verosimilitud inicial: 238,44, final: 218,92. 1, n: número de pacientes.

SUPERVIVENCIA (n ¹ =99)						
Variable		Error típico	p valor	Hazard ratio	Intervalo de confianza 95%	
Edad		0,02	0,78	1,01	0,96	1,06
Sexo		0,55	0,69	0,8	0,27	2,36
Estadio patológico ¹	I	0,54	0,02	0,29	0,1	0,84
	II	0,5	0,67	1,24	0,46	3,32
SFTPC-SHH-SHP2, 1(SFTPC)-3 marcadores con signo adverso		0,75	0,02	5,74	1,31	25,12

Análisis multivariante de factores asociados a la supervivencia en la serie tumoral, incluyendo la firma (n=99; 3 casos perdidos por imposibilidad técnica de la determinación de algún marcador de la firma). 1: referencia, estadio III-IV. Prueba ómnibus: p=0,001. -2 log de la verosimilitud inicial: 242,16, final: 220,23. 1, n: número de pacientes.

Carcinoma escamoso

Análisis univariante

CARCINOMA ESCAMOSO. Variables p-valor <0,05.	
TLE	OS
Insuficiencia renal crónica	Insuficiencia renal crónica
pT	pT
Estadio patológico	Estadio patológico
Invasión linfático intratumoral	Tamaño tumoral
Insuficiencia respiratoria postoperatoria	Insuficiencia respiratoria postoperatoria
Fístula broncopleurales postoperatoria	Fístula broncopleurales postoperatoria
Empiema postoperatorio	Hemotórax postoperatorio
	Invasión perineural intratumoral
	Edad ≥65 años
	QT adyuvante (estadio II)

Tiempo libre de enfermedad

Los pacientes con carcinoma escamoso y FGFR2b-β2M infraexpresado tienen un riesgo de recidiva 8,19 veces superior que los pacientes sobreexpresados ($p=0,02$). Los pacientes con SHH-β2M infraexpresado presentaban un riesgo de recidiva 4,6 (1,36-15,57) veces superior que el resto de pacientes ($p=0,01$), en un modelo que incluía edad, sexo, insuficiencia renal crónica y invasión linfática intratumoral. Estos datos eran similares a los resultados de la serie global expuesta en el cuerpo de esta tesis.

Los pacientes con FRS2 sobreexpresado presentan un riesgo de recidiva 5,39 (1,13-25,66) veces menor que el resto de pacientes ($p=0,03$), en un modelo que incluía edad, sexo, antecedente de insuficiencia renal crónica, pT e invasión linfática intratumoral. El resto de marcadores evaluados (SHP2, SOX, SFTPC) no se asociaron a mejor o peor pronóstico.

Supervivencia global

Los pacientes con FGFR2b sobreexpresado tienen un riesgo 7,28 (1,74-30,5) menor de mortalidad que el resto de pacientes ($p=0,007$). La edad ≥70 años seguía asociándose a una mayor mortalidad, de forma significativa. Por su parte, los pacientes con SHH-β2M sobreexpresado presentaban un riesgo 2,92 (1,06-8,04) veces menor de mortalidad que el resto de pacientes, en un modelo con edad, sexo, insuficiencia renal crónica como antecedente patológico y tamaño

tumoral.

En cambio, SFTPC- β A infraexpresado se asociaba a un riesgo de mortalidad 4,14 (1,12-15,28) veces superior, en un modelo con edad y sexo, donde la mayor edad también era un factor pronóstico negativo. Estos datos también eran similares a la serie global.

CARCINOMA ESCAMOSO (n ¹ =49). Tiempo libre de enfermedad.					
Variable		p valor	Hazard ratio	Intervalo de confianza 95%	
Edad		0,58	0,97	0,87	1,08
Sexo		0,99	3,43·10 ⁵	0	∞
FGFR2b-β2M¹	Infraexpresado	0,02	8,19	1,31	51,04
	Normal	0,09	7,56	0,73	78,45
Antecedente de insuficiencia renal crónica		0,11	5,06	0,69	37,25
pT	pT1a	0,09	0,11	0,008	1,47
	pT1b	0,22	0,3	0,04	2,01
	pT2a	0,8	1,23	0,25	6,14
	pT2b	0,56	0,48	0,04	5,69
Invasión linfática intratumoral		0,24	0,38	0,08	1,87

Análisis multivariante de factores que condicionan el tiempo libre de enfermedad en los carcinomas escamosos, incluyendo el FGFR2b (n=49; 1 caso censurado antes del evento más temprano en un estrato). 1: referencia, FGFR2b sobreexpresado. Prueba ómnibus: p=0,03. 1, n: número de pacientes.

Adenocarcinoma

Análisis univariante

ADENOCARCINOMA. Variables p-valor <0,05.	
TLE	OS
Antecedente de hepatopatía	Tamaño tumoral
Estadio patológico	Estadio patológico
Invasión linfática intratumoral	Invasión linfática intratumoral
Localización del tumor	Localización del tumor
Insuficiencia respiratoria postoperatoria	
Edad	

Tiempo libre de enfermedad

Los pacientes con infraexpresión de SHP2-β2M presentaban mayor riesgo de recidiva respecto el resto de pacientes, en un modelo que incluía edad, sexo e invasión linfática intratumoral. Los pacientes con infraexpresión de MYCN-βA presentaban un riesgo de recidiva 4,08 (1,1-15,11) veces superior que el resto de pacientes, $p=0,04$ (modelo con edad y sexo). Los pacientes con infraexpresión de SHH-βA presentaban un riesgo de recidiva 5,1 (1,16-22,43) veces superior al resto de pacientes, $p=0,03$ (modelo con edad, sexo y estadio patológico). Estos datos también eran similares a los obtenidos con la serie global. En este último modelo, los pacientes ≤65 años presentan mayor riesgo de recidiva de forma independiente.

ADENOCARCINOMA (n ² =44). Tiempo libre de enfermedad.				
Variable	p valor	Hazard ratio	Intervalo de confianza 95%	
Edad	0,07	5,62	0,89	35,54
Sexo	0,49	0,61	0,14	2,54
SHP2-β2M infraexpresado	0,02	5,34	1,23	23,22
Invasión linfática intratumoral	0,005	13,26	2,14	82,12

Análisis multivariante de factores que condicionan el tiempo libre de enfermedad en los pacientes con adenocarcinoma, incluyendo SHP2 (n=44). Prueba ómnibus: $p=0,001$. 1, n: número de pacientes.

Supervivencia global

Los pacientes con sobreexpresión de CEACAM5-βA y MYCN presentaban significativamente menor riesgo de mortalidad ($p<0,05$), en sendos modelos donde la edad se asociaba o presentaba tendencia a mejor pronóstico. Por su parte, los pacientes con infraexpresión de SHP2 presentaban un riesgo 7,21 (1,15-45,23) veces superior de mortalidad, respecto los pacientes con expresión normal. En este modelo, la edad también se asoció a mejor pronóstico. Finalmente apuntar que la infraexpresión de SOX17 se asoció a peor pronóstico de forma independiente.

Anexo 15. Datos de expresión de los pacientes del estudio ganglionar

Muestras de tumor y ganglios de pacientes con CPNCP

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN ¹ :CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR ² CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 1	T ³	0	4,48E-02	1,08E+00	5,53E+00	0,776	0,531	13,861		
	2R ⁴	-	6,85E-03	6,65E-01	1,00E+00	0,093	21,416	27,785		
	4R	-	8,47E-03	1,35E-01	9,62E-01	0,121	3,022	26,932		Éxito
	7	-	6,29E-03	1,57E-01	1,03E+00	0,088	3,557	28,665		
	9	-	3,66E-02	9,51E-02	1,40E+00	0,710	0,616	2,482		
	11R	-	5,90E-02	9,47E-02	1,14E+00	1,271	3,161	31,587		
Caso 2	T	0	7,72E-01	2,32E-04	4,66E+00	15,285	0,064	9,082		
	4R	-	1,02E+00	1,30E+00	8,99E+01	605,214	211,661	190,182		
	7	-	2,78E-03	1,59E-03	2,68E+00	1,632	0,950	0,443		
	8	-	5,68E-03	3,95E-03	9,36E+00	3,332	2,515	0,644		Vivo
	10R	-	9,34E-04	7,87E-04	7,01E-01	0,546	0,384	0,412		
	11R	-	1,96E+00	1,78E-01	2,35E+02	192,845	149,667	134,946		
Caso 3	12R	-	2,27E-02	1,52E-02	1,71E+01	16,637	10,745	20,270		
	T	0	1,45E-02	1,07E-02	2,89E-01	0,259	0,327	0,185		
	4R	-	1,82E-02	1,11E-02	1,19E-01	7,924	1,110	0,440		
	7	-	6,56E-04	3,43E-03	2,67E-01	0,379	0,700	0,251		Recidiva
	8	-	2,04E-03	4,60E-03	2,45E+00	1,211	0,690	4,458		
	9	-	7,09E-03	7,14E-03	4,05E+00	4,174	3,825	3,449		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia. La columna pN indica el status patológico ganglionar y para cada muestra ganglionar, si es positiva o negativa para malignidad a nivel patológico. El número de caso es el mismo que para el estudio tumoral. 1, CAN: concentración absoluta normalizada; 2, CR: concentración relativa; 3, T: tumor; 4, R: right.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 4	T	0	1,20E-01	1,40E-02	1,10E+00	1,897	0,341	2,537		
	2R	-	8,27E-04	8,23E-03	3,23E-01	0,341	1,362	1,538		
	4R	-	4,77E-03	3,81E-02	2,15E-01	1,491	0,960	2,044		
	7	-	9,87E-05	1,78E-02	1,50E-01	0,027	0,735	1,258	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	1,97E-03	4,19E-03	1,12E+00	0,960	1,659	3,109		
	10R	-	3,62E-04	6,55E-03	2,04E-01	0,129	0,214	1,592		
Caso 5	11R	-	1,58E-03	5,59E-03	1,53E+00	0,759	0,833	2,811		
	T	0	1,56E+00	4,12E+00	4,30E-01	29,121	0,869	1,813		
	4R	-	1,33E-02	9,91E-03	6,34E-01	0,219	0,482	1,088		
	7	-	9,18E-03	6,23E-03	1,86E-01	0,139	0,710	1,186	Sin enfermedad	Vivo
	10R	-	9,90E-03	7,23E-03	2,34E-01	0,159	0,960	1,111		
	12R	-	1,53E+01	3,95E-01	2,14E+03	134,952	390,887	32,475		
Caso 6	T	0	5,28E+00	1,16E-02	3,01E+02	139,166	2,893	5,222		
	4R	-	6,46E-03	4,15E-03	1,86E-01	0,072	0,230	1,464		
	7	-	2,33E-04	5,33E-03	2,61E-01	0,138	0,926	1,175	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	9,81E-01	8,01E+00	4,24E+02	578,551	1006,833	676,169		
	10R	-	5,86E-02	4,48E-04	4,68E-01	25,129	0,288	0,893		
	11R	-	3,50E-02	2,18E-02	3,00E+02	19,785	18,239	0,933		
Caso 7	T	0	4,14E-02	6,03E-04	8,87E-01	0,469	0,024	5,419		
	5	-	7,98E-03	9,01E-03	2,33E+00	4,912	0,354	2,345		
	7	-	3,00E-04	6,52E-02	8,80E-01	0,101	5,666	12,178	Sin enfermedad	Vivo
	10L ¹	-	4,30E-04	8,25E-02	1,11E+01	0,163	3,239	9,824		
	11L	-	9,04E-04	1,02E-01	7,99E+00	0,371	4,379	11,052		
	14L	-	1,29E-03	1,15E-03	5,08E+00	0,601	0,894	14,184		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia. 1. L: *left*

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 8	T	0	1,38E+00	2,66E-02	2,97E+01	34,832	0,201	3,359		
	5	-	5,03E-03	6,62E-03	8,94E-01	0,178	0,357	0,454		
	6	-	4,71E-02	1,24E-02	3,51E+00	2,992	1,703	1,033		Vivo
	7	-	7,01E-03	1,13E-02	1,17E+00	0,205	0,652	0,474		
	9	-	5,07E+00	6,06E-02	1,02E+02	109,996	57,372	25,745		
	10L	-	4,49E+00	7,83E-02	1,03E+02	89,035	62,204	30,475		
Caso 9	T	0	2,20E-02	1,42E-01	8,26E-01	0,124	0,778	0,731		
	5	-	1,04E-03	7,17E-03	1,00E+00	0,453	0,509	0,997		
	7	-	8,23E-04	5,84E-02	8,89E-01	0,363	1,665	1,307		Vivo
	9	-	8,59E+01	1,53E-02	2,77E+00	57,333	1,648	1,947		
	10L	-	1,04E-02	2,28E-03	3,90E+00	4,583	0,567	2,072		
	11L	-	8,50E+01	3,32E+00	8,38E+04	655,431	1404,274	43,298		
Caso 10	T	0	1,31E+00	6,88E-01	8,54E-01	8,050	0,342	0,726		
	3A	-	2,00E+02	6,35E-02	2,64E+00	0,347	0,595	5,210		
	4R	-	6,78E-03	3,68E-02	4,20E-01	0,090	0,397	0,720		
	7	-	1,80E-02	2,01E-02	7,71E-01	0,282	0,132	1,065		Vivo
	9	-	3,21E-01	1,06E-01	3,90E+00	8,290	1,114	1,868		
	10R	-	2,24E+00	1,29E-01	2,00E+00	23,447	1,440	3,332		
	11R	-	2,50E-02	5,14E-02	1,73E+00	0,459	0,514	2,430		

Datos de expresión de los marcadores en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 11	T	0	9,54E-02	1,72E-01	1,17E+00	0,465	0,081	0,546		
	5	-	9,54E-03	3,75E-02	6,18E-01	0,146	0,366	0,877		
	7	-	2,92E-02	4,23E-02	2,14E+00	0,559	0,403	1,219	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	5,23E-03	7,21E-02	6,89E-01	0,070	0,722	1,076		
	11L	-	4,92E-02	9,42E-02	8,15E-01	0,421	0,946	1,076		
Caso 12	T	0	1,11E+00	2,40E-02	1,52E+00	7,408	0,314	1,163		
	4Ri	-	1,31E-03	7,27E-02	1,74E+00	0,571	0,710	1,293		
	7	-	3,18E-03	3,74E-02	2,72E+00	1,254	0,345	2,058		
	8	-	2,24E-04	8,29E-02	9,53E-01	0,076	0,847	1,855	Recidiva	Éxitus
	9	-	1,02E-03	1,15E-01	1,49E+00	0,328	1,202	2,587		
	10R	-	1,03E-02	1,40E+00	2,39E+02	6,504	16,919	3,218		
Caso 13	11R	-	1,38E-03	7,49E-02	5,80E+00	0,728	0,730	5,584		
	T	0	5,36E-01	9,62E-04	1,23E+01	4,837	0,010	4,121		
	4R	-	2,98E-04	1,04E-01	6,64E-01	0,112	1,343	1,411		
	7	-	1,78E-03	1,77E-01	3,17E+00	0,816	2,267	3,774	Sin enfermedad	Vivo
	10R	-	1,07E-04	1,53E-01	6,16E-01	0,033	2,086	1,450		
	11R	-	8,30E-02	1,27E-01	2,14E+00	10,676	1,400	1,660		
12R	-	2,00E-03	1,95E-01	2,72E+00	0,991	2,100	2,268			

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 14	T	0	1,41E+00	3,25E-02	7,62E-01	10,997	0,309	0,754		
	5	-	1,08E-04	4,81E-02	5,88E-01	0,064	1,126	1,289		
	7	-	1,20E-04	4,80E-02	3,72E-01	0,071	0,917	0,791		
	8	-	2,56E-02	2,05E-02	7,73E+01	14,185	6,389	1,358	Recidiva	Vivo
	9	-	9,29E-05	5,47E-02	7,67E-01	0,055	1,564	1,620		
	10L	-	9,36E-03	1,24E-02	2,49E+01	5,413	3,594	2,372		
Caso 15	11L	-	1,35E-03	1,20E-02	2,26E+00	0,799	1,450	1,316		
	T	0	3,05E-01	1,10E-02	8,29E+00	2,788	0,494	2,425		
	5	-	1,80E-03	2,63E-01	8,27E-01	0,482	5,262	1,236		
	6	-	1,10E-04	1,52E-01	8,34E-01	0,064	2,919	1,528	Sin enfermedad	Éxito
	7	-	2,01E-04	1,27E-02	8,51E-01	0,118	0,841	1,029		
	10L	-	7,21E-04	7,64E-02	1,25E+00	0,317	2,404	2,439		
Caso 16	T	0	1,83E+00	2,48E-04	3,49E+01	11,306	0,061	3,048		
	5	-	3,05E-04	6,93E-03	1,40E+00	0,179	0,730	1,672		
	7	-	2,86E-04	1,07E-02	8,16E-01	0,164	0,710	1,062	Recidiva	Éxito
	11L	-	8,10E-04	5,86E-02	3,38E+00	0,473	4,693	1,829		
Caso 17	T	0	5,40E-01	6,62E-02	1,04E+00	4,284	0,562	0,961		
	7	-	1,10E-04	3,11E-02	4,99E-01	0,065	1,004	0,813		
	8	-	4,13E-04	1,30E-02	1,47E+00	0,243	1,122	1,420	Recidiva	Éxito
	9	-	2,34E-04	1,74E-02	6,65E-01	0,137	0,850	1,001		
	11R	-	1,03E-04	2,44E-02	5,33E-01	0,060	0,769	1,001		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 18	T	0	2,25E+01	7,59E-03	6,34E+00	216,617	0,220	7,175		
	4L	-	1,28E-01	1,73E-02	3,96E+01	41,107	5,859	50,431		
	5	-	2,10E-04	2,17E-02	4,58E-01	11,582	0,679	0,842	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	1,00E-03	4,90E-03	3,61E+00	0,443	0,614	5,964		
	10L	-	2,63E-02	1,91E-02	2,76E+00	0,487	1,791	3,437		
Caso 19	T	0	7,31E+01	2,63E-02	6,97E+04	998,764	1,467	6,246		
	4Rs	-	8,00E-04	5,66E-02	6,43E+00	0,310	1,742	16,125		
	4Ri	-	2,93E-04	6,33E-02	1,62E+00	0,105	1,460	2,551		
	7	-	5,23E-03	1,05E-01	4,32E+00	1,855	2,622	10,241	Sin enfermedad	Vivo
	10R	-	5,81E-04	1,91E-01	3,68E+00	0,233	6,848	2,578		
	11R	-	3,89E-04	2,49E-02	3,13E+00	0,134	0,908	7,191		
Caso 20	T	0	1,48E+01	1,80E-01	2,04E+00	134,737	0,621	1,617		
	5	-	1,87E-04	4,82E-02	6,72E-01	0,062	0,902	1,219		
	6	-	2,20E-04	2,33E-01	6,73E-01	0,071	2,421	1,316		
	7	-	5,61E-04	7,44E-02	1,18E+00	0,222	2,259	1,065	Recidiva	Éxitus
	9	-	1,44E-03	1,46E-02	3,79E+00	0,660	1,080	1,861		
	10L	-	2,18E-04	1,04E-01	5,57E-01	0,071	1,694	0,437		
Caso 21	11L	-	8,92E-03	3,30E-02	7,19E+01	5,338	6,411	2,190		
	T	0	1,40E+00	1,99E-02	7,91E+00	33,336	1,115	0,368		
	5	-	3,36E-03	2,47E-02	3,78E+00	1,382	2,869	21,951		
	7	-	4,20E-04	5,35E-02	7,71E-01	0,152	1,724	4,794	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	3,44E+03	3,26E+00	1,84E+04	729,771	1404,274	158,819		
10L	-	2,37E+00	2,74E-01	1,21E+03	207,404	158,750	15,098			

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 22	T	0	1,58E-01	4,56E-01	4,47E-01	3,008	1,167	1,217		
	4Rs	-	5,74E-04	7,68E-03	9,57E-01	0,215	1,065	2,851		
	4Ri	-	4,04E-04	1,03E-02	6,22E-01	0,140	1,202	2,198	Recidiva	Vivo
	7	-	3,91E-03	2,72E-02	4,81E-01	1,501	2,008	1,707		
	10R	-	2,07E-03	4,01E-03	4,63E+00	1,001	1,700	1,445		
	10R	-	2,88E-03	1,31E-02	2,41E+00	1,335	2,115	2,372		
Caso 23	T	0	1,24E-01	4,76E-03	2,31E+00	1,172	5,197	1,437		
	4Ri	-	1,03E-04	4,28E-02	2,41E-01	0,014	0,997	1,358	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	6,14E-04	1,48E-01	6,96E-01	0,112	6,258	2,982		
	8	-	5,25E-04	1,08E-02	8,31E-01	0,100	1,343	2,951		
	T	0	5,27E+00	7,07E-03	9,25E-01	90,447	0,070	1,318		
Caso 24	4Rs	-	5,15E-04	4,81E-03	1,00E+00	0,203	0,743	3,473		
	4Ri	-	3,20E-03	2,20E-02	1,80E+00	1,465	3,388	1,672		
	7	-	2,57E-04	1,90E-02	1,82E+00	0,088	0,963	0,034	Sin enfermedad	Vivo
	8	-	3,47E-04	1,66E-02	2,33E-01	0,128	0,838	1,095		
	9	-	1,09E-03	2,36E-03	4,71E-01	0,440	0,418	1,609		
	10R	-	6,55E-02	5,12E-02	9,01E+01	43,905	19,234	3,827		
	11R	-	3,41E-02	4,96E-03	5,45E+00	19,580	2,137	2,109		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 25	T	0	5,61E-02	2,41E-01	3,57E-01	0,435	0,424	0,992	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	3,63E-04	5,76E-02	4,91E-01	10,348	2,212	2,660		
	9R	-	2,55E-04	9,06E-02	4,81E-01	0,039	3,022	2,632		
	11R	-	1,23E-02	9,82E-03	9,40E+00	3,710	4,319	10,170		
	12R	-	3,63E-04	1,25E-01	1,03E+00	0,063	6,707	4,427		
Caso 26	T	0	1,53E+00	1,48E+00	1,90E+00	26,983	2,458	3,912	Sin enfermedad	Vivo
	4R	-	5,02E-03	4,55E-02	6,25E+01	2,941	21,342	11,245		
	7	-	1,03E-03	2,22E-02	2,31E+00	0,448	3,472	5,156		
	10R	-	1,80E-03	4,94E-03	4,96E+00	0,845	1,919	8,853		
	11R	-	8,42E-03	9,34E-03	1,04E+01	4,599	4,215	3,880		
Caso 27	T	0	6,80E-01	5,54E-01	2,78E+00	14,460	2,046	3,885	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	2,56E-03	3,28E-02	5,96E-01	0,848	1,860	1,660		
	9	-	7,12E-01	3,76E-01	8,07E+02	165,570	158,750	23,446		
	10L	-	1,05E-02	1,05E-02	1,22E+01	5,821	4,809	3,854		
	11L	-	2,61E+00	3,22E-01	2,09E+03	209,572	167,221	10,602		
Caso 28	T	0	2,13E+00	2,28E-04	2,43E+00	49,832	0,026	1,813	Sin enfermedad	Vivo
	11L	-	9,03E-02	1,13E-01	3,71E+02	55,380	60,573	8,119		
	T	0	1,45E-01	4,50E-04	1,25E+00	2,427	0,018	0,828		
Caso 29	5	-	1,58E-03	2,26E-02	7,57E-01	0,395	1,275	3,241	Sin enfermedad	Vivo
	6	-	2,21E-04	8,19E-03	4,68E-01	0,070	0,534	1,934		
	8	-	2,58E+02	1,23E+00	7,65E+03	7947,586	458,446	23,855		
	9	-	2,35E-04	1,04E-01	4,47E-01	0,035	2,480	1,927		
	10L	-	1,59E-03	4,08E-03	2,52E+00	0,328	1,069	2,614		
	11L	-	1,62E-04	3,87E-03	4,76E-01	0,023	0,309	2,037		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 30	T	0	6,38E+00	8,20E-03	3,31E+02	68,072	0,726	3,912	Sin enfermedad	Vivo
	5	-	5,55E-04	3,99E-02	6,84E-01	0,095	2,220	2,221		
	7	-	3,28E-03	5,87E-02	2,08E+00	0,733	5,354	2,941		
	9	-	2,03E-04	5,15E-02	3,56E-01	0,031	1,348	1,507		
	10L	-	1,15E-03	6,35E-02	1,89E+00	0,244	5,699	2,587		
	11L	-	4,67E-04	8,18E-02	4,64E-01	0,072	1,742	2,087		
Caso 31	T	0	5,29E+00	7,10E-03	1,54E+00	45,538	0,169	2,141	Recidiva	Éxito
	5	-	3,70E-04	8,03E-02	4,14E-01	0,058	1,712	1,836		
	7	-	6,01E-04	2,73E-02	6,72E-01	0,106	1,620	2,397		
	10L	-	2,44E-04	7,76E-02	2,69E-01	0,037	1,608	1,088		
	11L	-	8,66E-04	1,70E-02	5,14E-01	0,170	1,122	1,637		
	T	0	3,97E-01	1,01E+01	1,11E+00	2,916	5,288	2,663		
Caso 32	4Rs	-	2,77E-04	5,91E-02	3,27E-01	0,043	1,395	1,386	Sin enfermedad	Vivo
	4Ri	-	2,62E-04	1,53E-02	5,15E-01	0,041	1,141	1,271		
	7	-	9,75E-02	2,89E-01	7,85E+02	14,942	99,430	12,052		
	9	-	2,91E-04	3,97E-02	5,07E-01	0,049	1,586	2,072		
	10R	-	7,13E-04	4,32E-03	7,10E-01	0,134	0,788	2,213		
	T	0	3,97E-01	1,01E+01	1,11E+00	2,916	5,288	2,663		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 33	T	0	2,16E+00	7,14E-03	8,63E-01	17,679	0,198	1,213	Sin enfermedad	Vivo
	4Rs	-	9,50E-04	2,99E-02	3,08E+00	0,190	6,236	4,794		
	4Ri	-	6,16E-04	9,52E-03	8,46E-01	0,114	1,506	2,244		
	7	-	1,83E-04	1,57E-02	4,03E-01	0,028	1,080	1,660		
	9	-	1,61E-03	1,15E-02	9,20E-01	0,276	1,899	1,974		
	10R	-	1,22E+05	8,12E-01	3,21E+04	1630,729	1404,274	62,520		
Caso 34	T	0	7,27E+00	3,11E-02	1,32E+00	62,857	0,643	1,600	Sin enfermedad	Vivo
	3A	-	1,14E-02	1,31E-02	2,41E+01	3,671	5,262	1,874		
	4Rs	-	1,02E+02	2,02E-01	1,63E+04	244,943	327,559	6,481		
	4Ri	-	1,66E-04	2,90E-02	2,78E-01	0,023	1	1,215		
	7	-	1,78E-03	5,62E-03	1,90E+00	0,394	1,570	2,763		
	10R	-	2,34E-04	1,32E-02	4,16E-01	0,037	1,198	1,425		
Caso 35	T	0	4,91E+03	3,99E-04	2,12E+02	36333,179	0,145	50,493	Sin enfermedad	Vivo
	4Rs	-	4,32E+04	1,85E+00	1,53E+04	1553,494	1404,274	81,925		
	4Ri	-	6,02E+01	1,24E-01	3,06E+02	334,602	49,801	107,541		
	7	-	4,80E+02	1,85E+00	1,27E+04	1357,090	1404,274	87,199		
	10R	-	7,96E+03	1,85E+00	1,75E+04	613,662	1404,274	65,970		
	11R	-	5,09E+03	5,82E-01	1,73E+03	1169,196	325,296	211,021		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 36	T	0	1,14E+02	1,21E+03	1,47E+04	1135,412	23,796	36,077		
	3A	-	1,54E+02	1,85E+00	7,90E+03	366,153	937,241	291,612		
	3	-	2,64E+05	1,85E+00	7,01E+03	2071,272	1128,827	556,887		
	4RS	-	1,55E+00	5,61E+01	6,82E+02	78,049	813,562	285,281		
	4RI	-	5,30E-02	1,42E+01	8,23E+02	18,080	926,476	122,891		Vivo
	7	-	2,22E-04	7,42E-03	1,19E+00	0,035	0,604	2,168	Sin enfermedad	
	8	-	2,42E+03	2,26E+02	2,55E+04	335,763	174,020	1,003		
	9	-	1,80E+05	1,01E+00	1,06E+04	2454,649	1399,416	151,297		
	10R	-	4,21E+02	1,85E+00	9,07E+03	414,808	1404,274	197,915		
	11R	-	1,93E-03	7,27E+00	7,10E+01	0,409	224,895	41,535		
	T	0	1,31E-02	2,87E-01	2,88E+00	0,124	0,583	5,252		
Caso 37	4RI	-	2,99E-04	8,97E-02	1,12E+00	0,050	3,594	6,756		
	7	-	3,74E-04	1,17E-01	1,19E+00	0,064	4,425	7,019	Sin enfermedad	Vivo
	10R	-	6,71E-04	7,77E-02	1,34E+00	0,110	3,365	7,432		
	11R	-	1,53E-03	2,93E-02	1,22E+00	0,298	2,649	7,266		
	T	0	1,17E-01	4,68E-02	1,85E+00	0,388	0,362	1,442		
Caso 38	7	-	6,88E-03	2,74E-03	2,32E+01	2,037	0,540	0,246		
	8	-	3,17E-04	7,66E-02	1,21E+00	0,055	2,429	1,713	Sin enfermedad	Vivo
	11L	-	1,04E-01	1,25E-01	3,59E+03	30,406	44,189	1,549		
	T	0	5,84E+00	3,32E-02	1,26E+00	21,025	0,226	1,048		
Caso 39	4R	0	4,55E-04	1,24E-02	1,05E+00	0,076	0,705	1,592		
	7	0	3,21E-04	1,19E-02	8,99E-01	0,048	0,585	1,440	Sin enfermedad	Vivo
	11R	0	2,61E-03	1,86E-02	2,75E+00	0,520	1,581	2,138		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 40	T	0	1,60E+01	3,16E-03	5,64E+00	62,423	0,145	2,635		
	5	-	3,25E-04	2,26E-02	1,22E+00	0,055	1,137	1,773		
	6	-	1,05E-04	3,86E-02	8,88E-01	0,014	0,830	1,689		
	7	-	1,00E-02	3,27E-03	6,59E+00	2,145	0,877	1,190		Éxito
	8	-	1,35E-03	2,38E-03	2,71E+00	0,285	0,462	0,777		Recidiva
	9	-	4,06E-04	7,75E-03	8,65E-01	0,068	0,451	1,312		
	10L	-	2,79E-02	1,61E-02	1,18E+02	9,198	10,026	2,792		
	11L	-	3,04E-04	2,90E-02	8,46E-01	0,048	1,173	1,615		
	T	0	2,24E+02	2,13E-02	1,03E+04	2302,523	4,587	51,912		
	4Rs	-	1,24E+00	1,85E+00	2,39E+04	236,599	1404,274	113,870		
	4Ri	-	2,04E-02	6,71E-03	2,36E+01	97,769	3,342	1,947		Sin enfermedad
9	-	9,44E-01	1,85E+00	1,47E+04	230,129	1404,274	194,853			
10R	-	1,84E+00	1,26E+00	1,21E+04	446,124	469,704	30,091			
Caso 42	T	0	9,71E-01	1,42E-01	5,81E+01	7,180	5,888	4,800		
	5	-	1,26E-03	6,27E-02	1,92E+00	0,226	1,522	2,016		
	9	-	1,29E-03	9,28E-04	1,74E+00	0,257	0,330	1,731		Recidiva
	11L	-	3,73E-03	1,98E-03	2,16E+00	0,684	0,525	2,792		
	T	0	5,12E+00	7,10E-02	2,75E+00	33,336	0,751	2,170		
Caso 43	5	-	5,05E-01	6,11E-01	3,27E+03	103,702	243,978	32,587		
	7	-	5,07E-01	4,41E-01	3,38E+03	94,438	263,308	33,737		
	8	-	1,12E-03	1,96E-03	4,84E+00	0,221	0,899	2,507		Recidiva
	9	-	6,85E-04	7,01E-03	8,85E-01	0,222	0,737	1,538		
	11L	-	1,56E-04	1,15E-02	1,05E+00	0,028	1,091	1,967		
	11LB	-	6,23E-04	9,90E-03	1,07E+00	0,131	1,091	1,707		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 44	T	0	1,06E-01	5,30E-02	2,03E+00	0,564	0,661	1,983		
	5	-	1,42E-04	5,43E-02	6,53E-01	0,029	1,395	1,604		
	6	-	5,79E-05	1,31E-02	5,27E-01	0,012	0,467	1,262	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	1,22E-04	5,74E-02	5,88E-01	0,025	1,495	1,411		
	8	-	1,14E-04	7,62E-02	5,42E-01	0,024	1,455	1,312		
	T	0	2,58E-01	4,04E-02	8,79E-01	1,300	0,352	0,789		
	5	-	3,35E-04	4,33E-02	9,58E-01	0,069	1,694	1,954		
	7	-	3,50E-03	1,55E-03	3,53E+00	0,616	0,635	1,719	Sin enfermedad	Vivo
Caso 45	8	-	8,40E-03	1,37E-02	1,62E+00	1,677	1,564	1,496		
	9	-	5,25E-04	2,67E-02	8,34E-01	0,100	1,659	1,512		
	T	0	2,19E-01	5,02E-03	5,69E+00	1,291	0,159	1,556		
	4Ri	-	8,13E-05	3,06E-02	8,32E-01	0,017	1,061	2,080		
	7	-	6,65E-05	8,58E-02	8,41E-01	0,014	1,648	2,065		
	8	-	2,19E-02	1,37E-02	5,22E+01	3,473	6,637	2,632	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	5,84E-04	7,15E-03	1,23E+00	0,116	0,956	1,554		
	11R	-	7,05E-04	1,34E-02	1,11E+00	0,127	1,083	1,544		
Caso 46	T	0	2,37E+00	2,07E-01	2,24E+00	14,065	1,336	1,721		
	4Ri	-	1,59E-04	1,95E-02	7,50E-01	0,033	1,014	1,743		
	7	-	2,48E-04	2,62E-02	1,01E+00	0,047	2,015	1,334		
	8	-	5,83E-05	7,32E-02	7,86E-01	0,012	2,830	1,592	Sin enfermedad	Éxito
	9	-	1,47E-04	7,58E-02	7,25E-01	0,031	1,415	1,755		
	11R	-	1,90E-04	4,10E-02	8,43E-01	0,038	1,402	1,887		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 48	T	0	4,27E+01	2,95E-02	5,68E+00	288,815	0,481	3,538		
	3A	-	1,51E-04	2,33E-02	6,64E-01	0,030	0,660	1,701		
	5	-	7,31E-04	1,02E-02	1,06E+00	0,145	0,994	1,615		
	7	-	2,95E-03	1,55E-02	4,17E+00	0,603	2,940	2,516	Sin enfermedad	Vivo
	8	-	3,21E-03	2,55E-02	9,58E+00	0,670	4,304	4,188		
	9	-	8,95E-04	9,55E-03	1,90E+00	0,186	1,391	1,615		
	11L	-	2,60E-04	2,78E-02	6,19E-01	0,055	1,288	1,325		
	T	0	2,29E-01	3,27E-03	2,75E+00	1,291	0,096	1,645		
	5	-	2,87E-04	1,91E-03	4,53E-01	0,044	0,235	0,777		
	6	-	7,97E-04	6,12E-04	1,52E+00	0,170	0,232	1,507	Sin enfermedad	Vivo
	8	-	2,45E-04	4,50E-03	4,54E-01	0,051	0,304	1,036		
Caso 49	T	0	3,88E-01	1,62E-02	4,85E+00	2,249	0,573	0,817		
	4Rs	-	4,01E-01	3,03E-01	7,52E+02	97,430	57,108	8,405		
	4Ri	-	3,33E-03	2,77E-02	1,15E+01	0,636	4,259	6,970		
	7	-	6,23E-03	2,58E-03	1,24E+01	1,298	2,071	1,842		
	8	-	9,76E-03	3,82E-03	9,54E+00	2,051	1,688	1,961	Sin enfermedad	Vivo
	10R	-	5,84E-04	1,71E-02	1,21E+00	15,442	1,511	1,914		
	11R	-	1,30E-03	9,48E-03	1,49E+00	0,275	1,206	1,496		
	11R	-	1,97E-03	3,72E-03	5,15E+00	0,411	1,253	2,283		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 51	T	0	7,99E+01	8,51E+00	8,30E+04	716,091	7,742	9,019	Sin enfermedad	Vivo
	5	-	4,19E-03	2,73E-03	4,06E+00	1,025	0,930	1,817		
	7	-	3,09E-03	2,81E-03	2,89E+00	0,667	0,853	1,604		
	10L	-	6,38E-03	1,17E-02	2,06E+00	1,544	1,736	1,743		
Caso 52	T	0	4,62E+01	2,13E-02	3,85E+04	119,345	4,587	1,108	Sin enfermedad	Vivo
	5	-	1,12E+00	6,98E-02	2,96E+03	226,961	11,840	0,377		
	6	-	2,18E+00	4,83E-01	3,22E+04	466,684	94,721	1,874		
	7	-	1,51E-01	6,31E-02	2,67E+02	37,826	10,634	4,427		
	8	-	5,57E+00	8,52E-02	7,07E+02	1235,861	26,642	9,423		
	10L	-	1,06E+00	1,86E-03	2,81E+03	210,299	58,510	7,842		
Caso 53	11L	-	8,08E-02	7,71E-06	4,37E+02	16,351	22,637	18,205	Sin enfermedad	Vivo
	T	0	5,81E+00	1,34E-09	3,16E+03	11,868	0,548	0,142		
	3	-	4,99E-04	3,55E-02	1,29E+00	0,094	0,306	0,856		
	4Rs	-	1,07E-02	5,45E-03	2,20E+00	2,405	0,311	0,780		
	4Ri	-	5,48E-04	8,96E-04	1,03E+00	0,115	0,068	0,300		
	7	-	1,57E-03	9,22E-04	2,52E+00	0,305	0,116	0,229		
	10R	-	8,02E-04	5,37E-04	1,45E+00	0,135	0,065	0,213		
11R	-	1,78E-03	1,22E-03	3,59E+00	0,371	0,156	0,179			

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 54	T	0	5,06E-01	8,90E-04	8,62E+00	0,939	0,086	0,271		
	5	-	3,01E-04	9,88E-03	5,90E-01	0,042	0,181	0,336		
	7	-	3,36E-03	1,27E-02	4,10E+00	0,703	0,477	0,436		
	8	-	3,89E-03	6,17E-03	1,80E+00	0,672	0,318	0,520		Vivo
	10L	-	2,14E-02	1,21E-02	5,06E+01	6,504	1,835	0,791		
	11L	-	5,37E-04	5,23E-03	7,07E-01	0,084	0,127	0,320		
Caso 55	T	0	1,78E-01	1,37E+01	1,85E+01	0,290	0,108	0,345		
	4R	-	3,55E-03	1,24E-03	1,32E+00	0,389	0,093	0,225		
	7	-	3,01E-03	6,09E-02	7,37E+03	139,228	19,571	0,389		Vivo
	11L	-	2,56E-03	9,33E-03	5,12E-01	0,019	0,149	0,287		
Caso 56	T	0	3,93E+00	3,32E-03	1,20E+03	8,480	0,312	0,185		
	4R	-	1,49E-01	2,92E-02	1,63E+03	32,140	7,921	0,391		
	7	-	2,18E-04	3,38E-02	7,80E-01	0,030	0,315	0,490		Éxito
	10R	-	3,03E-03	1,43E-02	1,24E+00	0,229	0,377	0,254		
	11R	-	6,22E-04	1,04E-02	6,98E-01	0,094	0,196	0,240		
Caso 57	T	0	1,68E+01	5,78E+00	1,55E+04	35,977	7,274	1,359		
	5	-	3,62E-04	2,46E-03	3,76E-01	0,052	0,058	0,152		
	7	-	4,37E-04	4,76E-02	6,13E-01	0,061	0,350	0,373		Vivo
	8+9	-	4,89E-04	2,77E-03	7,62E-01	0,079	0,131	0,197		
	10L	-	2,21E-03	2,16E-03	4,65E+00	0,467	0,247	0,243		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 58	T	0	6,15E-02	2,09E-04	2,22E+00	0,101	0,013	0,085		
	7	-	2,11E-03	4,63E-03	1,55E+00	0,194	0,255	0,387		
	8	-	2,44E-03	6,70E-03	2,84E+00	0,513	0,434	0,442	Sin enfermedad	Éxito
	11	-	1,15E-02	3,63E-03	3,11E+01	3,229	0,899	0,286		
	12	-	2,99E-03	1,00E-03	2,75E+00	0,614	0,126	0,227		
Caso 59	T	0	3,93E-01	1,59E-03	6,49E+00	0,576	3,630	0,043		
	4L	-	3,19E-04	5,23E-03	4,69E-01	0,041	0,081	0,162		
	5	-	3,15E-03	1,75E-03	1,78E+00	0,601	0,089	0,114		
	7	-	1,21E-03	1,43E-03	6,91E-01	0,191	0,063	0,098	Sin enfermedad	Vivo
	8+9	-	2,79E-03	1,57E-04	9,82E-01	0,469	0,026	0,149		
	10R	-	9,64E-03	2,42E-02	3,97E+02	3,174	0,960	0,038		
Caso 60	11R	-	2,33E-04	1,68E-03	9,64E-01	0,061	0,079	0,095		
	T	0	6,67E-01	5,13E-03	4,70E+00	1,172	0,203	0,113		
	4Rs	-	1,63E-03	1,13E-03	3,80E+00	0,386	0,114	0,158		
	4Ri	-	1,08E-03	1,60E-03	7,66E+00	0,555	0,166	0,079	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	5,14E-03	1,66E-02	1,52E+02	1,829	2,057	0,516		
Caso 61	8	-	4,48E-04	5,67E-03	1,42E+00	0,085	0,210	0,114		
	T	1	3,10E-01	1,05E-02	1,46E+00	0,501	0,126	0,467		
	5	-	1,53E-03	8,72E-04	2,39E+00	0,202	0,107	0,188		
	7	-	3,45E-04	1,12E-02	1,39E+00	0,071	0,388	0,492		
	8+9	-	1,63E-04	2,97E-02	8,83E-01	0,032	0,477	0,478	Recidiva	Vivo
	10L	-	1,11E+00	4,93E-01	3,29E+04	230,928	96,043	1,900		
	11L	-	2,74E-01	4,46E-02	7,50E+02	59,150	15,249	2,221		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 62	T	1	8,09E-01	7,02E+00	1,89E+00	5,556	12,708	4,150		
	T		1,16E-01	4,28E-05	2,01E+01	0,829	0,008	4,326		
	5	-	2,01E-04	1,22E-01	2,18E-01	0,031	1,343	3,008	Sin enfermedad	Éxito
	7	-	8,38E-05	1,93E-02	8,34E-01	0,012	1,050	5,497		
	10L	-	1,02E-03	1,93E-02	6,65E+00	0,230	2,022	5,701		
Caso 63	T	1	1,49E+01	4,51E-03	6,82E+01	37,897	0,875	29,764		
	T		6,45E-02	2,81E-02	4,75E-01	1,568	0,341	7,266		
	5	-	1,14E-04	6,27E-02	2,37E-01	0,015	2,079	6,815	Sin enfermedad	Éxito
	7	-	1,48E-04	4,44E-02	3,47E-01	0,024	2,152	8,204		
	9	-	2,25E-04	5,96E-02	3,31E-01	0,037	13,624	1,579		
Caso 64	T	1	4,39E-03	2,09E-03	6,43E-01	0,024	0,032	2,212		
	4Rs	-	6,28E-05	7,35E-02	6,43E-01	0,010	2,314	4,647		
	4Ri	-	3,89E-05	2,73E-02	2,00E-01	0,013	0,595	2,782	Recidiva	Vivo
	7	-	7,28E-04	2,07E-02	3,43E+00	0,170	2,705	5,283		
	T	1	1,64E+00	9,07E-04	1,12E+01	18,240	0,084	11,596		
Caso 65	4R	-	3,89E-05	1,36E-02	3,29E-01	0,006	1,343	6,874		
	7	-	2,34E-03	8,59E-02	2,92E-01	0,015	2,144	7,007	Recidiva	Éxito
	9	-	1,23E-04	3,10E-02	3,52E-01	0,018	2,577	6,839		
	10R	+	7,97E-03	7,59E-03	2,65E+00	2,284	3,644	11,148		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 66	T	1	3,18E-01	3,37E-03	1,03E+00	27,218	0,295	3,508		
	4L	-	2,15E-04	3,84E-02	1,13E+00	0,008	1,816	6,652		
	5	-	2,28E-04	2,41E-02	2,21E+00	0,016	1,803	8,946	Recidiva	Éxito
	7	-	5,89E-04	1,83E-02	1,02E+00	0,087	1,381	6,425		
	10L	-	4,85E-04	3,34E-02	1,00E+00	0,076	2,205	6,381		
Caso 67	T	1	2,33E-03	4,33E-04	6,83E-01	0,011	0,010	2,455		
	5	-	1,80E-04	6,91E-02	1,31E+00	0,030	3,582	5,246		
	7	-	1,09E-03	1,81E-03	5,53E+00	0,180	0,700	6,370	Recidiva	Éxito
	8	-	6,15E-03	8,42E+00	7,14E-01	0,957	43,732	5,384		
Caso 68	T	1	8,83E-03	1,72E-03	7,21E-01	0,052	0,034	1,966		
	5	-	1,61E-04	2,77E-02	3,81E-01	0,022	0,960	3,614		
	6	-	3,16E-04	3,79E-02	6,63E-01	0,057	1,778	3,941	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	1,40E-04	6,60E-02	1,03E+00	0,025	3,228	4,343		
	9	-	1,09E+04	1,18E+00	1,80E+04	192,845	258,785	8,998		
Caso 69	T	1	2,05E+00	7,03E-01	1,89E+00	4,067	1,703	2,924		
	5	-	4,73E-04	8,00E-02	7,85E-01	0,059	0,504	3,787		
	7	-	5,83E-04	8,94E-03	9,09E-01	0,115	0,229	2,987	Sin enfermedad	Vivo
	8	-	NF	NF	NF	NF	NF	NF		
	9	-	2,78E-04	1,19E-02	7,40E-01	0,044	0,237	3,087		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.
1, NF: técnicamente no factible.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 70	T	1	1,38E-01	2,84E-02	2,37E+00	8,465	9,239	1,589		
	4Rs	-	7,21E-03	6,04E-03	2,26E+00	1,440	0,331	2,915		
	4Ri	-	1,33E+00	NF	2,13E+03	44,057	NF	4,045	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	2,59E-02	4,92E-03	1,64E+01	8,063	0,607	3,045		
	10R	-	1,08E-02	2,23E-03	7,02E+00	1,887	0,258	2,123		
Caso 71	T	1	2,88E+01	2,23E+03	6,83E+03	92,990	26,404	9,082		
	5	-	2,40E+04	7,31E-01	1,72E+03	1613,861	85,664	35,970		
	6	-	1,13E-03	9,40E-03	7,08E-01	0,174	0,173	3,449		
	7	-	9,66E-04	3,35E-02	8,94E-01	0,170	0,416	3,955		
	8	-	7,95E-01	7,03E-02	1,43E+02	96,423	3,786	4,895	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	1,90E+03	9,47E-01	1,80E+03	1343,053	115,409	54,710		
	10L	-	2,09E-02	7,40E-03	1,24E+00	4,232	0,233	3,589		
	11L	-	9,83E-03	6,51E-03	7,56E+00	2,364	0,559	4,963		
	T	1	3,64E+01	3,74E-04	4,02E+00	101,758	0,018	6,625		
	4R	-	1,89E+00	9,97E-03	8,63E-01	452,352	1,240	12,073		
Caso 72	7	-	1,04E-03	2,94E-02	4,93E-01	0,176	2,586	8,449	Sin enfermedad	Vivo
	8	-	2,04E-04	4,92E-02	2,84E-01	0,030	2,079	6,733		
	11R	-	6,61E-04	7,44E-03	3,48E-01	0,117	1,095	6,414		
	T	1	6,41E+00	1,26E-01	1,56E+04	51,768	2,342	3,865		
Caso 73	4Rs	-	4,32E-03	1,56E-03	3,66E+00	0,418	0,507	4,712		
	4Ri	-	1,16E-03	2,08E-02	8,04E+00	0,176	3,852	6,745	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	3,80E-03	5,13E-03	4,71E+00	0,703	1,245	4,607		
	9	-	4,86E-04	2,02E-02	1,01E+00	0,085	1,480	4,419		
	10R	-	2,13E-03	8,71E-03	1,95E+01	0,472	2,677	5,691		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia. 1, NF: técnicamente no factible.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 74	T	1	1,15E-02	1,39E-03	5,45E-01	0,019	0,023	1,388	Recidiva	Éxito
	T	-	7,71E+00	3,57E-01	1,20E+01	18,883	5,493	3,453		
	5	-	1,97E-04	4,04E-02	7,48E-01	0,031	0,422	3,558		
	7	-	5,69E-04	4,70E-03	7,20E-01	0,107	0,146	2,787		
Caso 75	T	1	1,35E-01	3,63E+01	6,85E-01	1,808	22,748	5,326	Sin enfermedad	Vivo
	5	-	1,50E-04	3,87E-02	7,71E-01	0,021	0,403	5,771		
	7	-	3,70E-04	4,90E-02	2,03E-01	0,040	1,014	5,771		
	8	-	1,11E-04	1,22E-01	9,33E-01	0,014	0,669	6,271		
	10L	-	2,72E-04	1,18E-02	3,45E-01	0,041	1,129	6,606		
	11L	-	2,71E-04	2,16E-02	2,96E-01	0,043	1,362	6,481		
Caso 76	T	1	1,86E-02	3,26E-03	7,62E-01	0,252	0,049	4,742	Recidiva	Vivo
	4L	-	1,31E-04	1,15E-02	2,79E-01	0,022	0,690	6,617		
	5	-	8,30E-03	4,42E-02	3,01E+00	2,880	2,940	12,630		
	5+6	-	1,51E-04	2,09E-02	2,49E-01	0,023	0,766	6,348		
	7	-	6,95E-04	7,92E-02	1,81E+00	0,338	1,543	9,294		
	9L	-	1,36E-03	4,44E-03	1,29E+00	0,577	1,284	9,229		
	10L	-	2,96E-03	4,91E-03	6,56E-01	0,748	0,987	7,869		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 77	T	2	7,04E-01	5,74E-02	3,43E+00	8,248	1,023	5,909		
	4Rs	+	1,02E-03	5,45E-03	1,07E+00	0,219	1,554	6,922		
	4Ri	-	2,15E-01	7,27E+01	1,63E+01	48,379	1328,524	30,038	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	5,97E-04	6,27E-04	1,26E+00	0,121	0,507	7,748		
	10R	-	2,41E-04	8,74E-04	1,08E+00	0,049	0,567	6,934		
Caso 78	T	2	9,82E-03	3,09E-05	1,67E+00	0,101	0,002	4,022		
	4R	+	8,68E-04	1,66E-03	4,75E-01	0,215	0,599	4,631		
	7	+	1,37E-04	2,90E-02	1,21E+00	0,022	1,754	6,970	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	5,21E-03	2,02E-02	3,38E+00	1,767	8,698	12,917		
	10R	-	1,51E-03	3,54E-03	1,63E+00	0,335	1,867	8,716		
10R	-	2,92E-03	1,83E-02	1,03E-01	0,705	5,601	3,583			
Caso 79	T	2	1,96E+01	1,30E-03	5,94E+00	34,392	0,103	8,727		
	7	-	2,44E-03	3,23E-02	5,88E-01	0,381	4,289	6,359		
	9	-	3,47E-03	2,34E-02	1,14E+02	0,799	24,178	12,052	Sin enfermedad	Vivo
	10L	-	2,77E-04	6,90E-02	1,52E-01	0,040	2,347	3,880		
	11L	-	9,11E-04	1,84E-02	9,92E-01	0,154	0,424	3,060		
Caso 80	T	2	5,58E+01	5,93E-03	1,66E+00	1002,231	0,124	3,550		
	7	+	1,10E-03	8,54E-03	9,77E-01	0,203	1,076	6,337	Sin enfermedad	Vivo
	9	-	NF	NF	1,14E+02	NF	NF	NF		
	11	+	1,95E-02	1,51E-03	8,36E-01	4,442	0,409	8,232		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia. 1, NF: técnicamente no factible.

PACIENTE	MUESTRA	pN	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2	CR CEA	CR FGFR2B	CR SHP2	RECIDIVA	SUPERVIVENCIA
Caso 81	T	2	1,15E+00	8,56E-02	2,59E+00	12,987	0,467	5,180	Recidiva	Éxito
	4Rs	-	1,37E-03	7,16E-04	1,15E+00	0,363	0,387	9,326		
	4Ri	-	4,73E-04	5,69E-02	1,46E+00	0,101	2,899	7,801		
	7	-	3,06E-04	2,88E-02	3,12E-01	0,058	1,554	6,815		
	9	-	7,60E-04	3,11E-02	8,43E-01	0,169	3,307	9,440		
	10R	-	1,96E-03	2,69E-02	6,56E-01	0,430	2,724	8,777		
Caso 82	T	2	6,88E-02	4,31E-02	2,15E+00	0,749	0,392	4,693	Sin enfermedad	Vivo
	T	2	1,03E-02	1,02E-03	7,03E-01	0,135	0,026	4,541		
	4	+	1,05E-03	9,03E-03	1,22E+00	0,187	0,976	7,007		
	7	-	1,57E-03	1,40E-02	6,18E-01	0,274	2,306	8,189		
	T	2	8,49E-01	5,60E-03	2,25E+00	54,910	90,677	4,978		
Caso 83	4	+	2,32E-02	1,31E-02	1,86E+00	8,175	8,257	9,638	Sin enfermedad	Vivo
	7	-	6,58E-04	1,49E-02	8,76E-01	0,131	3,296	6,414		
	9	-	7,17E-04	1,04E-02	9,16E-01	0,118	2,541	8,175		
	10L	-	5,92E-02	2,22E-03	2,09E+00	15,098	0,830	9,555		

Datos de expresión de los marcadores embrionarios en los pacientes del estudio de restadificación molecular ganglionar, referenciados al status de recidiva y supervivencia.

Muestras ganglionares de pacientes sin neoplasia

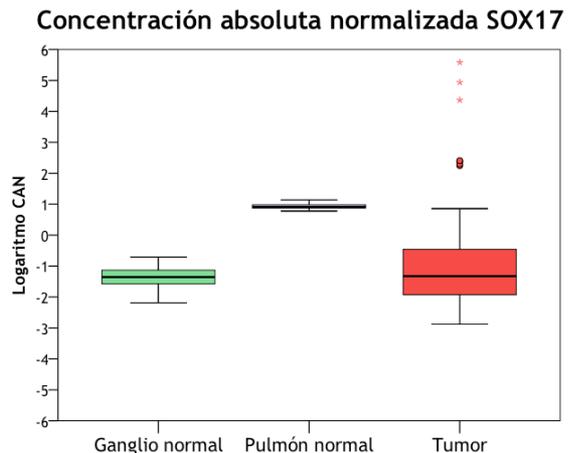
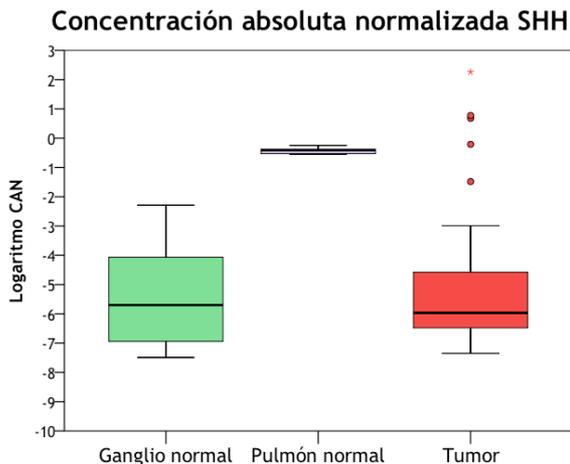
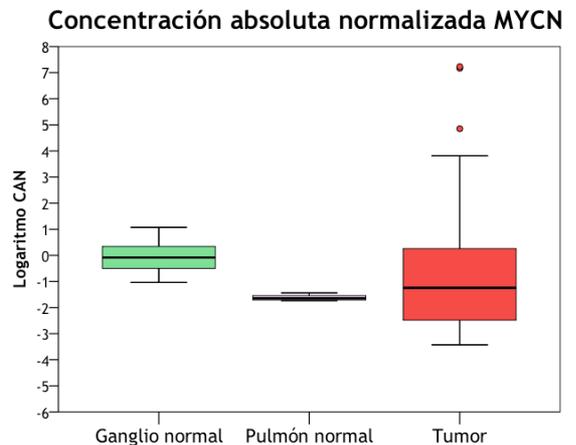
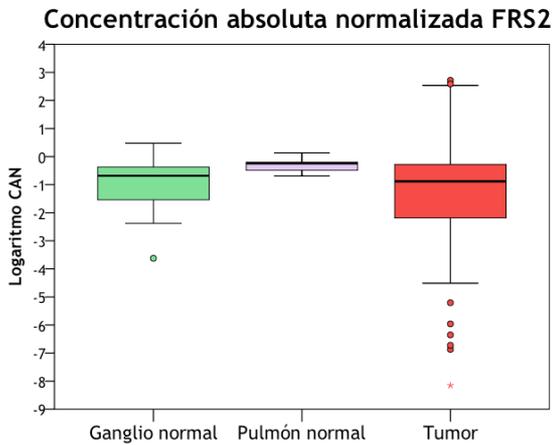
Datos de expresión de los marcadores embrionarios en muestras ganglionares de pacientes sin neoplasia. Se dividen los pacientes según presenten patología inflamatoria. 1, ND: no disponible.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2
Caso 1	Hamartoma	1,81E-03	3,62E-02	2,53E+00
Caso 2	Hamartoma	2,54E-04	1,20E-02	8,35E-01
Caso 3	Neumotórax	4,36E-04	4,80E-03	1,34E-01
Caso 4	Fibrosis	2,19E-04	5,34E-03	1,95E-01
Caso 5	Hamartoma	1,10E-01	1,08E+00	1,29E+02
Caso 5	Hamartoma	1,63E-02	3,53E-01	2,11E+01
Caso 6	Enfisema	5,02E-04	9,79E-03	1,72E-01
Caso 7	Glomerulonefritis	3,86E-04	1,31E-02	2,22E-01
Caso 8	Nódulo fibroso	8,90E-01	6,76E-03	8,95E-01

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	CAN CEACAM5	CAN FGFR2b	CAN SHP2
Caso 9	Secuestro pulmonar	ND ¹	1,01E-02	1,67E-01
Caso 10	Quiste broncogénico	4,80E-02	8,76E-02	3,82E+01
Caso 11	Pleuropericarditis	4,70E-04	8,94E-03	3,68E-01
Caso 12	Broncocele	2,85E-03	1,11E-01	3,64E+00
		2,30E-04	7,78E-03	5,08E-01
Caso 13	Amiloidosis	6,35E-04	3,54E-02	9,48E-01
		4,29E-04	1,58E-02	5,59E-01
Caso 14	Amiloidosis	8,41E-03	1,38E-01	1,94E+01
		8,41E-03	1,38E-01	1,94E+01
Caso 15	Tuberculosis	9,31E-03	1,58E-01	7,47E+00
		5,39E-04	2,63E-02	8,16E-01
		ND	5,75E-01	3,41E+01
		1,79E-03	3,02E-02	3,63E+01
		6,42E-03	8,04E-02	1,53E+01
Caso 16	Neumonía organizativa	ND	6,11E-01	1,49E+01
		1,45E-03	3,96E-02	1,62E+01
Caso 17	Bronquiectasias	9,10E-01	1,03E-02	9,14E-01

Anexo 16. Restadificación molecular ganglionar de los marcadores por separado

Expresión en ganglio normal, pulmón y tumor (otros marcadores)

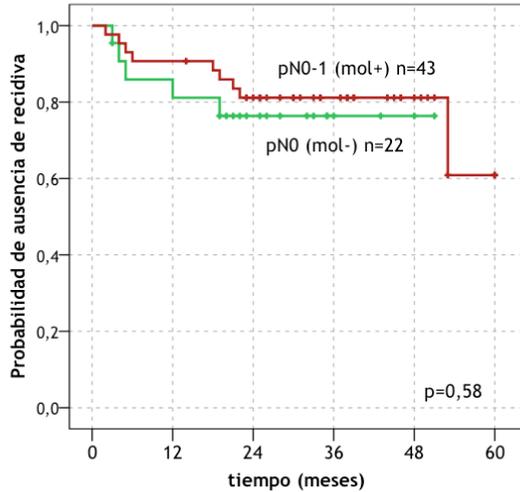


Expresión de FRS2, MYCN, SHH y SOX17 en ganglio normal, en pulmón normal y en tumor.

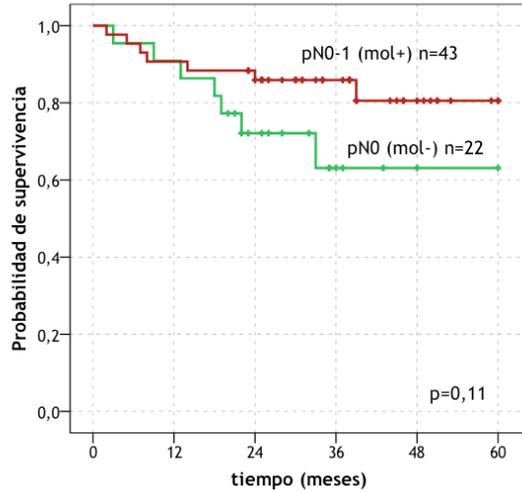
CEA-CEACAM5

Concentración relativa

TLE TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (CEACAM5)



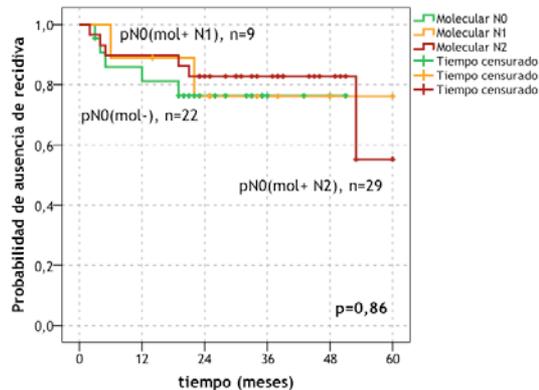
OS TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (CEACAM5)



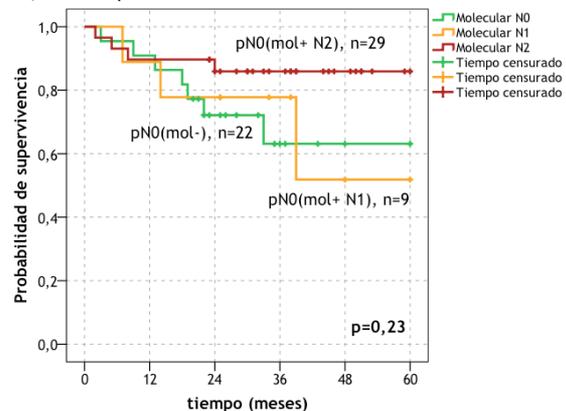
CEACAM5	TLE					OS					
	pN0-1	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
Molecular -		41	4	81%	76%	-	44,8	4,7	91%	63%	63%
Molecular +		49,6	3,1	91%	81%	61%	51,8	2,8	91%	86%	81%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global tras la restadificación ganglionar mediante CEACAM5 (pacientes, n=65), distribuidos en dos estratos: molecular negativo y molecular positivo. No se incluyen los pacientes pN1 molecular N1 dado que son molecular positivo pero no restadifican. 1: meses.

TLE, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE CEA-B2M

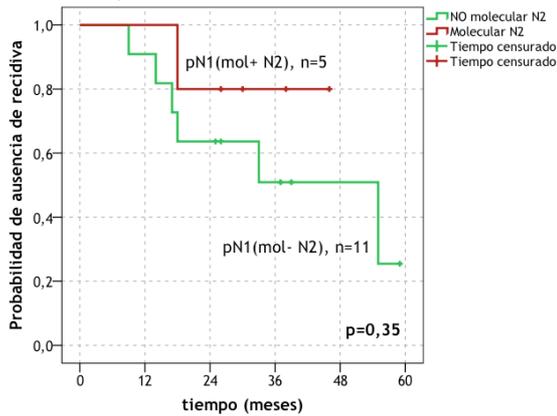


OS, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE CEA-B2M

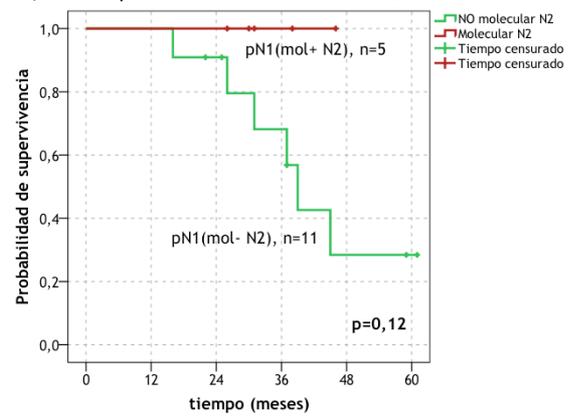


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes pN0 tras la restadificación ganglionar mediante CEACAM5.

TLE, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE CEA-B2M



OS, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE CEA-B2M

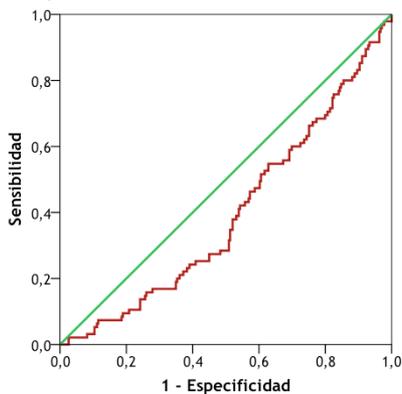


CEACAM5-β2M	TLE					OS					
	pN0	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
Molecular N0		41	4	81%	76%	76%	44,8	4,7	91%	63%	63%
Molecular N1		49,2	6,8	89%	76%	76%	43,6	7,4	89%	78%	52%
Molecular N2		49,5	3,7	90%	83%	55%	53	3,3	90%	86%	86%
pN1	TLE					OS					
Molecular N0-1		38,5	6,2	91%	51%	-	41,4	4,9	100%	68%	28%
Molecular N2		40,4	5	100%	80%	-	-	-	100%	100%	-

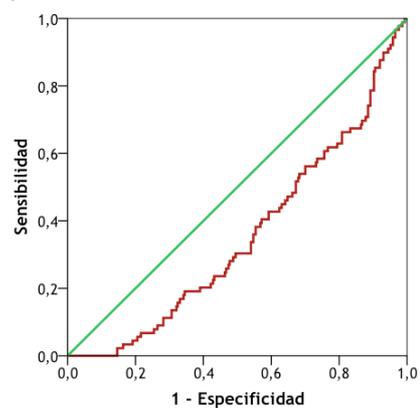
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global tras la restadificación ganglionar mediante CEACAM5 de los pacientes pN0 y pN1 por separado. 1: meses.

Concentración absoluta

CURVA ROC, EXPRESIÓN GANGLIONAR DE CEACAM5 VS RECIDIVA



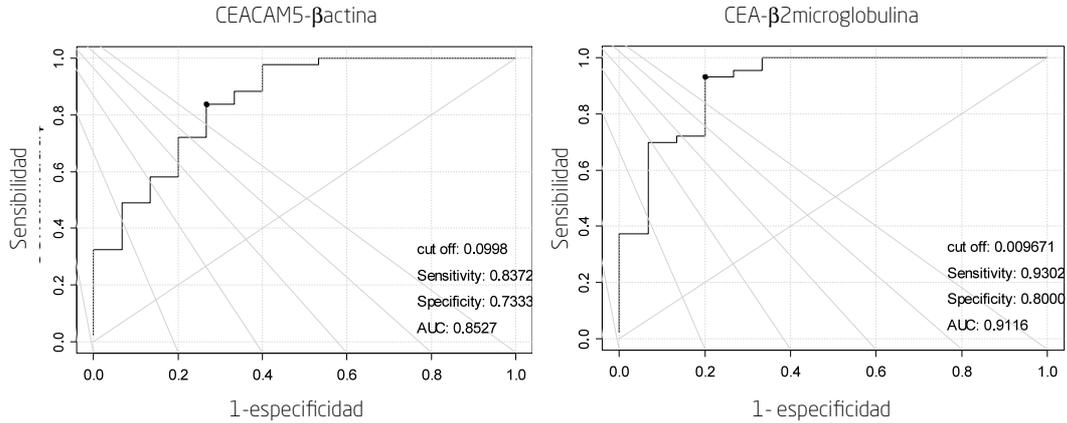
CURVA ROC, EXPRESIÓN GANGLIONAR DE CEACAM5 VS SUPERVIVENCIA



Curvas ROC entre la expresión ganglionar de CEACAM5 (n=376) y la recidiva o supervivencia, para detectar el nivel de expresión asociado a cambio pronóstico.

Restadificación con el punto de corte tumor/ganglio normal (CAN)

Éste se determinó utilizando como valores basales la concentración absoluta en ganglio torácico de pacientes sin neoplasia y como valores patológicos la serie tumoral de 42 muestras. Se realizaron las curvas ROC y se eligió el punto de mínima distancia ROC.

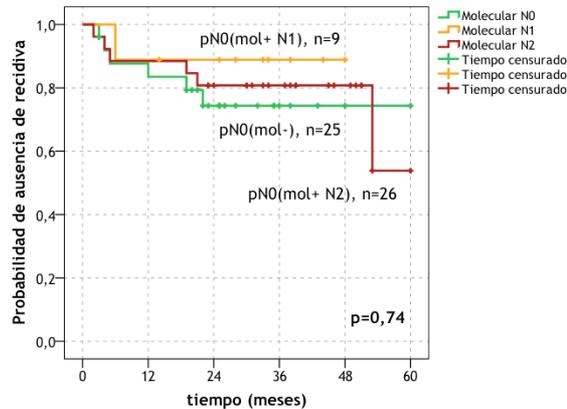


Curvas ROC entre la expresión tumoral y la expresión de ganglios de pacientes sin neoplasia, para el CEA-CAM5; se señala el punto de corte diagnóstico.

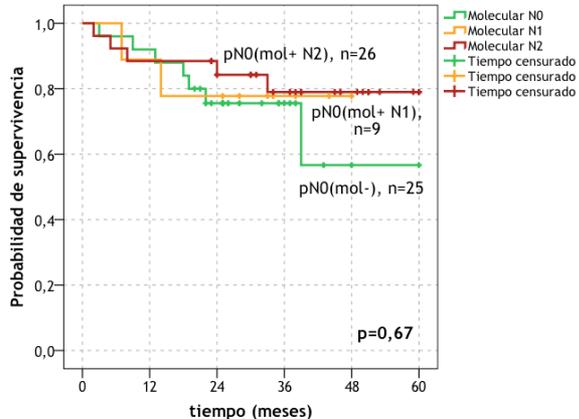
CEACAM5 Gen de referencia	Pacientes pN0(mol+)		Pacientes pN1(mol+ N2)	
	n	%	n	%
βactina	49	81,7	8	50%
β2microglobulina	35	58,3	4	25%

Pacientes que se restadificaron molecularmente mediante la concentración absoluta, es decir, pacientes con al menos un ganglio con el marcador por encima del punto de corte diagnóstico de CEACAM5.

TLE, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE CEA-β2M

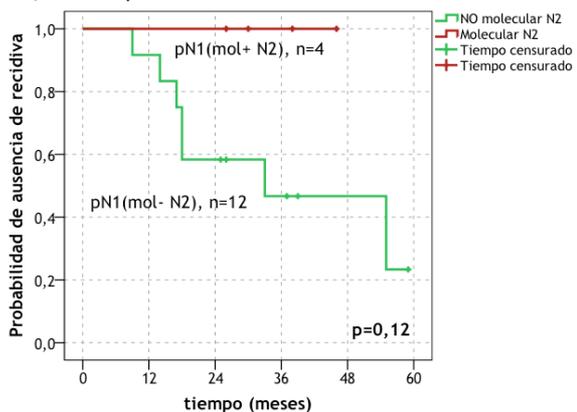


OS, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE CEA-β2M

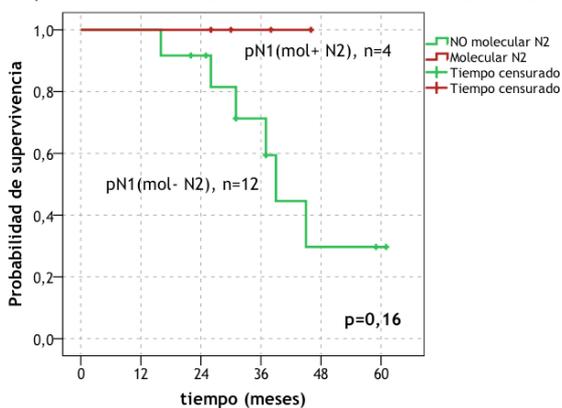


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes pN0 (n=60) tras la restadificación ganglionar molecular y anatómica mediante CEACAM5, utilizando la concentración absoluta normalizada.

TLE, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR CEA-β2M



OS, GRUPO C SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE CEA-β2M



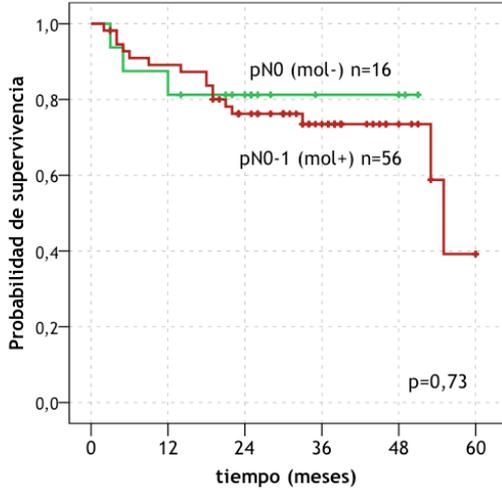
CEACAM5-β2M	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
pN0										
Molecular N0	47,5	4,5	84%	74%	74%	44,8	5	92%	76%	57%
Molecular N1	43,3	4,4	89%	89%	-	39,7	5,2	89%	78%	-
Molecular N2	48,5	4	89%	81%	54%	50,7	3,8	89%	79%	79%
pN1										
Molecular N0-1	36,8	5,9	92%	47%	23%	42,1	4,8	100%	71%	30%
Molecular N2	-	-	100%	100%	-	-	-	100%	100%	

Tiempo libre de enfermedad de los pacientes pN0 (n=60) y pN1 (n=16) tras la restadificación ganglionar molecular y anatómica mediante CEACAM5, utilizando la concentración absoluta normalizada. 1: meses.

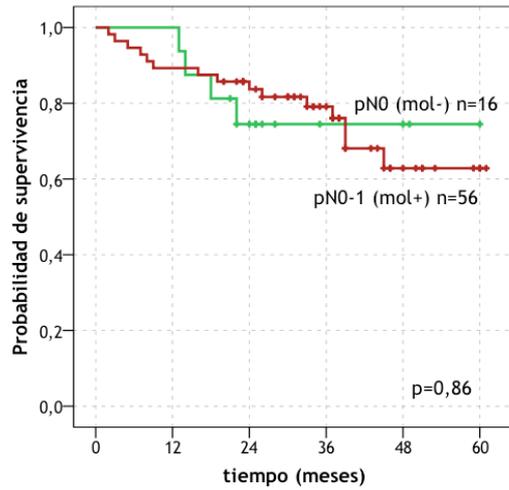
FGFR2b

Concentración relativa

TLE TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (FGFR2b)



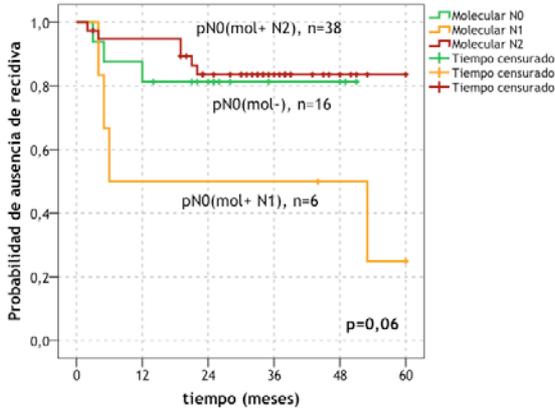
OS TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (FGFR2b)



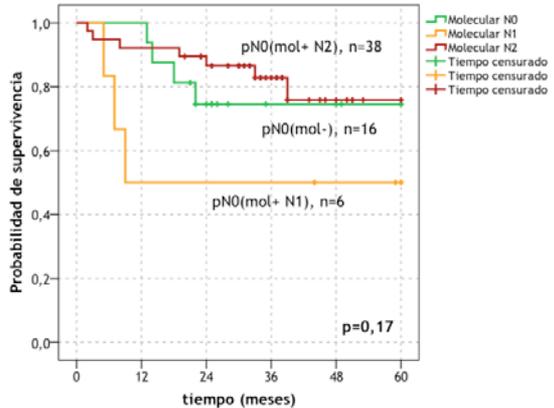
FGFR2b	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
Molecular -	42,7	4,3	81%	81%	-	49	4,8	100%	75%	75%
Molecular +	46	2,9	89%	74%	39%	48	2,8	89%	79%	63%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global tras la restadificación ganglionar mediante FGFR2b (pacientes, n=72), distribuidos en dos estratos: molecular negativo y molecular positivo. No se incluyen los pacientes pN1 molecular N1 dado que son molecular positivo pero no restadifican. 1: meses.

TLE, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE FGFR2b-BA

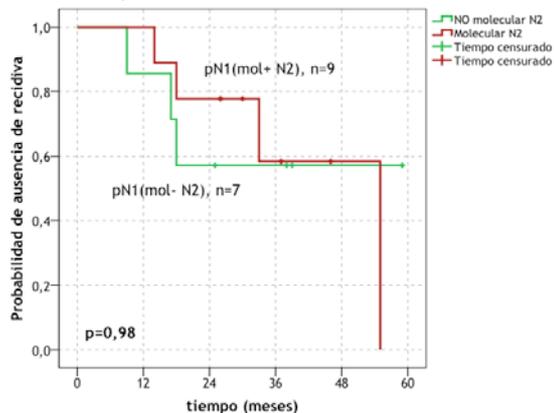


OS, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE FGFR2b-BA

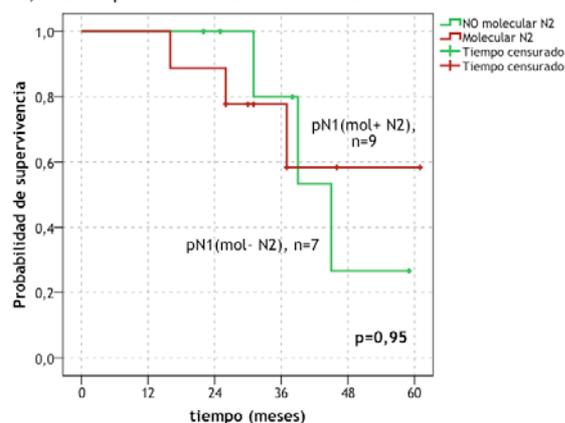


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes pN0 tras la restadificación ganglionar mediante FGFR2b.

TLE, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE FGFR2b-BA



OS, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE FGFR2b-BA

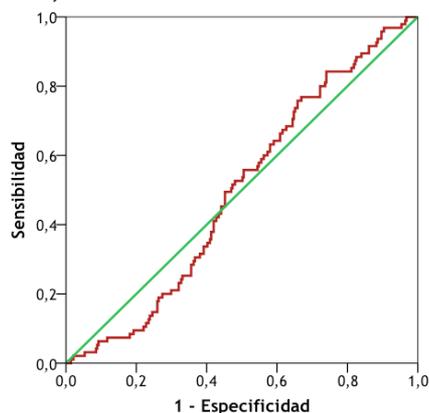


FGFR2b-βA	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
pN0										
Molecular N0	42,7	4,3	81%	81%	-	49	4,8	100%	75%	75%
Molecular N1	30,7	10,6	50%	50%	25%	33,5	10,8	50%	50%	50%
Molecular N2	52,5	2,8	95%	84%	84%	51	3,1	92%	83%	76%
pN1										
Molecular N0-1	40	8,3	86%	57%	-	44,3	4,9	100%	80%	-
Molecular N2	42,1	6,9	100%	58%	-	47,4	6,3	100%	78%	58%

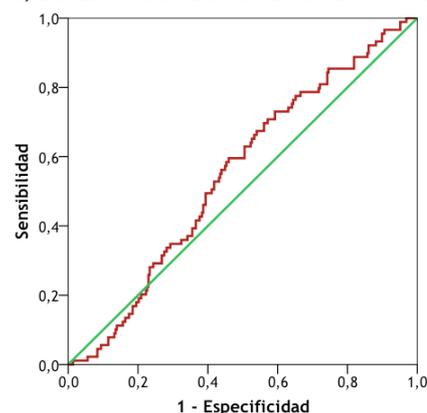
Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global tras la restadificación ganglionar mediante FGFR2b de los pacientes pN0 y pN1 por separado. 1: meses.

Concentración absoluta

CURVA ROC, EXPRESIÓN GANGLIONAR DE FGFR2b VS RECIDIVA



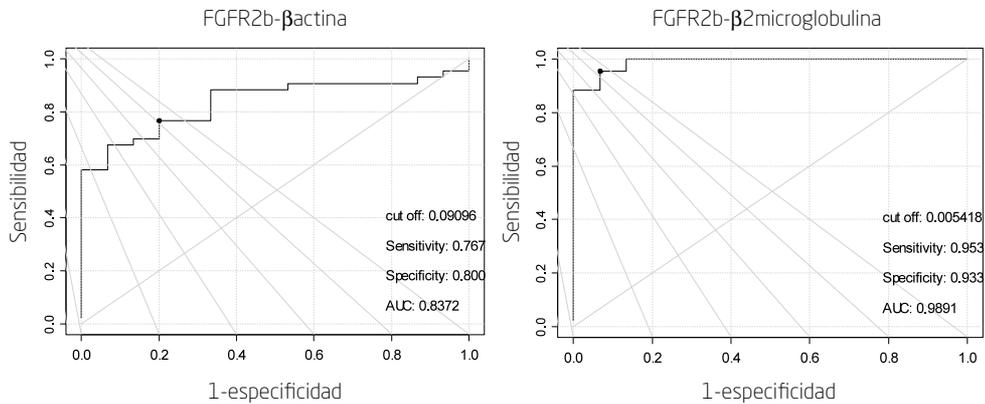
CURVA ROC, EXPRESIÓN GANGLIONAR DE FGFR2b VS SUPERVIVENCIA



Curvas ROC entre la expresión ganglionar (n=376) de FGFR2b y la recidiva o supervivencia, para detectar el nivel de expresión asociado a cambio pronóstico.

Restadificación con el punto de corte tumor/ganglio normal (CAN)

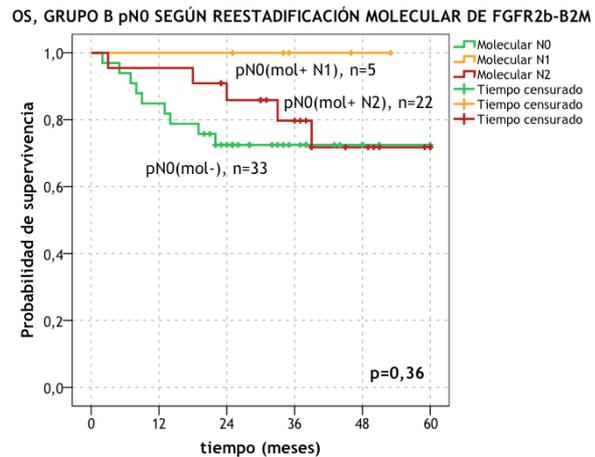
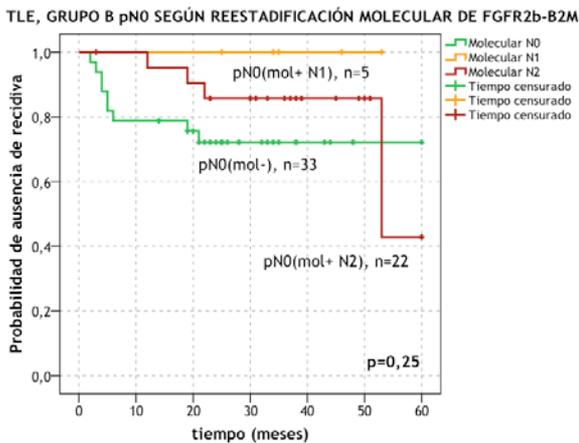
Se determinó el punto de corte diagnóstico con la misma metodología utilizada para el CEACAM5.



Curvas ROC entre la expresión tumoral y la expresión de ganglios de pacientes sin neoplasia, para el FGFR2b; se señala el punto de corte diagnóstico.

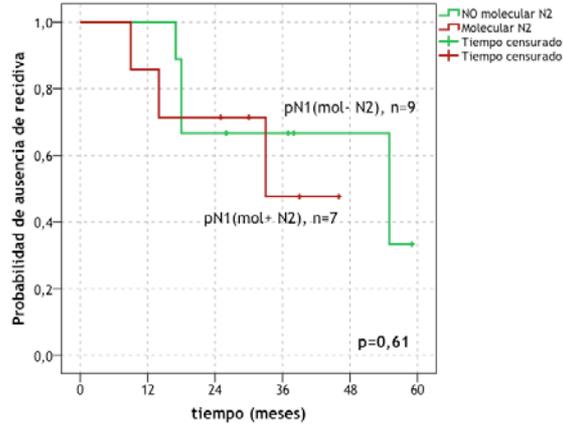
FGFR2b Gen de referencia	Pacientes pN0(mol+)		Pacientes pN1(mol+ N2)	
	n	%	n	%
βactina	30	50%	5	31,2%
β2microglobulina	27	45%	6	37,5%

Pacientes que se restadificaron molecularmente mediante la concentración absoluta, es decir, pacientes con al menos un ganglio con el marcador por encima del punto de corte diagnóstico de FGFR2b.

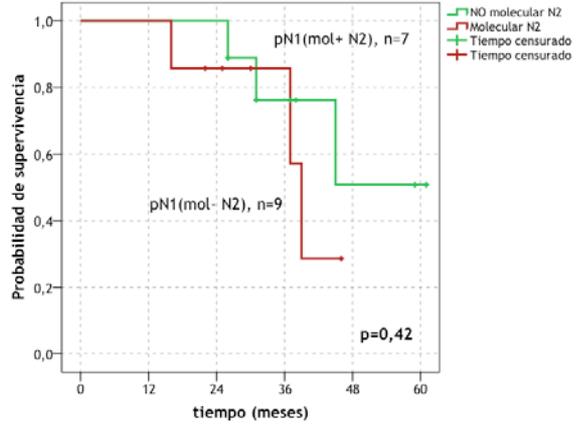


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes pN0 (n=60) tras la restadificación molecular y anatómica mediante FGFR2b, utilizando la concentración absoluta normalizada.

TLE, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE FGFR2b-B2M



OS, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE FGFR2b-B2M



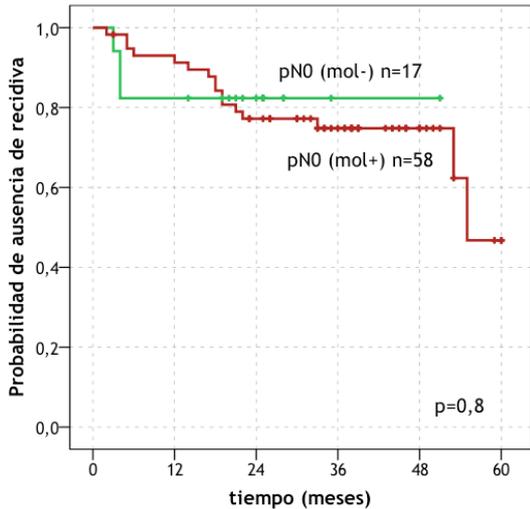
FGFR2b-β2M	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
pN0										
Molecular N0	-	-	79%	72%	72%	-	-	85%	73%	73%
Molecular N1	-	-	100%	100%	-	-	-	100%	100%	-
Molecular N2	-	-	95%	86%	43%	-	-	96%	80%	72%
pN1										
Molecular N0-1	43,9	6,2	100%	67%	-	49,2	5,2	100%	76%	51%
Molecular N2	33	5,8	86%	48%	-	37,1	3,8	100%	86%	-

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia de los pacientes pN0 (n=60) y pN1 (n=16) tras la restadificación molecular y anatómica mediante FGFR2b, utilizando la concentración absoluta normalizada. 1: meses.

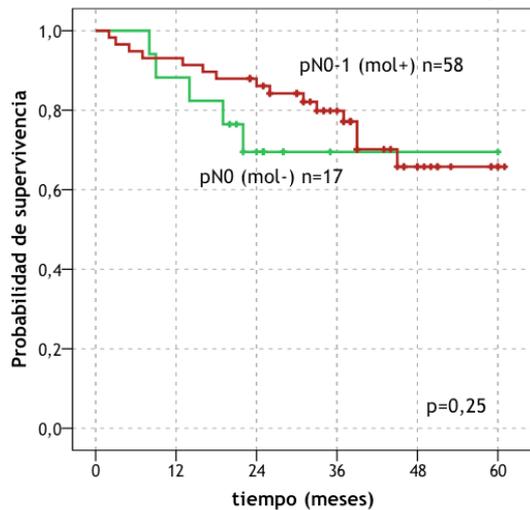
SHP2

Concentración relativa

TLE TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (SHP2)



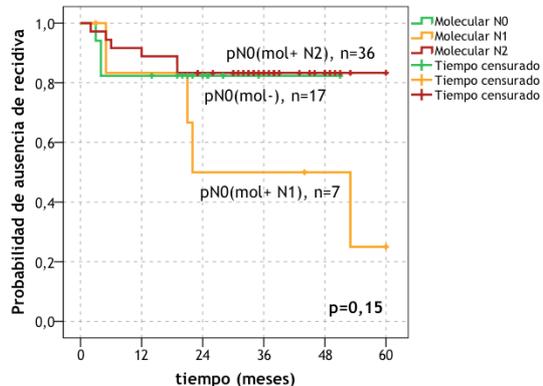
OS TRAS LA RESTADIFICACIÓN GANGLIONAR (SHP2)



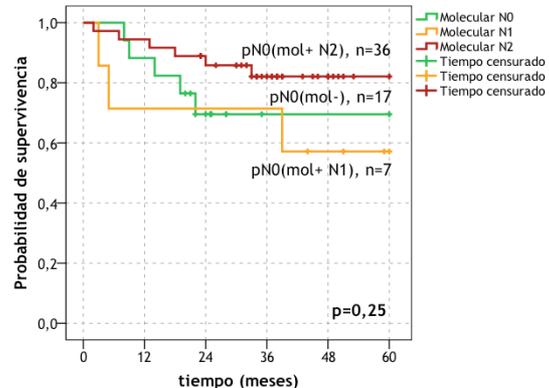
SHP2	TLE					OS					
	pN0-1	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
Molecular -		42,6	4,4	82%	82%	-	46,2	5,2	88%	70%	70%
Molecular +		47,1	2,7	91%	75%	47%	49,3	2,6	93%	80%	66%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global tras la restadificación ganglionar mediante SHP2 (pacientes, n=75), distribuidos en dos estratos: molecular negativo y molecular positivo. 1: meses.

TLE, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE Shp2-BA

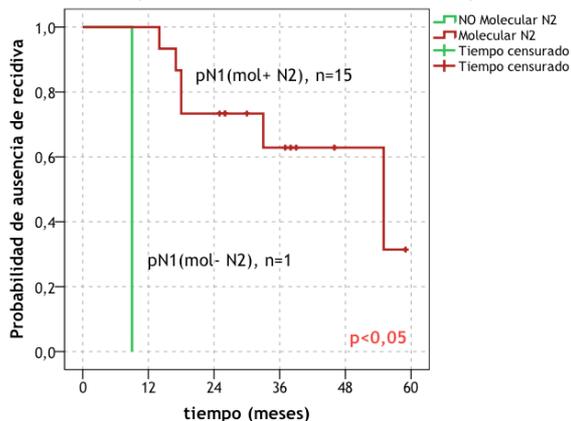


OS, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE Shp2-BA

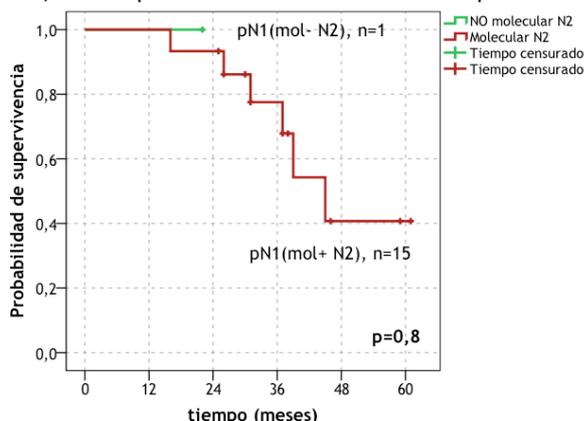


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes pN0 tras la restadificación ganglionar mediante SHP2.

TLE, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE Shp2



OS, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN SE DE Shp2

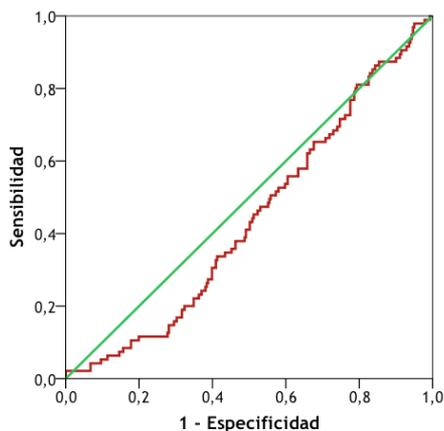


SHP2-βA	TLE					OS				
	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
pN0										
Molecular N0	42,6	4,4	82%	82%	-	46,2	5,2	88%	70%	70%
Molecular N1	36,2	8,7	83%	50%	25%	41	9,2	71%	57%	57%
Molecular N2	51,8	3,1	89%	83%	83%	52,3	2,9	94%	82%	82%
pN1										
Molecular N0-1	9	0	0%	0%	0%	-	-	100%	-	-
Molecular N2	43,7	4,9	100%	63%	31%	45,4	4,5	100%	78%	41%

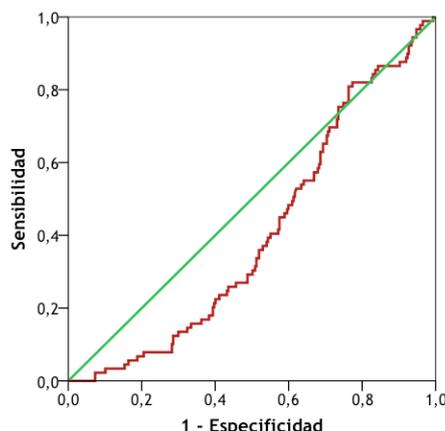
1: Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global tras la restadificación ganglionar mediante SHP2 de los pacientes pN0 y pN1 por separado. 1: meses.

Concentración absoluta

CURVA ROC, EXPRESIÓN GANGLIONAR DE SHP2 VS RECIDIVA



CURVA ROC, EXPRESIÓN GANGLIONAR DE SHP2 VS SUPERVIVENCIA

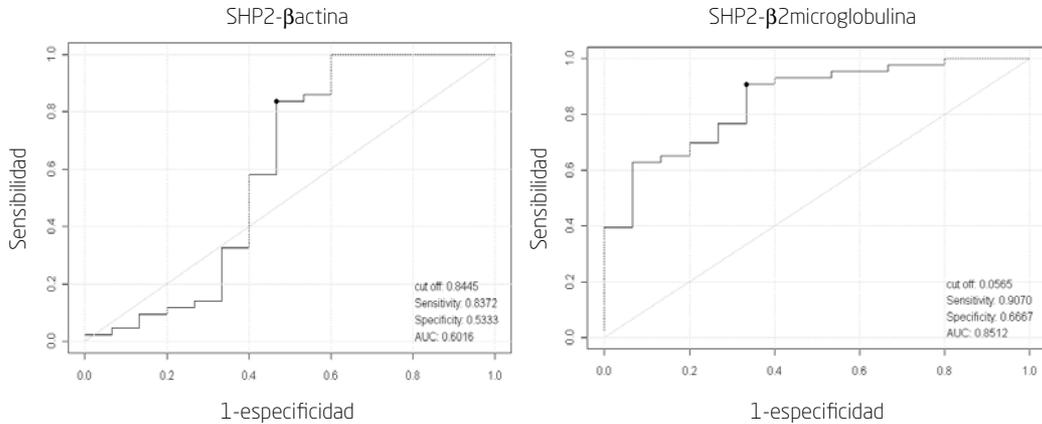


Los segmentos diagonales son producidos por los empates

Curvas ROC entre la expresión ganglionar (n=376) de SHP2 y la recidiva o supervivencia, para detectar el nivel de expresión asociado a cambio pronóstico.

Restadificación con el punto de corte tumor/ganglio normal (CAN)

Se determinó el punto de corte diagnóstico con la misma metodología utilizada.



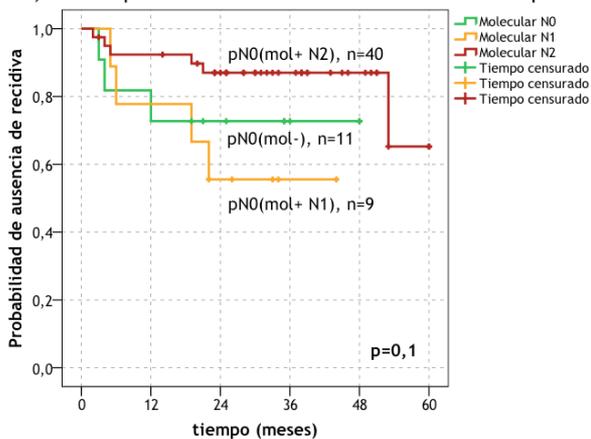
Curvas ROC entre la expresión tumoral y la expresión de ganglios de pacientes sin neoplasia, para el SHP2; se señala el punto de corte diagnóstico.

El AUC de la SHP2-βA fue de 0,60 (IC 95% 0,38-0,82); dado que no es superior a 0,50 incluyendo los intervalos de confianza, hace que no sea un marcador adecuado. El AUC de SHP2-β2M fue de 0,85 (0,74-0,96), por tanto, es un marcador valioso para diferenciar entre ganglio normal y ganglio tumoral.

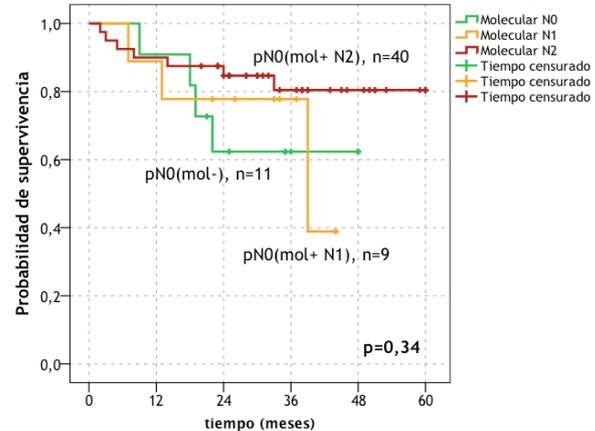
SHP2 Gen de referencia	Pacientes pN0(mol+)		Pacientes pN1(mol+ N2)	
	n	%	n	%
β2microglobulina	49	82%	11	69%

Pacientes que se restadificaron molecularmente mediante la concentración absoluta, es decir, pacientes con al menos un ganglio con el marcador por encima del punto de corte diagnóstico de SHP2.

TLE, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE Shp2-B2M

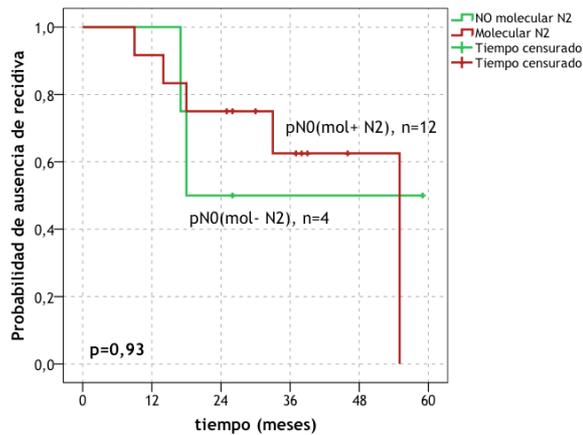


OS, GRUPO B pN0 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE Shp2-B2M

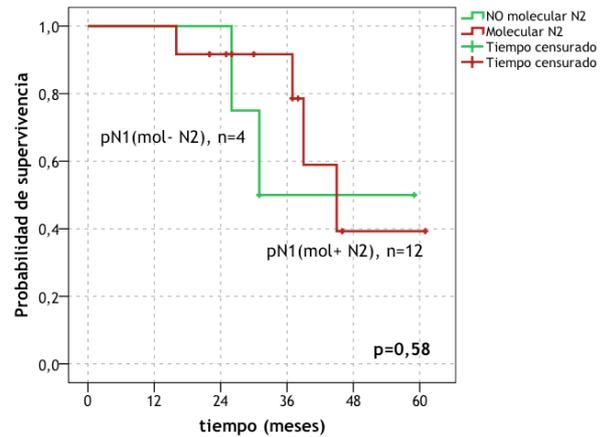


Tiempo libre de enfermedad y supervivencia global de los pacientes pN0 (n=60) en función de la restadificación molecular y anatómica mediante SHP2, utilizando la concentración absoluta normalizada.

TLE, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE Shp2-B2M



OS, GRUPO C pN1 SEGÚN REESTADIFICACIÓN MOLECULAR DE Shp2-B2M



SHP2-βA	TLE					OS					
	pN0	Media ¹	SD ¹	1 a	3 a	5 a	Media	SD	1 a	3 a	5 a
Molecular N0		36,6	5,6	73%	73%	-	36,4	4,7	91%	62%	-
Molecular N1		30,2	5,4	78%	56%	-	34,5	4,6	89%	78%	-
Molecular N2		52	2,9	92%	87%	65%	51,1	3,1	90%	80%	80%
pN1	TLE					OS					
Molecular N0-1		38,3	10,4	100%	50%	50%	43,8	7,7	100%	50%	50%
Molecular N2		41,9	6	92%	63%	0%	46,6	5	100%	92%	39%

Tiempo libre de enfermedad y supervivencia de los pacientes pN0 (n=60) y pN1 en función de la restadificación molecular y anatómica mediante SHP2, utilizando la concentración absoluta normalizada. 1: meses.

