

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
COLINA-QUINASA COMO FACTOR
PRONÓSTICO EN EL CARCINOMA NO
MICROCÍTICO DE PULMÓN**

Jorge Barriuso Feijóo

Madrid, 2007

UAM UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina
Departamento de Medicina

D. Cristóbal Belda Iniesta, Doctor en Medicina y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, D. Javier de Castro Carpeño, Doctor en Medicina y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Dña. Ana Ramírez de Molina, Doctora en Bioquímica y Biología Molecular e Investigadora Contratada del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Certifican:

Que D. Jorge Barriuso Feijóo ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo titulado **“EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COLINA-QUINASA COMO FACTOR PRONÓSTICO EN EL CARCINOMA NO MICROCÍTICO DE PULMÓN”**, para optar al título de doctor en Medicina. Dicho trabajo reúne a nuestro juicio las condiciones de originalidad y rigor necesarios y, por lo tanto, avalamos su presentación para ser juzgado.

Para que conste, firmamos el presente certificado en Madrid a cinco de Marzo de dos mil siete

Dr. Cristóbal Belda Iniesta

Dra. Ana Ramírez de Molina

Dr. Javier de Castro Carpeño

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor Manuel González Barón por su estímulo constante para crecer como médico e investigador.

Al Profesor Juan Carlos Lacal por su implicación en la colaboración entre los investigadores básicos y clínicos.

Al Dr. Cristóbal Belda Iniesta, por su gran apoyo y dedicación durante todo el desarrollo de este proyecto. Y por todos esos pequeños y grandes consejos tan necesarios.

Al Dr. Javier de Castro Carpeño, por su inestimable colaboración durante todo el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ana Ramírez de Molina, por su gran ayuda en la realización y valoración de la parte de investigación básica de este trabajo.

Al Profesor Manuel Nistal, por su amable y rigurosa aportación en el terreno de la inmunohistoquímica.

A todos los componentes del Servicio de Oncología Médica con los que todos los días tengo la oportunidad de trabajar.

A mis padres y mi hermano, por todo el apoyo que siempre me dan y sin cuyos consejos no creo que hubiera llegado al final de este camino.

A Ana, por estar siempre a mi lado, animándome.

Índice

1. Índice de figuras.....	5
2. Índice de tablas.....	6
3. Introducción.....	7
3.1 Epidemiología.....	8
3.2 Factores de riesgo.....	9
3.3 Anatomía Patológica.....	13
3.4 Aproximación general al tratamiento. Pronóstico.....	16
3.5 Marcadores moleculares pronósticos en cáncer de pulmón...18	
3.5.1 Proto-oncogenes.....	19
3.5.2 Genes supresores de tumores.....	23
3.5.3 Rutas relacionadas con invasión tumoral.....	27
3.5.4 Angiogénesis.....	29
3.6 Perfiles derivados de estudios con tecnologías de alto rendimiento.....	29
3.7 Colina-quinasa.....	37
4. Hipótesis y objetivos.....	44
5. Material y métodos.....	48
6. Resultados.....	62
7. Discusión.....	94
8. Resumen.....	114
9. Conclusiones.....	118
10. Apéndice.....	121
11. Bibliografía.....	129
12. Glosario.....	159

Índice de figuras:

Figura 1. Modulación del metabolismo de PC por proteínas Ras.....	39
Figura 2. Señalización de la vía de ras a través de ral-GDS.....	43
Figura 3. Kaplan-Meier THP vs sexo.....	70
Figura 4. Kaplan-Meier SG vs sexo.....	71
Figura 5. Kaplan-Meier THP vs estadio.....	72
Figura 6. Kaplan-Meier SG vs estadio.....	73
Figura 7. Kaplan-Meier THP vs histología.....	74
Figura 8. Kaplan-Meier SG vs histología.....	75
Figura 9. Kaplan-Meier SLE vs sexo.....	76
Figura 10. Kaplan-Meier SG vs sexo.....	77
Figura 11. Kaplan-Meier SLE vs estadio.....	78
Figura 12. Kaplan-Meier SG vs estadio.....	79
Figura 13. Kaplan-Meier SLE vs histología.....	80
Figura 14. Kaplan-Meier SG vs histología.....	81
Figura 15. Kaplan-Meier SLE vs Chok α	84
Figura 16. Kaplan-Meier SG vs Chok α	85
Figura 17. Inmunohistoquímica de un anticuerpo frente a Chok de un caso de carcinoma epidermoide.....	92
Figura 18. Inmunohistoquímica con un anticuerpo frente a Chok de un adenocarcinoma.....	93
Figura 19. RT-PCR cuantitativa.....	127
Figura 20. RT-PCR cuantitativa.....	128

Índice de tablas:

Tabla 1. Definiciones TNM.....	57
Tabla 2. Definiciones estadios.....	58
Tabla 3. Características basales de los casos de CPCNP precoz.....	64
Tabla 4. Características basales de los casos de CPCNP diseminado.....	65
Tabla 5. Contingencia Choka vs Sexo.....	87
Tabla 6. Contingencia Choka vs Estadio.....	88
Tabla 7. Contingencia Choka vs Histología.....	89

3. Introducción.

3.1 Epidemiología.

El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte por cáncer a escala mundial(1-4). Además el número de casos y de muertes por cáncer de pulmón ha estado aumentando año tras año durante más de la mitad del siglo pasado, provocando más de 600.000 muertes en 1995. Se prevé que este número continúe incrementándose durante las primeras décadas del presente siglo (4;5). En España, se diagnostican 18.500 nuevos casos al año y ha sido responsable de 17.308 muertes en el año 2000(6). Esto supone una prevalencia aproximada de 24.000 casos/año, lo cual refleja la altísima letalidad de este tumor. Así, menos del 15% de los pacientes logran sobrevivir cinco años tras el diagnóstico.

Las neoplasias broncogénicas afectan con mayor frecuencia a varones, siendo la proporción actual en Europa de 4.5:1. En España esta proporción es de 11:1, asociado principalmente al retraso en la adquisición del hábito tabáquico y el menor riesgo laboral de las mujeres españolas. La marcada variabilidad geográfica y temporal del cáncer de pulmón refleja la distribución de sus factores de riesgo, principalmente el consumo de tabaco, que constituye el agente etiológico más importante. En el conjunto de países europeos, durante los años 70, España ocupaba uno de los últimos lugares en cuanto a la frecuencia de este tumor en el hombre, mientras que los países del norte y centro de Europa partían de tasas más elevadas. Dentro de nuestro país, la mortalidad muestra una mayor heterogeneidad en hombres que en mujeres. Las tasas más altas en los hombres se concentran en el suroeste (Cádiz y Sevilla) y en algunas provincias del norte

(Asturias y Vizcaya) mientras que llama la atención la alta mortalidad en las mujeres de Las Palmas. Un análisis pormenorizado de la evolución de la mortalidad por cáncer de pulmón en España muestra que el ritmo de incremento se ralentiza a partir de 1988, y en 1994 comienza a descender un 0,35% anual. En algunas regiones, como Aragón, Castilla-León, Murcia, Navarra y la Rioja, el ascenso no se ha interrumpido, mientras que destaca el fuerte descenso observado en el País Vasco (un 2% anual) a partir de 1995. En mujeres, la mortalidad aumenta en España a un ritmo del 2,4% anual desde 1990, afectando principalmente en las Comunidades Autónoma de Aragón, Castilla-León, País Vasco y el País Valenciano. En resumen, el número de casos y de muertes se incrementó año tras año durante más de la mitad del siglo pasado (5), lo que supone un problema de salud pública de primer orden.

3.2 Factores de riesgo.

Tabaquismo.

Se ha estimado que el tabaco contribuye a la aparición del 80-90% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y del 55%-80% de los casos en las mujeres. Además, la exposición ocupacional a diferentes sustancias - como el arsénico, el asbesto, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc.-, explicaría el 18% de los casos en hombres y menos del 1% en las mujeres. Otros factores de riesgo reconocidos son las radiaciones ionizantes, la contaminación atmosférica y la menor ingesta de vegetales y frutas frescas, probablemente reflejando el efecto de los agentes antioxidantes contenidos en estos alimentos(6).

La posibilidad de que el consumo de tabaco fuera una de las principales causas de cáncer de pulmón fue sugerida por primera vez por Adler en 1912(7). La primera publicación que asociaba el tabaquismo con un aumento del riesgo de muerte prematura data de 1938(8). Sin embargo no fue hasta 1950, cuando Doll y Hill demostraron claramente una asociación epidemiológica entre fumar y la mortalidad por cáncer de pulmón(8-11). Esta observación fue confirmada poco después por los trabajos de Wynder y Graham(12;13).

La evidencia de la relación entre el tabaco y el cáncer de pulmón está soportada por un gran volumen de trabajos de investigación epidemiológica, tanto prospectiva como retrospectiva. Unos criterios bien establecidos basados en la evidencia observacional han servido para atribuir causalidad a dicha asociación (14). Aplicando los criterios seleccionados de: consistencia, fuerza, especificidad, relación temporal y coherencia, al gran número de datos recogidos en los estudios observacionales, en 1964 la dirección del Sistema Nacional de Salud de los Estados Unidos afirmó: “fumar es la principal causa de cáncer de pulmón”(15).

La plausibilidad biológica subyacente a la relación entre el tabaquismo y el cáncer de pulmón era hasta hace poco indirecta. Actualmente, varios trabajos de investigación básica han relacionado al benzopireno, un constituyente del humo del tabaco, con el daño en 3 lugares específicos del gen supresor de tumores p53, gen alterado en el 60% de los casos de cáncer de pulmón primario(16). Algunos hidrocarburos policíclicos son capaces de ocasionar otras mutaciones en distintos genes (17).

Por otro lado, la exposición ambiental al tabaco también es causa de un aumento del riesgo de desarrollar una neoplasia pulmonar (18-20). Parece que este riesgo está asociado a una susceptibilidad individual. Se estima que un 17% de los tumores en no fumadores están en relación a la exposición ambiental al tabaco durante la infancia y adolescencia.

Carcinógenos medioambientales.

Los carcinógenos medioambientales más conocidos son el asbesto y el radón, aunque se han descrito otros como: el arsénico, el cromo, el formaldehído, la radiación ionizante, hidrocarburos aromáticos, etc(21-27). Muchos de estos agentes actúan sinérgicamente con el tabaco.

Aunque algunos investigadores dudan de la relación causal entre el asbesto y el cáncer de pulmón (28), la mayoría de los estudios han demostrado una clara asociación entre las dos entidades. Así, el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón se multiplica si se suma la exposición al asbesto con el hábito tabáquico. Un estudio de cohortes holandés estableció un riesgo relativo de 3,5 después de ser ajustado por edad y consumo de tabaco (29-31). Para un mismo nivel de exposición, parece que el riesgo es considerablemente mayor para los trabajadores expuestos a los anfíboles frente a otras fibras (32).

El radón es un producto gaseoso de degradación emitido por el uranio-238 y el radio-226, que es capaz de dañar el epitelio respiratorio a través de la emisión de partículas alfa. En los trabajadores de las minas de uranio se ha observado un aumento del riesgo de carcinoma broncogénico. En un estudio europeo se sugiere

que el radón puede ser responsable del 2% de las muertes por cáncer de pulmón en Europa(33).

Factores de riesgo familiar.

El papel de la herencia en el cáncer de pulmón está menos establecido aunque algunos estudios sugieren que los familiares en primer grado tienen entre 1,5 y 5 veces más riesgo de desarrollar esta neoplasia(34-41).

Factores de la dieta.

Las dietas con dosis bajas de vitaminas antioxidantes, sobretodo derivados de la vitamina A y E, se asocian al desarrollo de cáncer de pulmón(42;43). Debido a la multitud de datos contradictorios en cuanto al posible papel de estos derivados en prevención secundaria o primaria, la utilización de estos todavía no ha sido resuelta.

Enfermedad pulmonar benigna preexistente.

Diversas patologías benignas se han asociado al desarrollo de CPCNP, por ejemplo: Los pacientes con fibrosis pulmonar difusa tienen un incremento del riesgo frente a la población sana de 8 a 14 veces(44) y los pacientes con Bronconeumopatía Crónica Obstructiva (BNCO) tienen un riesgo: 8,8 frente a 2% de riesgo acumulado a los 10 años (45).

Los trabajadores expuestos al asbesto que desarrollan fibrosis intersticial por este motivo tienen un mayor riesgo frente a los que no desarrollan esta enfermedad(30).

En resumen, la principal causa evitable del cáncer de pulmón es el tabaquismo, por lo que hay que resaltar la necesidad de incrementar las medidas de prevención, apoyando las políticas anti-tabaco activas que actualmente están siendo instauradas en la mayoría de los países occidentales.

3.3 Anatomía patológica.

La clasificación histológica vigente fue desarrollada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1981(46). Los cuatro subtipos de cáncer de pulmón, que representan un 95% de los casos, son los siguientes: Carcinoma epidermoide (20-30%), adenocarcinoma (30-40%), carcinoma de célula grande (10%) y carcinoma de célula pequeña (20%). Las incidencias reflejan las diferentes poblaciones estudiadas (autopsia o material quirúrgico) y los diferentes criterios de los distintos patólogos. Además, puede haber mezcla de patrón histológico incluso en el mismo tumor(47).

Desde el punto de vista histogenético lo más probable es que todas las variantes de carcinoma broncogénico, así como del carcinoide bronquial, deriven del endodermo, un punto de vista que concuerda con la frecuencia de los tumores con patrón mixto(47).

Los carcinomas broncogénicos se presentan preferentemente alrededor del hilio pulmonar. Aproximadamente las tres cuartas partes se originan en bronquios de primero, segundo o tercer orden. Un pequeño porcentaje tienen un origen más periférico, pero no suelen llegar a originarse en áreas muy alejadas, por ejemplo, junto a la pleura. Un número reducido de carcinomas de pulmón se originan en la

periferia del parénquima pulmonar, en las células septales alveolares o en bronquiolos terminales. Estos son predominantemente adenocarcinomas, entre los que se incluyen los de tipo bronquioloalveolar.

En su desarrollo, el carcinoma pulmonar comienza como un área de atipia citológica in situ, que, durante un periodo de tiempo no conocido, produce una zona de engrosamiento de la mucosa bronquial. Al progresar este pequeño foco, generalmente de menos de 1 cm de diámetro, adquiere el aspecto de una excrecencia verrucosa que eleva y erosiona el revestimiento epitelial. A partir de aquí puede seguir uno de los siguientes patrones. Puede continuar hacia la luz bronquial, produciendo una masa intraluminal. Otras veces penetra rápidamente la pared bronquial e infiltra el tejido peribronquial hacia la carina o mediastino. En otros casos crece en un frente amplio produciendo una masa intraparenquimatosa en forma de coliflor que desplaza el tejido pulmonar adyacente.

La frecuencia de la afectación ganglionar varía ligeramente según el patrón histológico, pero oscila alrededor del 50%.

La diseminación a distancia se produce a través de la vía linfática y hematógena. Estos tumores tienen una fatal tendencia a diseminarse por todo el organismo desde estadios precoces. Con frecuencia las metástasis son la primera manifestación de la lesión broncogénica oculta. Ningún órgano o tejido está exento de la infiltración, pero, por razones aún no esclarecidas, las suprarrenales se afectan en más del 50% de los casos. Otras localizaciones preferentes son: el hígado 30-50%, el SNC 20% y el hueso 20%.

Carcinoma de células escamosas (epidermoide). Este es el tipo que presenta una relación más estrecha con el tabaco. Las características microscópicas son fácilmente identificadas en las formas bien diferenciadas en las que existen producción de queratina y la presencia de puentes intercelulares, pero hay formas menos diferenciadas difíciles de distinguir del carcinoma de células grandes indiferenciado. Este tumor tiende a extenderse localmente y a metastatizar algo más tarde que los otros subtipos, pero su velocidad de crecimiento local suele ser más rápida que en los demás. A veces se encuentra metaplasia escamosa, displasia epitelial y focos de carcinoma in situ adyacentes a la lesión.

Adenocarcinoma. Las clasificaciones histológicas de los adenocarcinomas incluyen al menos dos tipos: adenocarcinoma “habitual” de origen bronquial, y el tipo denominado bronquioloalveolar.

Las lesiones del adenocarcinoma “habitual” suelen ser periféricas, tienden a ser más pequeñas y varían histológicamente desde los tumores más diferenciados, con obvios elementos glandulares y lesiones papilares semejantes a adenocarcinomas de otra localización, a masas sólidas que solo ocasionalmente muestran glándulas y células secretoras de moco. Alrededor del 80% contienen mucina. Los adenocarcinomas crecen más lentamente que los epidermoides. A veces se asocian a áreas de cicatrización (“scar cancer”). En la mayoría de los casos la cicatriz es una respuesta desmoplásica al tumor(48), pero en ocasiones sin duda precede al mismo(49). Los adenocarcinomas se asocian a una historia de tabaquismo con menos frecuencia que los carcinomas epidermoides.

El carcinoma bronquioloalveolar está formado por células muy peculiares, columnares o cuboides altas, que tapizan los septos alveolares y se proyectan en los espacios alveolares, en numerosas formaciones papilares ramificadas. Las células tumorales con frecuencia contienen abundante mucina. En general son tumores bien diferenciados que tienden a respetar la estructura septal original. Ultraestructuralmente son un grupo heterogéneo, formados por células mucosecretoras bronquiales, células de clara, o raras veces neumocitos tipo II. Macroscópicamente casi siempre es un tumor periférico formado por un nódulo solitario o varios que coalescen produciendo una imagen neumónica. Al ser periférico no suele producir atelectasia y metastatizan en un 45% de los casos.

Carcinoma de células grandes. Estos carcinomas anaplásicos están formados por células más grandes y poligonales, con núcleos vesiculares. Probablemente identifican carcinomas epidermoides y adenocarcinomas tan indiferenciados que ya no pueden identificarse como tales.

3.4 Aproximación general al tratamiento. Pronóstico.

El sistema de estadificación en CPCNP viene descrito en el apartado de material y métodos en las tablas 1 y 2.

La última revisión del sistema de estadificación y su correlación pronóstica data de 1997. La distribución por estadios implica el concepto de ordenar los pacientes en distintos subgrupos que generalmente van a recibir tratamientos y van a tener tasas de supervivencia similares(50).

El 61% de los pacientes con el estadio clínico IA sobrevive a los 5 años de evolución, mientras que en las series recogidas con estadio IA patológico tienen una supervivencia del 67% a los 5 años. Respecto al estadio 1B la supervivencia basada en el estadio clínico es de un 38% frente a un 57% en caso de utilizar el estadio patológico(50;51). La resección quirúrgica es el tratamiento indicado en los CPCNP estadio I. En los casos de estadios IB y II además del tratamiento quirúrgico se ha establecido un nuevo estándar que indicaría la necesidad de tratamiento quimioterápico adyuvante(52).

La aparición de un estadio clínico IIA (cT1N1M0) es infrecuente y en general se produce una “migración” de estadio cuando nos basamos en los datos patológicos. La supervivencia de este subgrupo es del 34% para la clasificación clínica y 55% en la clasificación patológica en los casos de resección completa. Respecto al subgrupo IIB compuesto por los pacientes T2N1M0 y T3N0M0 la supervivencia en base a los datos clínicos es del 24 y 22% respectivamente y del 39 y 38% con los datos patológicos respectivamente(50;53).

En el subgrupo IIIA se incluyen los pacientes con enfermedades T3N1M0, T1N2M0, T2N2M0 y T3N2M0. Los pacientes en estadio clínico T3N1M0 tienen el peor pronóstico con una supervivencia del 9% a los 5 años frente al 13% de los pacientes N2. En este último grupo los pacientes cT2N2M0 son el 72%, los T3N2 el 22% y los T1N2 el 6%. Los pacientes con T1 tienen mejor pronóstico dentro de este grupo pero debido a su escaso número tienen poco peso en cuanto al pronóstico del grupo N2. Los estudios sobre pacientes intervenidos aportan una supervivencia para el T3N1M0 del 25% y para el resto del 23%(54). El estadio IIIA,

no suele ser susceptible de una aproximación terapéutica mediante cirugía. A menudo se plantea un abordaje multidisciplinar, generalmente dentro de un protocolo, que puede incluir resección quirúrgica tras tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia(55-57).

Dentro del estadio IIIB los pacientes con T4N0-1-2M0 tienen supervivencias prácticamente idénticas a los 5 años que están entre el 6 y 8%. Peor pronóstico tiene los N3 con una supervivencia a los 5 años del 3%(58). En el estadio IIIB se puede considerar estándar el tratamiento con quimiorradioterapia, aunque se debe individualizar según los casos(58).

Los pacientes con estadio IV tienen una supervivencia anecdótica del 1 % a los 5 años(50). El estadio IV se trata mediante quimioterapia, tan sólo si existe una afectación metastásica única se puede plantear la resección radical de la lesión primaria y de la lesión a distancia(59;60).

3.5 Marcadores moleculares pronósticos en cáncer de pulmón.

La aproximación tradicional a la evaluación pronóstica en el CPCNP, como en otros tumores sólidos del adulto, ha puesto énfasis en el estadio (TNM) de la enfermedad en el momento del diagnóstico. Otros factores que son generalmente incluidos son estado general del paciente, la pérdida de peso, la presencia o no de síntomas, el tamaño del tumor, el grado de diferenciación y el subtipo histológico. Sin embargo, durante la última década, los avances en el conocimiento de la

biología molecular del cáncer de pulmón han generado importante información sobre otros factores potencialmente determinantes de prognosis (61;62).

De esta manera, los genes críticos del cáncer se agrupan en dos grandes clases, en función de si el riesgo de cáncer se produce por un exceso de actividad de su producto génico (ganancia de función) o por su falta de actividad (pérdida de función). Los genes del primer tipo se denominan proto-oncogenes y el gen hiperactivo resultante debido a una mutación oncogén. Los genes del segundo tipo se llaman genes supresores de tumores(63).

3.5.1 Proto-oncogenes.

EGFR. El EGFR es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de 170 kDa cuyo dominio extracelular contiene dos zonas ricas en cisteína(64), un dominio catalítico y un extremo carboxi-terminal con ocho residuos de tirosina. Después de su interacción con el ligando EGF, la tirosinquinasa localizada en el dominio intracelular del receptor es activada produciéndose la autofosforilación del mismo lo que desencadena una cascada de señales que implica a ras, raf y las quinasas activadas por mitógenos (MAPK). El papel del EGFR en carcinogénesis fue demostrado inicialmente mediante la sobreexpresión del receptor en células de la línea de fibroblastos NIH3T3. Esta línea se utilizaba para generar xenoimplantes en ratones atímicos, demostrándose la formación de tumores tras estimulación con EGF(64). La sobreexpresión de este gen se ha correlacionado con CPCNP avanzado en algunos estudios (65-67), aunque de nuevo los resultados son controvertidos sin que exista ninguna publicación que se atreva a establecer la determinación del EGFR como superior al sistema TNM. En 1997 se analizó la

expresión de EGFR y TGF- α , encontrándose en el análisis multivariante solo correlación entre el estadio y el pronóstico (68). En un segundo estudio de 1997 tan solo la extensión tumoral demostró correlación con el pronóstico ($p=0,0008$ para la supervivencia y $p=0,0007$), mientras que ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos, entre los que se encontraba el EGFR demostraron correlación alguna(69). El tercero se trata de un estudio japonés en el que de nuevo no se halló relación con pronóstico(70). En 1998 se realizó el análisis mediante inmunohistoquímica sobre 121 pacientes observándose peor pronóstico en los que expresaban EGFR en el análisis univariante, pero no así en el multivariante(65). Posteriormente se publicó un estudio en el que la expresión de EGFR añadía una tendencia al peor pronóstico ($p=0,176$) aunque la coexpresión con el HER2 era un claro factor de peor pronóstico ($p=0,03$). Por último un estudio publicado en el 2003, analiza la expresión mediante inmunohistoquímica y FISH, encontrándose una tendencia negativa (no estadísticamente significativa) entre el número de copias por FISH y el pronóstico(67).

Recientemente, las mutaciones en el dominio tirosin-quinasa han adquirido un interés creciente, ya que tienen un papel en el desarrollo neoplásico y en la respuesta a fármacos inhibidores de la actividad tirosin-quinasa (TK) de este receptor. En mayo 2004, dos grupos demostraron la presencia de mutaciones somáticas en los exones 19 y 21, que corresponden al dominio TK, en la mayoría de los pacientes que responden a los inhibidores de la actividad TK del EGFR(71;72).

En resumen, la determinación del EGFR actualmente no es capaz de predecir pronóstico, a pesar de que la utilización de terapias dirigidas frente al dominio TK mutado parecen ser eficaces, en ese subgrupo de pacientes.

Proto-oncogen K-ras y expresión de p21ras. Los genes de la familia ras están expresados en la práctica totalidad de las células de los mamíferos. El interés y estudio de las proteínas ras aumentó tras el descubrimiento de mutaciones de protooncogenes ras en tumores humanos.

No se ha descrito ninguna diferencia funcional entre las tres proteínas ras (K-ras, H-ras y N-ras). En su forma activa, están unidas a través del residuo Cys186 a la cara interna de la membrana celular mediante un lípido isoprenoide, el radical farnesilo. Esta unión es catalizada por la enzima farnesil transferasa (FT). Como todas las proteínas G, la actividad de la proteína ras está reguladas por la unión e hidrólisis de nucleótidos de guanina. En ausencia de estimulación, la proteína Ras se encuentra inactiva en el citoplasma y unida al nucleótido difosfato de guanina o GDP. Esta proteína se activa cuando intercambia el GDP por GTP. Este paso está regulado por tres familias de proteínas distintas: los llamados factores intercambiadores de nucleótidos o GEF (*Guanine nucleotide exchange factors*), los GDIs (Guanine dissociation inhibitors), GAPs (GTPases activating proteins). Tras desencadenar la cascada de efectores el GTP es hidrolizado por la propia proteína Ras que tiene actividad GTPasa volviendo al estado inactivo.

Tanto las mutaciones del gen ras que produzcan proteínas con escasa actividad GTPasa, como las que aumentan los niveles de GEF incrementan la

cantidad de Ras-GTP, y por tanto su función transmisora de la señal mitogénica generada en la membrana celular.

Ras adquiere este potencial transformante por mutaciones en codones como el 12 el 21 y el 61 que implican aminoácidos en unión a los grupos fosfato de GDP/GTP(73).

En la mayoría de los estudios las mutaciones en ras se asocian a adenocarcinomas(74-76). Las mutaciones activadoras del oncogén K-ras pueden representar factor pronóstico adverso en adenocarcinomas de pulmón resecables. Por ejemplo, en un estudio dónde se determinó la mutación puntual de K-ras en el codon 12 se observó cómo 12 de los 19 pacientes con dicha alteración murieron durante el seguimiento mientras que sólo lo hicieron 16 de los 50 pacientes sin dicha mutación ($p=0,002$) (77). En un meta-análisis publicado en el año 2005 que evaluaba 28 estudios sobre mutaciones en K-ras concluyó que este oncogén se puede considerar un factor pronóstico negativo en cuanto a supervivencia en CPCNP globalmente (HR= 1,35 IC95%:1,16-1,56), en adenocarcinoma en particular(HR 1.59; IC 95% 1.26-2.02) y cuando se utiliza PCR para su determinación (HR 1.40; IC95% 1.18-1.65) ya que esto no ocurre con la determinación de inmunohistoquímica (HR 1.08; IC95% 0.86-1.34). Existen también numerosos estudios en los que no se ha encontrado una relación pronóstica (65;76;78-80). Así Lu et al no encontraron correlación en 94 pacientes estadio I entre el pronóstico y el oncogén K-ras determinado por PCR ($p=0,889$). Por todo ello el papel de este oncogén como factor de mal pronóstico permanece

controvertido. Otro estudio analizó 1800 casos sin que se observará asociación entre la presencia del oncogén y pronóstico(52).

C-met. Existen estudios que han implicado al receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-met) en la biología del CNMP. Así, c-met está sobre-expresado en el 72% de los adenocarcinomas (81) mientras que las variantes epidermoides expresan una forma delecionada en la región 5'- 3' (82). Existen datos que sugieren que este receptor, de forma similar a lo que ocurre con otros receptores de factores de crecimiento, en ocasiones puede estar activado de forma constitutiva sin precisar el estímulo del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (82). Sin embargo, es la sobre-expresión de su ligando, HGF, la que se ha sugerido como factor de mal pronóstico en este escenario clínico (83).

Bcl-2. Protooncogen cuyo producto la proteína bcl-2 suprime la muerte celular programada (apoptosis). Un 22-56% de las neoplasias de pulmón presentan sobreexpresión de esta proteína antiapoptótica(84-91). Su relevancia no ha sido aclarada, pero en un meta-análisis del 2003, que analizaba 28 estudios concluyó que la sobre-expresión de este gen se asociaba con un mejor pronóstico con una HR:0,5 IC95%: 0,39-0,65(92).

3.5.2 Genes supresores de tumores.

P53. La proteína p53 interviene en el control del ciclo celular y de la replicación y reparación del ADN, mantiene la estabilidad genómica, activa la apoptosis y participa en la respuesta celular a agente externos nocivos(93).

La tasa de mutaciones detectadas está entre el 20 y el 60% de todos los casos de CPCNP(93;94). Estas son más frecuentes en tumores asociados con el tabaquismo como los carcinomas epidermoides(95;96).

La relación entre las mutaciones de p53 y supervivencia en los pacientes con CPCNP sigue sin estar claro a pesar de años de estudio. Uno de los principales problemas es la heterogenicidad metodológica para detectar la presencia de mutaciones en este gen. Anomalías en p53 se han encontrado mediante secuenciación de ADN y detección de expresión proteica mediante inmunohistoquímica. La semivida de p53 natural es muy corta por lo que solo se observan las formas mutadas, ya que estas no se degradan lo que permite su acumulación a nivel nuclear y su posterior visualización mediante técnicas de inmunohistoquímica. Los análisis con ambas técnicas también han dado lugar a datos contradictorios en términos de supervivencia.

Así dos meta-análisis han explorado la influencia de las mutaciones de p53 o su sobreexpresión en cuanto a pronóstico (97;98). En el primero se encontró un peor pronóstico en cualquier estadio (HR:1,44 con IC95%: 1,2-1,72). En el segundo el impacto negativo solo se encontró en los adenocarcinomas (P=0.0000039 mediante estudios de proteína P=0.000031 mediante estudios de ADN) pero no en los epidermoides (P=0.4241 y P=0.8864 respectivamente)

Las razones para estas diferencias entre los distintos estudios no están totalmente esclarecidas. La mayoría de estos estudios son retrospectivos, limitados por un pequeño tamaño muestral, poblaciones heterogéneas, presentan sesgos de selección, e incluso medidas de detección de mutaciones de p53 no

validadas. Incluso la secuenciación directa del gen, si se limita a los exones 5 al 9, puede no detectar hasta un 17% de las mutaciones en p53(99).

Gen del retinoblastoma. El gen Rb está localizado en el cromosoma 13q14.11, codifica para una proteína nuclear de 928 aminoácidos que se identificó por primera vez en pacientes con retinoblastoma. La proteína Rb interviene en el punto de restricción R al final de la fase G1 del ciclo celular. Los niveles de Rb no se altera significativamente durante el ciclo de división, pero si su grado de fosforilación, que modula su actividad. Durante las fases G0 y G1, la proteína Rb está poco o nada fosforilada, mientras que al final de la fase G1 o en el inicio de la S es fosforilada en múltiples aminoácidos por las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Al final de la fase M de mitosis, la proteína Rb vuelve a su estado hipofosforilado como resultado de acción de las fosfatasas. Su nivel de fosforilación modula su interacción con los E2F (1,2 y 3), unos factores de transcripción necesarios para la progresión de la fase S, que se unen a secuencias TTTTCGCGC. Cuando su nivel de fosforilación es bajo se mantiene unida a E2F impidiendo su acción, cuando su nivel es elevado E2F se libera y es capaz de activar genes que son cruciales para la proliferación celular como los que codifican las enzimas timidina quinasa (timidilato sintetasa, dihidrofolato reductasa y ADN polimerasa α). Existen dos vías de inactivación de la ruta de Rb: por mutaciones del propio gen o alteraciones en la proteína p16INK4A por inactivación epigenética mediante hipermetilación. Mutaciones en este gen tan solo aparecen en el 15% del CPCNP y parecen asociarse a un peor pronóstico(100;101). En un estudio se identificó la pérdida de expresión de la

proteína RB en 24 de 101 pacientes que habían sido intervenidos de cáncer de pulmón en estadios precoces, y se verificó que los tumores con ausencia de esta proteína tenían una peor mediana de supervivencia (32 meses frente a 18 meses, $p:0.007$).

Las mutaciones de Rb pueden actuar de modo sinérgico con otras anomalías moleculares a la hora de empeorar el pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón. Por ejemplo se ha comunicado que los tumores con alteraciones del Rb a los que se asocian anomalías en p53 tienen una peor supervivencia (12 meses para los Rb-/p53+ frente a 41 meses los RB+/p53-, $p=0,005$)(100). Sin embargo, no todos los estudios han demostrado una asociación entre peor pronóstico y ausencia de expresión de Rb (102;103).

P16INK4A y *P15INK4B*. Los genes *P16INK4A* y *P15INK4B* codifican para proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular, en particular en el “checkpoint” G1 inhibiendo la CDK4, impidiendo la progresión de G1 a S(104;105). La pérdida de *P16INK4A* por mutación, delección o hipermetilación aberrante del promotor(106) libera esta CDK de su inhibición, permitiendo la fosforilación constitutiva de Rb y la inhibición de la supresión del crecimiento. Los CPCNPs Rb positivos tienen una proteína p16 indetectable o a muy bajo nivel, mientras que los Rb negativos sí que presentan p16 incluso de manera abundante(107). Parece que la relación con peor pronóstico está presente en los pacientes con carcinoma epidermoide ($p=0,024$) (108). Sin embargo, como se ha podido observar en los otros genes mencionados, existen otras publicaciones que han sido incapaces de demostrar su asociación con un peor pronóstico(102;109).

3.5.3 Rutas relacionadas con invasión tumoral.

La interacción entre las células neoplásicas, la matriz extracelular y la membrana basal es un evento crítico en el proceso de invasión tumoral y diseminación. La matriz extracelular está compuesta de la membrana basal y otras grandes moléculas que sirven de asiento a la misma. Los componentes más importantes son: colágeno tipo IV, laminina y proteoglicanos de heparan-sulfato.

La degradación de la matriz extracelular, específicamente el colágeno tipo IV, es un proceso muy dinámico que depende de la producción de matriz y de la síntesis y activación de proteasas e inhibidores de éstas. De las ocho familias implicadas, dos familias de proteinasas son las más importantes en este proceso: el activador del plasminógeno (PA) y las metaloproteinasas de la matriz (MMP).

Activador del plasminógeno. El plasminógeno, proenzima de la activa plasmina, puede ser desprendido de la matriz mediante el activador tisular del plasminógeno (t-PA) o el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Tanto la fibronectina, la laminina, la fibrina como el colágeno tipo IV pueden ser degradados por proteólisis mediante la plasmina. Se han descrito al menos 4 inhibidores de PA: inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), PAI-2, nexinas-proteasa y α 2-antiplasmina.

El balance entre activadores e inhibidores del plasminógeno es el que mantiene la normal homeostasis de la matriz extracelular. Una vez que este equilibrio se rompe como ocurre en el crecimiento maligno, se pueden producir metástasis(110). Como ejemplo una abundancia de activadores, que se expresan

en gran cantidad en los CPCNP(111), pueden revertir la influencia de los inhibidores, permitiendo atravesar la matriz provocando la diseminación metastásica posterior(112).

En un estudio sobre 137 CPCNPs analizados por inmunohistoquímica, la mediana de supervivencia era de 60 semanas frente a 111 según fueran los pacientes uPA positivos o negativos respectivamente ($p=0,018$)(113). Sin embargo al menos existe un artículo que no ha sido capaz de demostrar esta correlación(111).

Metaloproteinasas de la matriz (MMP). Son enzimas implicadas en degradar y remodelar la matriz extracelular. Estas moléculas tienen un importante papel en el comportamiento metastásico de los tumores(114). Se han descrito 11 MMPs, que se liberan como proenzimas inactivadas que son activadas en el medio extracelular. Se han clasificado en cuatro grupos dependiendo de sus sustratos: colagenasas intersticiales, estromalinas, gelatinasas (colagenasas tipo IV) y matrilisinas. Los sustratos de las MMPs son: colágenos fibrilares del hueso, piel e intersticio y los colágenos no fibrilares como la laminina y la fibronectina, componentes de la lamina basal(115;116).

Existen varias moléculas capaces de inhibir su acción entre las que destacan los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs). TIMP-1 es una proteína que se une de forma irreversible a las MMPs con una estequiometría 1:1 molar. Se considera que funciona como un gen supresor de metástasis(117). TIMP-2 bloquea la actividad de todas las MMPs activadas. La función de TIMP-3 está

menos estudiada. La importancia de estas moléculas se ha estudiado en modelos “in vitro” y animales.

Múltiples MMPs y sus inhibidores se expresan en el CPCNP y en algunos estudios se ha establecido una correlación entre su sobreexpresión y peor pronóstico. En una comunicación sobre 90 pacientes con cáncer de pulmón, bajos niveles de MMP se asociaban una mayor supervivencia al año (56% frente a 31%, $p < 0.05$) (118).

3.5.4 Angiogénesis.

La inducción de angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos) es un importante mecanismo que permite la proliferación tumoral y el desarrollo de metástasis (119). En los tumores, el proceso angiogénico es complejo e implica a múltiples factores. La regulación de la angiogénesis implica la participación tanto de agentes promotores como inhibidores siendo el balance resultante el que dé lugar a un fenotipo altamente vascularizado o no. La angiogénesis parece ser un importante factor pronóstico negativo en los CPCNP operados (120-127), aunque no ha podido ser confirmado en todos los estudios (69; 128). La utilización de este proceso como diana terapéutica en el cáncer de pulmón ha sido ratificado por un reciente estudio Fase III que parece mejorar el número de respuestas al añadirse a la quimioterapia tradicional un fármaco antiangiogénico (129; 130).

3.6 Perfiles derivados de estudios con tecnologías de alto rendimiento.

Los estudios realizados con marcadores aislados nos ofrecen una visión parcial de la realidad biológica del CPCNP. Por ello, el desarrollo de las

tecnologías de alto rendimiento ha suscitado un interés creciente en el análisis pronóstico del CPCNP. Así, el primer estudio con microarrays que ofreció marcadores de pronóstico en CNMP fue realizado por Garber y col(131). En este estudio, que no se diseñó con la intención de identificar marcadores pronósticos, estudiaron 67 muestras tumorales obtenidas de 56 pacientes, con seguimientos durante al menos 5 años, mediante microarrays de ADNc que incluía 24000 secuencias. Identificaron, mediante algoritmos de agrupación jerárquica de genes, patrones de expresión que permitían separar diferentes subtipos histológicos. Los pacientes diagnosticados de carcinoma de célula grande presentaron sobre-expresión de genes tales como HMGI(Y), el antígeno 1 relacionado con Fos y el activador tisular del plasminógeno. Entre los genes poco expresados en este grupo destacaron la cadherina E y la plakoglobina, que están implicadas en adhesión celular, lo cual es biológicamente plausible en sistemas neoplásicos que han perdido la adhesividad celular. Otros genes claramente asociados en su expresión a las células epiteliales, tales como laminina, el receptor 1 del dominio discoidina, CATX-8, el transductor 1 de señales de calcio asociado a tumores, el factor de transcripción ets asociado al epitelio y las claudinas 4 y 7 también se encontraron reprimidos. Todo ello sugería una transición epitelio- mesénquima. Además, PAX8 se encontró regulado negativamente, destacando el papel potencial que podría tener en la adquisición del fenotipo mesenquimal observado en este subtipo histológico de carcinoma de pulmón. De este modo y teniendo en cuenta la dificultad diagnóstica que, desde el punto de vista histológico, tiene esta variante tumoral se apuntó hacia la posibilidad de un posible apoyo diagnóstico

fundamentado en este patrón de expresión génica. Los pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide expresaron, como era de esperar, las citoqueratinas 5, 13 y 17 entre otros. En pacientes diagnosticados de adenocarcinomas sugirieron tres perfiles asociados a curvas de supervivencia con diferencias estadísticamente significativas. Así el surfactante A1 se expresó con gran intensidad en los subgrupos 1 y 2 de adenocarcinomas mientras que se encontró reprimido en el subgrupo 3 y en los demás subtipos histológicos. En este mismo sentido, las proteínas de líquido surfactante B y C, además de la pronapsina A, se correlacionaron en su expresión con el surfactante A1 así como con el factor 1 de transcripción tiroidea (TTF1) en los subgrupos de adenocarcinomas 1 y 2. El subgrupo 3 compartía con los subgrupos 1 y 2 expresión de genes implicados en ciclo celular tales como p16 entre otros, mientras que con el subgrupo de carcinomas de célula grande compartía genes implicados en el remodelado tisular así como VEGF-C y otras proteínas implicadas en angiogénesis. Tal y como hemos comentado, el análisis de supervivencia por subgrupos demostró diferencias estadísticamente significativas entre todos ellos. Sin embargo, un análisis en profundidad de este estudio demuestra que en el grupo con una menor supervivencia (n=8) se encuentran al menos 6 pacientes con estadios III y IV, mientras que en el grupo con mayor supervivencia 5 de 11 pacientes fueron incluidos con estadios patológicos I. Todo esto sugiere la posibilidad de que el estadio TNM esté ejerciendo un influjo moderador sobre la supervivencia de cada grupo y que los perfiles de expresión reflejen exclusivamente el estadio avanzado o precoz de cada paciente. Sin embargo el exhaustivo análisis de los perfiles de

expresión observados por estos autores hacen de este artículo el punto de partida de la predicción clínica en carcinoma de pulmón basada en genómica de alto rendimiento.

Bhattacharjee et al(132) analizaron 186 carcinomas de pulmón (127 adenocarcinomas, 21 carcinomas epidermoides, 20 tumores carcinoides pulmonares y 6 carcinomas microcíticos) y 17 controles de pulmón normal mediante microarrays de oligonucleótidos que correspondían con 12600 secuencias de transcritos. De forma similar a lo observado por Garber, demostró que era capaz de diferenciar subtipos histológicos a través de los perfiles genéticos empleando para ello los 3.312 transcritos con mayor variabilidad de expresión. Identificaron cuatro subtipos de adenocarcinomas a través de métodos de interpretación de arrays tales como la agrupación jerárquica o probabilística. Así el grupo de genes denominado C1 (por “cluster” 1) incluía genes con aumento en su expresión y que estaban relacionados con la proliferación y la división celular. El grupo C2 se caracterizó por un grupo de genes que se correspondían con marcadores neuroendocrinos. El grupo C3 consistía en genes incluidos en C2, en muestras de pulmones normales y algunos genes incluidos en C4. En C4 se incluyeron marcadores de neumocitos tipo II tales como TTF1 y las proteínas del surfactante pulmonar SFTPB, SFTPC y SFTPD. Todos aquellos tumores que expresaron los genes incluidos en C2 presentaron una menor supervivencia global (mediana de supervivencia 21 meses) frente a aquellos tumores que no se incluían en este grupo (mediana de supervivencia 40.5 meses, $p < 0.005$). Por otro lado, aquellos tumores con el perfil de expresión evidenciado en el grupo C4

tuvieron una mejor supervivencia (mediana de supervivencia 49.7 meses) que aquellos que no se incluyeron en este grupo (mediana de supervivencia 33.2 meses $p < 0.05$). Nuevamente, cuando se aplican los perfiles de expresión sobre pacientes en el mismo estadio quirúrgico, no se alcanza en ningún momento la diferencia estadísticamente significativa, por lo que es posible que en el proceso de agrupamiento de genes para configurar un perfil concreto ciertos genes sean reflejo del estadio. Así, el sistema TNM persistía como mejor indicador de pronóstico.

Wigle et al (133) analizaron 39 pacientes con un seguimiento mínimo de 1 año mediante arrays de ADNc que incluían 2899 genes. Durante el seguimiento 24 pacientes presentaron recurrencia local o a distancia mientras que los 15 restantes permanecieron libres de enfermedad. Ambos grupos (en recaída y libres de enfermedad) presentaron unas características basales en relación al sexo, edad, subtipo histológico y periodo de seguimiento similares, aunque existía un número mayor de pacientes en estadio II distribuidos uniformemente en ambos grupos. Sin embargo, no encontraron ningún perfil de expresión asociado al estadio tumoral. El análisis no supervisado tras la agrupación jerárquica demostró diferencias en los perfiles de expresión entre ambos grupos. Así, la curva de supervivencia obtenida por el método de Kaplan-Meier objetivó estas diferencias con valores estadísticamente significativos ($p = 0.0022$). Utilizando el modelo de Cox de riesgos proporcionales, determinaron que la expresión de 22 genes entre los 2899 analizados era suficiente para evidenciar tales diferencias en el subgrupo libre de enfermedad. Entre estos 22 genes, 15 ya estaban codificados por el sistema

Unigene (HPCAL-4, GDI-alfa, el receptor alfa de interleuquina 20, el miembro 3 de la familia A de la proteína nucleolar NOLA3, el componente SRB7 de la holoenzima ARN polimerasa II, la protein-quinasa homologa a Wee1+ de S. Pombe, PRSS25, C40, HLA-DQB1 y DC6 así como los genes Hs32501, Hs12294, Hs83575, Hs268053 y Hs12758), mientras que los 7 restantes estaban pendientes de caracterizar. De forma similar a los estudios previamente citados, cuando se agrupaba a los pacientes por estadios, el peso estadístico del sistema TNM borraba cualquier sugerencia de estratificación pronóstica por estos perfiles génicos.

Beer et al (134) diseñó un estudio para identificar genes predictores de supervivencia en pacientes con CPCNP operados. Para ello incluyó 86 pacientes agrupados en estadio I (n= 67) y en estadio III (n=19) junto con 10 muestras control y los estudió con microarrays de oligonucleótidos. Determinaron la abundancia de transcritos en función de un protocolo de normalización para, en un segundo momento, eliminar del análisis final a todos aquellos genes con niveles bajos de expresión, esto es por debajo del percentil 75. De esta forma evitaban el efecto deletéreo que los genes con niveles bajos de expresión podrían ejercer sobre el análisis final. Al contrario que los estudios anteriores, el método de agrupamiento empleado por Beer sólo objetivó posibilidades de agrupar estadísticamente los perfiles de expresión con el diagnóstico histológico en el subgrupo de pacientes con carcinoma bronquiolo-alveolar. Probablemente este hecho se correlaciona con que la mayoría de los pacientes incluidos en este estudio estaban diagnosticados de adenocarcinoma sin precisiones sobre

subgrupos histológicos, excepto la mencionada sobre los tumores bronquiolo-alveolares. Evaluaron 4966 genes, de los cuales 967 diferían en términos de expresión diferencial entre los pacientes en estadio I y en estadio III. Este número de genes excedía con mucho lo que sería de esperar exclusivamente por el azar (248 en un nivel de alfa de 0.05). Así, validaron por *northern-blot* y por inmunohistoquímica los resultados obtenidos en tres genes seleccionados al azar: IGFBP3, cistatina-3 y LDH-A, cuyos datos apoyaron la fiabilidad de los obtenidos por arrays de oligonucleótidos. Para identificar nuevos genes predictores de comportamiento neoplásico aplicó dos sistemas equivalentes pero independientes de “*training*” y “*testing*” (estos sistemas son métodos estadísticos de agrupación de variables obtenidas por metodologías de alto rendimiento; de esta manera, en un primer momento se seleccionan un grupo de variables partiendo de todos los datos obtenidos desde un número concreto de situaciones clínicas – training- para en un segundo momento testar estas variables identificadas previamente sobre una muestra más amplia- testing-). El sistema empleado por Beer se fundamenta en la selección progresiva de un número de genes mayor (10, 20, 50, 75, etc) y establece en cada nivel la correlación con la supervivencia de ambos grupos (buen y mal pronóstico), hasta encontrar un número concreto de genes que sería el que tendría mayor poder estadístico para diferenciar a los subgrupos de buen y mal pronóstico. Así identificó los 50 genes con mayor peso estadístico para obtener dos grupos de pacientes con adenocarcinomas en estadio I con buen y mal pronóstico. Además, aplicó este grupo de genes a los pacientes en estadio I del estudio de Bhattacharjee obteniendo los mismos resultados. Demostró por

tanto que un estudio bien diseñado era capaz de obtener un perfil genético con suficiente poder estadístico como para, en un futuro, tomar decisiones terapéuticas fundamentadas en el mismo.

La determinación de perfiles de genes capaces de guiar las decisiones clínicas necesita de una validación en ensayos clínicos prospectivos. La inclusión de estudios sobre perfiles genéticos y proteicos en los sucesivos ensayos clínicos, y el análisis de estos mismos perfiles en los pacientes que reciben los tratamientos estándar, proveerán al clínico, en un futuro próximo, de la información necesaria para conseguir decisiones encaminadas a individualizar el tratamiento de los pacientes con cáncer de pulmón.

Los datos expuestos anteriormente, demuestran que tanto el análisis aislado de genes o proteínas como el uso de tecnologías de alto rendimiento son incapaces de ofrecer un valor pronóstico superior al TNM. Además, ningún tratamiento podría fundamentarse en esos datos sin la presencia de estudios prospectivos que los avalen.

Así pues es evidente la necesidad de rediseñar las estrategias de exploración de marcadores pronósticos en CPCNP sobre dianas con mecanismos fisiopatológicos distintos a las ya evaluadas.

3.7 Colina-quinasa.

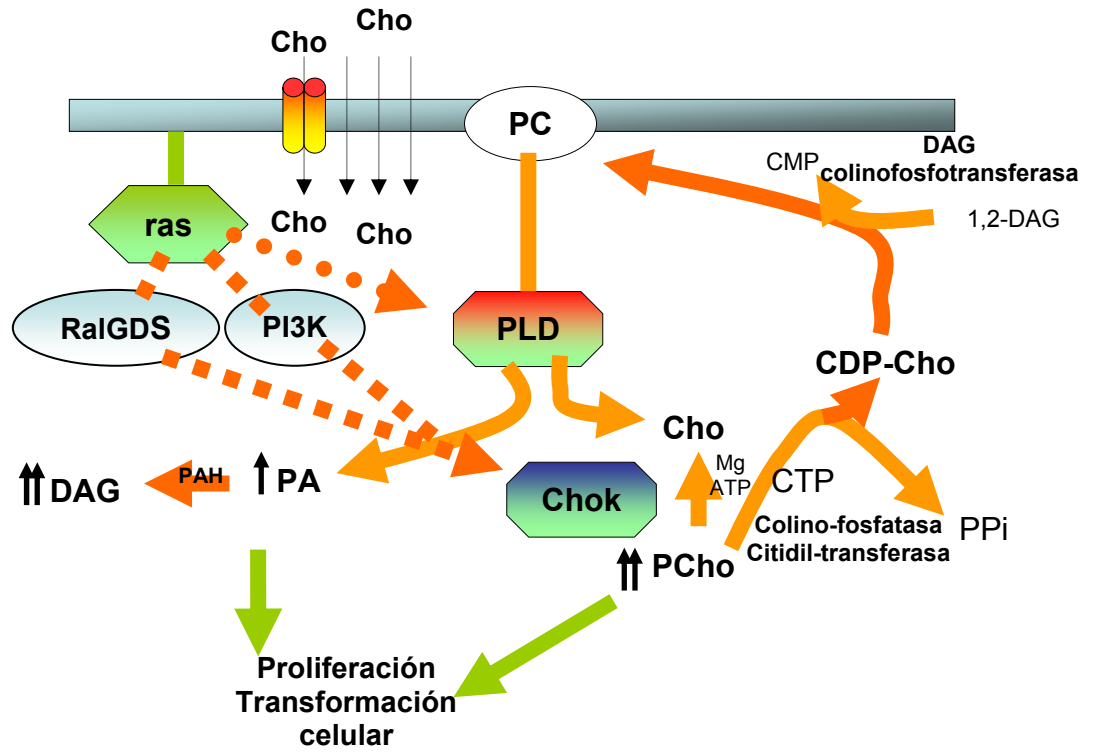
El gen que codifica la enzima colina-quinasa (Chok) se ha identificado recientemente como un oncogén. Esta enzima cataliza la síntesis de fosfocolina (PCho) a través de la fosforilación de colina (C) en una reacción estrictamente dependiente de ATP y magnesio. Es la primera reacción de fosforilación del ciclo de citidinfosfatasa-colina, también conocido como ciclo de Kennedy(135). El objetivo final de este ciclo es el recambio de uno de los principales fosfolípidos de la membrana celular, que es la fosfatidilcolina(136). Así, tanto la integridad global de las membranas celulares como la producción de éstas durante los procesos de división celular dependen del adecuado funcionamiento de este ciclo y de su primer enzima, colina-quinasa. En esta enzima también reside la capacidad de fosforilar otros sustratos diferentes a la colina tal y como se ha objetivado al evidenciar actividad quinasa sobre etanolamina desde fuentes de Chok purificadas desde células de mamíferos o de sus productos recombinantes(137;138).

Se han descrito dos genes que codifican para las distintas variantes de esta enzima con homologías cercanas al 60%(139). Por un lado, Chok-alfa contiene 13 exones y está situado en el cromosoma 11q13.2, codificando para dos isoformas producidas por “splicing alternativo” (Chok-alfa1 y Chok-alfa2). Así, el exón II'' se transcribe en la isoforma alfa-2 mientras que está ausente en la isoforma alfa-1. Las proteínas que se traducen poseen 457 y 439 aminoácidos respectivamente. Por otro lado, el gen situado en el cromosoma 22q13.3 codifica para Chok-beta y posee 11 exones (carece de los exones II' y II'') traduciendo una proteína de 394 aminoácidos.

Recientemente se ha evidenciado una importante sobre-expresión de esta enzima en diversas líneas celulares de carcinoma de pulmón, sin que existan hasta la actualidad datos clínicos que la impliquen en ninguna fase de esta neoplasia(140).

Existen distintas evidencias que demuestran que, tanto la exposición celular a factores de crecimiento o a carcinógenos químicos como la activación de ciertos oncogenes, estimulan la formación de PCho intracelular(137;141). Sin embargo, este incremento en la concentración global de PCho podría tener diversos orígenes ya que existen varias rutas desde las cuales se genera PCho. Así, tanto la actividad de Chok sobre colina como a través de la actividad de una enzima denominada esfingomielinasa que cataboliza la reacción de escisión de esfingomielina en PCho y ceramida, son capaces de inducir este aumento. Sin embargo, PCho es un metabolito lipídico poco difundible entre membranas por lo que la modificación de la concentración de PCho a uno y otro lado de la membrana no tiene por qué tener influjo directo entre ambos compartimentos(137).

Figura 1. Modulación del metabolismo de PCho por proteínas Ras(142).



El aumento de la concentración de fosforilcolina promueve la mitosis celular. Las primeras evidencias que se obtuvieron acerca de la implicación del producto de colina-quinasa en mitosis, derivaron de la observación de un incremento en la síntesis de ADN por parte de fibroblastos inmortalizados tras suplementar el medio de cultivo con fosforilcolina (143). Por otro lado, cuando estas células eran estimuladas con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o con el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se inducía un incremento en la síntesis de PCho, la cual era inhibible en presencia de hemicolinium-3. Este inhibidor de colina-quinasa también reducía el efecto mitogénico de los factores de crecimiento previamente expuestos. Finalmente, todo ello era parcialmente reversible bajo suplementos exógenos de fosfocolina(144).

Ante estos datos se analizó el papel que en mitosis podía jugar Chok induciendo su sobre-expresión en distintos modelos. Por un lado, aquellas células con sobre-expresión de Chok presentaron mayor tasa proliferativa que sus parejas sin modificar. Sin embargo, de forma sorprendente se demostró que un incremento en la concentración intracelular de PCho no se asociaba a un aumento proporcional de fosfatidilcolina por lo que era poco probable que el “pool” generado de PCho estuviera implicado en la síntesis de fosfolípidos de membrana. Además, en estas células con actividad Chok incrementada, el estímulo por IGF-1 aumenta sus efectos sobre mitosis, por lo que se ha sugerido que la fosfocolina podía ser un segundo mensajero del efecto de IGF-1 sobre la división celular(142).

Por otro lado, la PCho del compartimiento extracelular parece jugar un papel mitogénico aunque mediado por distintos sistemas de transducción de señales. Por un lado, en presencia de insulina y ATP, la fosfocolina extracelular termina estimulando la síntesis de ADN por una ruta sensible a rapamicina, que podría implicar a la quinasa S6/p70. Por otro lado, en presencia de bombesina y de zinc la síntesis de ADN sería dependiente de la ruta de las MAP quinasas (145). Además, los productos del metabolismo de la esfingosina, esfingosina-1-fosfato (S1P) y esfingosilfosfocolina (SPC), estimulan de forma sinérgica con PCho la división celular en fibroblastos (146;147). En el caso de S1P existe un receptor específico que, bajo ciertas condiciones, también podría ser activado por SPC, que podría ser el mediador de la transducción de la señal al interior de la célula.

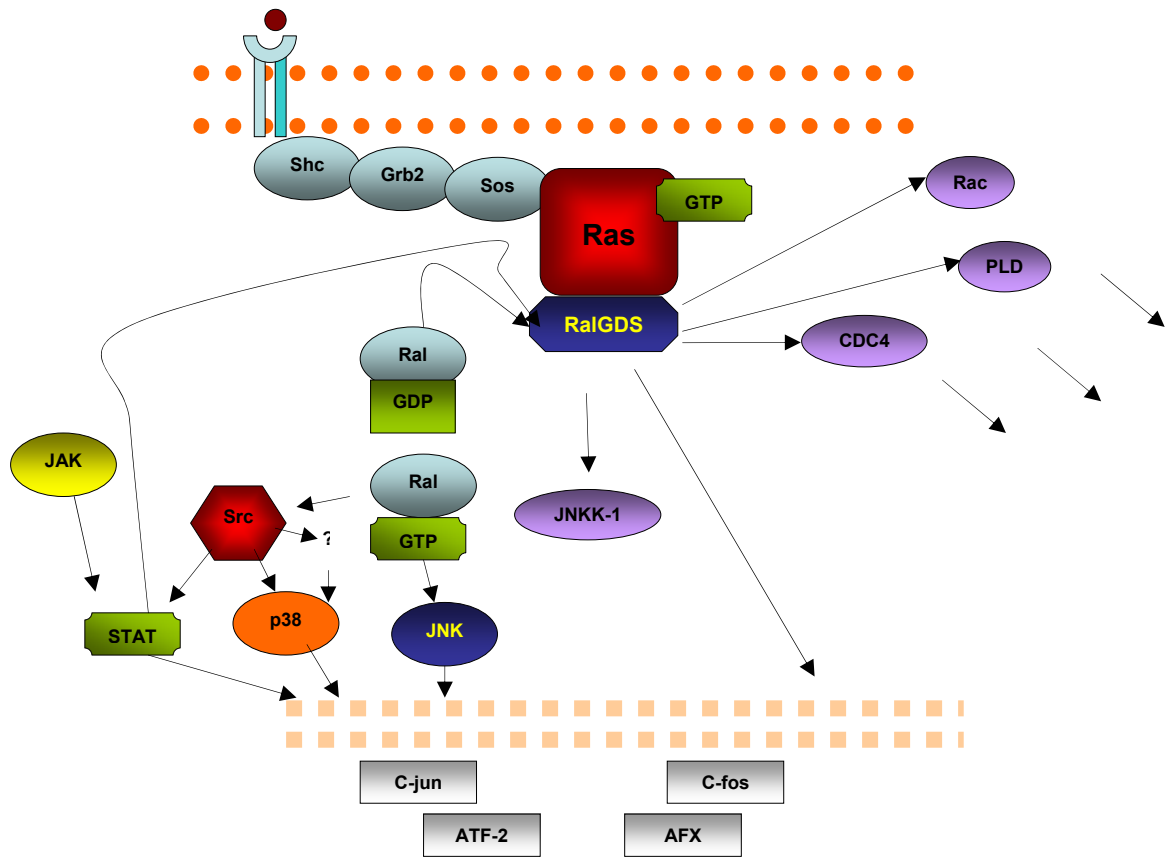
Esto sugiere que el efecto de Chok sobre el ciclo celular y la promoción de la mitosis parece depender del incremento de la concentración de su producto, fosforilcolina.

La colina-quinasa, principal fuente de PCho intracelular, es activada a través de distintos sistemas intracelulares de transducción de señales. Esta activación puede estar mediada por distintos sistemas de señalización entre los que destaca ras, a través de Ral GDS, PI3K (figura 1) y la quinasa ROCK. Esta última enzima es efectora de RhoA y está implicada en los cambios de citoesqueleto, transformación celular y promoción de las metástasis asociadas a la actividad de esta GTPasa homologa a ras. Además, la coexpresión de Chok y RhoA induce un importante aumento en la tasa proliferativa del tumor(135;142).

El cáncer de pulmón es una enfermedad con una alta letalidad y los tratamientos son de eficacia limitada en cualquier situación clínica. Por ello, debemos establecer un sistema pronóstico que nos permita no excedernos a la hora de tratar pacientes potencialmente curados, y buscar nuevas alternativas terapéuticas en aquellos en los que sabemos que con los tratamientos actuales no obtendrán un resultado positivo.

Los sistemas de estratificación pronóstica han sido estudiados con profundidad en los últimos años sin conseguir un sistema que mejore la oferta predictiva del TNM. Además, los nuevos avances en biología molecular tampoco han permitido la incorporación de nuevas dianas dentro de los sistemas de clasificación pronóstica. Por ello, son necesarios nuevos datos sobre nuevas moléculas que puedan jugar un papel clave en la biología molecular del cáncer de pulmón. Chok es un nuevo oncogén implicado en la síntesis de fosfolípidos de membrana y cuya actividad está profundamente asociada a la actividad de Ras y otros efectores oncogénicos del cáncer de pulmón. En otros tumores diferentes al cáncer de pulmón ha demostrado su importante implicación funcional, por lo que es necesario obtener nuevos datos en tumores como el carcinoma de pulmón.

Figura 2. Señalización de la vía de ras a través de ral-GDS(142).



4. Hipótesis y objetivos.

4. Hipótesis de trabajo y objetivos.

El CPCNP puede ser tratado con éxito mediante resección quirúrgica cuando se encuentra localizado. En el caso de la enfermedad localmente avanzada, la quimioterapia basada en el cisplatino es efectiva, consiguiendo mejorar la supervivencia y la calidad de vida. En la enfermedad avanzada el empleo de combinaciones de dos fármacos quimioterápicos es la mejor opción terapéutica. Los recientes avances en el uso de fármacos antiangiogénicos y el mejor conocimiento del receptor EGFR y la población susceptible de responder al tratamiento de fármacos contra esta diana, está permitiendo mejorar la evolución de determinados pacientes con cáncer de pulmón (aquellos con histología no epidermoide o con mutaciones del EGFR que sensibilizan frente al uso de pequeñas moléculas frente a este receptor). Sin embargo, la supervivencia global de este tipo de enfermedad ha pasado de ser de un 15% a un 16% en los últimos 20 años(52). Esta situación demuestra la necesidad de definir lo más finamente posible la situación de la enfermedad en cada enfermo. La heterogeneidad de los pacientes incluidos en cada estadio y su dispar pronóstico y evolución, está animando a los distintos grupos investigadores a encontrar nuevos factores pronósticos que sean capaces de conducirnos hacia un tratamiento lo más personalizado posible.

Hasta el momento actual no se ha establecido ningún factor pronóstico capaz de superar la comparación con la clasificación TNM. Chok α es la enzima responsable de la síntesis de PCho, y está implicada tanto en procesos

metabólicos como en proliferación celular (137;142). Varios estudios han demostrado su implicación en el desarrollo de diversos tumores entre los que se encuentra el cáncer de pulmón(140). Recientemente se ha establecido Chok α como un nuevo oncogén que interviene en la transformación tumoral de las células humanas, induciendo tumorigénesis “in vivo”(142).

En el presente trabajo se pretende establecer Chok α como un nuevo marcador pronóstico molecular que ayude a implementar la clasificación de los CPCNPs, con la intención de seguir avanzando hacia un tratamiento personalizado del cáncer de pulmón.

Las hipótesis estadísticas se definieron de la siguiente manera:

- Hipótesis nula: los grupos de enfermos con cáncer de pulmón definidos por la expresión de Chok α no difieren en la supervivencia libre de enfermedad ni la supervivencia global.
- Hipótesis alternativa: la expresión de Chok α establece dos grupos de enfermos con diferencias en la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global.

El objetivo principal de este estudio es establecer el papel de Chok α como posible nuevo factor pronóstico en el cáncer de pulmón no microcítico. En este sentido se ha estudiado la posible asociación de la sobre-expresión colina-quinasa con grupos de peor pronóstico en cuanto a supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. Como objetivos secundarios se marcaron la posible asociación de la expresión de Chok α con el resto de variables clínico patológicas recogidas.

5. Material y métodos.

5. Material y métodos.

Diseño del estudio.

Se trata de un estudio piloto y retrospectivo en el que se analizaron diversos datos clínicos y patológicos obtenidos de las historias clínicas de pacientes que cumplían una serie de criterios de inclusión establecidos con anterioridad a la recogida de los citados datos. En esta muestra se estudio la expresión de colinaquinasa mediante qRT-PCR e inmunohistoquímica. Este diseño no permitió la recogida de nuevos datos en función de los resultados obtenidos con el fin de minimizar las limitaciones propias de un estudio retrospectivo. Los datos clínicos y patológicos fueron suministrados de forma independiente y codificados para garantizar la fiabilidad de los resultados. En todo momento se aseguró la confidencialidad de los mismos mediante la asignación de claves numéricas para la identificación del sujeto del que provenían los citados datos. Finalmente, todo el material patológico que se recogió fue nuevamente codificado y se garantizó la conservación y devolución de muestra clínicamente suficiente tras los experimentos de este estudio.

Pacientes.

Se reclutaron pacientes atendidos en el Hospital Universitario La Paz durante los años (2001-2004). A través de la base de datos del Servicio de Anatomía

Patológica del Hospital Universitario La Paz, y tras obtener la pertinente autorización, se seleccionaron los pacientes que potencialmente podían ser analizados para su inclusión en el estudio, recogiendo información de todos aquellos que disponían de cualquier muestra tisular en la que se hubiera diagnosticado un carcinoma no microcítico de pulmón. En ese momento se procedió al análisis de los datos clínicos y patológicos mínimos para proceder a la inclusión dentro de este estudio.

Definición de los dos subgrupos incluidos en este estudio.

Se establecieron dos subgrupos de pacientes diagnosticados de carcinoma no microcítico de pulmón para realizar evaluaciones biológicas diferentes. Por un lado, existía un subgrupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente en todos los estadios en los que se realizó la determinación por TaqMan. Por otro lado, el subgrupo de pacientes en estadios avanzados se empleó para realizar el estudio con inmunohistoquímica. El motivo de esta selección radicó en la necesidad de disponer de muestras tisulares fijadas mediante congelación para proceder a la extracción de ARNm. Esta circunstancia sólo fue viable en aquellos pacientes que habían sido intervenidos ya que el protocolo de conservación de muestras de piezas quirúrgicas así lo establecía. Por otro lado, los pacientes en estadios avanzados fueron diagnosticados mediante biopsias obtenidas por broncoscopia. Estas muestras se conservan habitualmente en medios que dificultan la extracción de ARNm y alteran la fiabilidad de los análisis realizados sobre el mismo. Por ello,

este tipo de pacientes fueron seleccionados para el análisis mediante inmunohistoquímica.

Criterios de inclusión del subgrupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente.

- Diagnóstico histológico de carcinoma no microcítico de pulmón.
- Mayores de 18 años.
- Resección macroscópicamente completa del tumor primario.
- Cualquier estadio. En el caso de estadios IIIB, se incluyeron aquellos que fueron intervenidos quirúrgicamente tras respuesta suficiente (“downstaging”) a quimioterapia de inducción. Se seleccionaron solo estadios IV con metástasis única cerebral reseca.
- Disección ganglionar mediastínica intraoperatoria con biopsia de todos aquellos ganglios que fueran mayores de 1 cm.
- TAC prequirúrgico realizado en los dos meses previos a la fecha de la cirugía.
- Muestra tisular con un contenido tumoral superior al 80%.

Criterios de exclusión del subgrupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente.

- Variantes histológicas mixtas.
- Carcinoma bronquioloalveolar multicéntrico o lobar difuso.
- Afectación subcarinal.
- Recidiva dentro de los dos primeros meses tras cirugía.
- Afectación de márgenes quirúrgicos.
- Administración de radioterapia adyuvante.
- Seguimiento inferior a 6 meses.
- Incumplimiento del protocolo de seguimiento clínico y radiológico establecido dentro del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz (ver apartado: Seguimiento clínico y variables analizadas).

- Pacientes diagnosticados de neoplasias malignas en los cinco años previos a la intervención quirúrgica.

Es importante destacar, que en este subgrupo de pacientes no se administró tratamiento adyuvante con quimioterapia ya que este no era considerado estándar en el inicio de este trabajo.

Criterios de inclusión en el subgrupo con enfermedad avanzada.

- Edad mayor a 18 años.
- Pacientes con diagnóstico histológico documentado de carcinoma no microcítico de pulmón.
- Estadios IIIB y IV.

- Tomografía computerizada realizada en los dos meses previos a la confirmación histológica.
- Gammagrafía ósea en aquellos pacientes en los que en la historia clínica se reflejaba la presencia de dolor óseo o con sospecha analítica al diagnóstico de afectación metastásica en esqueleto.
- Tomografía computerizada o Resonancia Nuclear Magnética de sistema nervioso central en aquellos pacientes cuyos datos clínicos así lo requirieran.

Criterios de exclusión en el subgrupo con enfermedad avanzada.

- Incumplimiento del protocolo de seguimiento clínico y radiológico del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz.
- Seguimiento inferior a 2 meses.
- Diagnóstico citológico.
- Proporción tumoral en muestra tisular inferior al 80%.

Origen de las muestras.

Las muestras tumorales provenían del banco de tumores del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital La Paz. Tal y como hemos descrito en el apartado anterior, existían dos tipos diferentes de muestras biológicas. Por un lado, se disponía de muestras de neoplasias pulmonares fijadas mediante congelación tras su extracción en el quirófano. Estas muestras fueron todas procesadas sin contacto con formaldehído y recogidas directamente en el

quirófano de Cirugía Torácica. Desde allí, en un tiempo inferior a 15 minutos eran transportadas hasta el Servicio de Anatomía Patológica donde un patólogo experto en patología pulmonar procedía a su análisis inicial. En este análisis se seleccionaba la cantidad suficiente para garantizar diagnóstico clínico y se procedía a congelar una muestra significativa de tumor para su análisis posterior. El método de conservación garantizó una cadena de frío de al menos -65°C.

Por otro lado, existían muestras conservadas en parafina. Estas muestras fueron fijadas tras su obtención inicial en formaldehído al 10%. Una vez fijadas y tras su procesamiento macroscópico se procedió a su inclusión en parafina y su conservación en el banco de tejidos del citado Servicio.

Variables clínicas.

Desde las historias clínicas se recogieron las siguientes variables clínicas

- Edad al diagnóstico
- Sexo
- Supervivencia Libre de Enfermedad: tiempo transcurrido desde el momento de la intervención quirúrgica hasta la presencia radiológica o patológica de alguna evidencia de enfermedad. Este tiempo se recogió en meses y sólo fue aplicable a aquellos pacientes incluidos en el subgrupo de estadios precoces.
- Supervivencia Global: tiempo transcurrido desde el momento del diagnóstico en aquellos pacientes del subgrupo de estadios avanzados o desde la fecha de la cirugía en los pacientes del subgrupo de estadios precoces, hasta la

muerte o la pérdida de contacto con el paciente. En este último caso, la fecha de la última visita se empleó para el cálculo del citado tiempo. Esta variable se recogió en meses.

- Clasificación dentro del sistema TNM. Para realizar esta clasificación se emplearon dos métodos distintos en función de que los pacientes estuvieran incluidos en cada uno de los subgrupos previamente mencionados. Por un lado, aquellos pacientes intervenidos quirúrgicamente fueron clasificados según los datos obtenidos desde las variables patológicas descritas más abajo. Por otro lado, los pacientes con tumores incluidos en el subgrupo de enfermedad avanzada fueron clasificados de acuerdo con la información obtenida desde una tomografía computerizada de tórax, abdomen y pelvis y, en el caso necesario, mediante otras tecnologías tales como la gammagrafía o la resonancia nuclear magnética.

Variables patológicas

Las siguientes variables se recogieron de los datos procedentes del informe completo emitido por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz

- Histología: Se incluyeron los diagnósticos de carcinoma epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma indiferenciado de célula grande.
- Tamaño tumoral en centímetros. Esta variable sólo se empleó en el subgrupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente.

- Afectación de estructuras torácicas. La descripción de las mismas se utilizó para la clasificación por el sistema TNM. Esta variable sólo se empleó en el subgrupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente.

- Afectación ganglionar en función de su presencia o ausencia. La infiltración de los distintos niveles ganglionares se empleó para la estadificación según el sistema TNM. Esta variable sólo se empleó en el subgrupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente.

Estadificación.

El sistema de estadificación internacional para el CPCNP fue establecido al final de los años 40 y actualizado recientemente en 1997 (Ver tablas 1 y 2).

Tabla1

Tumor primario (T)

- TX: El tumor primario no puede ser evaluado, o el tumor se ha comprobado por la presencia de células malignas en el esputo o secreciones bronquiales pero no ha sido visualizado por broncoscopia o imágenes
- T0: No hay evidencia de tumor primario
- Tis: Carcinoma in situ
- T1: Un tumor que tiene <3 cm en su mayor dimensión, rodeado por pleura pulmonar o visceral, y sin evidencia bronoscópica de invasión más proximal que un lóbulo bronquial (es decir, no en el bronquio principal). [Nota: El tumor superficial no común de cualquier tamaño con su componente invasor limitado a la pared bronquial, que puede extenderse proximal al bronquio principal, también se clasifica como T1.]
- T2: Un tumor con cualquiera de las siguientes características de grado o tamaño:
 - >3 cm en su dimensión mayor
 - Compromete el bronquio principal y está 2 cm distal de la carina
 - Invade la pleura visceral
 - Está relacionado con atelectasias o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero que no compromete todo el pulmón
- T3: Un tumor de cualquier tamaño que invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica (incluyendo tumores del surco superior), diafragma, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal de <2 cm distal a la carina pero sin compromiso de la carina; o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva de todo el pulmón.
- T4: Un tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes órganos: el mediastino, el corazón, los grandes vasos, la tráquea, el esófago, el cuerpo vertebral, la carina; o tumores ganglionares separados en el mismo lóbulo; o tumor con derrame pleural maligno. [Nota: La mayoría de los derrames pleurales asociados al cáncer de pulmón se deben a un tumor; sin embargo, en unos pocos pacientes, los exámenes citopatológicos múltiples del líquido pleural son negativos para tumor. En estos casos el líquido no tiene sangre y no es exudativo. Dichos pacientes serán evaluados más a fondo por medio de una videotoracosopia y biopsias pleurales directas. Cuando estos elementos y los criterios clínicos dicen que la efusión no está relacionada con el tumor, deberá ser excluida como un elemento de clasificación y el paciente deberá ser clasificado como T1, T2 o T3.]

Compromiso ganglionar (N)

- **NX: Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados**
- **N0: No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales**
- **N1: Metástasis a los ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales, los ganglios linfáticos hilares ipsilaterales o ambos y los ganglios intrapulmonares incluyendo el compromiso por extensión directa del tumor primario**
- **N2: Metástasis al ganglio (o ganglios) linfático mediastínico ipsilateral, subcarinal o ambos**
- **N3: Metástasis al ganglio (o ganglios) mediastínico contralateral, hiliar contralateral, escaleno ipsilateral o contralateral, o supraclavicular**

Metástasis a distancia (M)

- **MX: La presencia de metástasis distante no puede ser evaluada**
- **M0: No hay metástasis a distancia**
- **M1: Existe metástasis a distancia.**

Tabla 2. Agrupación por estadios del AJCC

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

Variables biológicas

Las dos variables biológicas analizadas en las muestras procedentes de los pacientes incluidos en este estudio fueron el nivel de expresión de ARNm de colina-quinasa-alfa y la determinación por inmunohistoquímica de la presencia de la misma.

Análisis de expresión proteica por inmunohistoquímica.

Se realizaron secciones de 5 μm de bloques de tejido fijados en formalina y parafinados. Se procedió inicialmente a realizar una tinción clásica mediante el método de la Hematoxilina- Eosina sobre el primer y el último corte para garantizar el adecuado contenido tumoral. Una vez comprobado esto, los cortes intermedios fueron desparafinados mediante concentraciones decrecientes de Xilol y rehidratados en concentraciones decrecientes de alcohol. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena mediante incubación en una solución de H₂O₂ al 3% en metanol durante 10 minutos. El desenmascaramiento antigénico se realizó mediante incubación en EDTA durante 45 minutos a 155°C en olla a presión.

El anticuerpo monoclonal frente a Chok α fue obtenido como se ha descrito previamente(148). Se empleó a una dilución 1:2 en BSA al 1% e incubado a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente se utilizó el Kit peroxidasa EN Visiom (Dako Cytomation, Carpintería, CA) durante 30 minutos. Se utilizó un substrato cromogénico de diaminobenzidina (Dako Cytomation, Carpintería, CA) y se contrastó con hematoxilina.

La presencia del antígeno se expresó como presencia o ausencia del mismo, evitando una gradación de intensidad de tinción.

Estudio de la expresión génica.

La descripción y los fundamentos de esta técnica se describen en el Apéndice I. Hemos incluido esta descripción ya que, aunque esta tecnología está ampliamente difundida en los distintos laboratorios de Biología Molecular, existe una gran cantidad de clínicos que no están familiarizados con la misma.

Seguimiento clínico y variables analizadas en el mismo.

En el subgrupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente, el seguimiento se realizó según los criterios del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario La Paz mediante exploración física y TC cada 3 meses durante los dos primeros años y posteriormente cada 6 meses.

En el subgrupo de pacientes con enfermedad avanzada o metastásica el seguimiento incluía un TC tras 3 ciclos de quimioterapia y tras la finalización de la radioterapia si esta estaba indicada. Posteriormente tras la finalización del tratamiento se realizaba TC y exploración física cada 3 meses durante los 2 primeros años y después cada 6 meses.

Análisis estadístico.

Se construyeron las distintas tablas de contingencia y se utilizó el test de Chi-Cuadrado y Test exacto de Fisher cuando fue oportuno.

Para el análisis de la supervivencia se obtuvieron las curvas por el método Kaplan-Meier, las comparaciones se establecieron mediante el test log-rank bilateral no ajustado y se realizó un análisis multivariante según el modelo de regresión de Cox, este proceso se realizó tanto para la supervivencia global como para la supervivencia libre de progresión, en el grupo de tumores intervenidos quirúrgicamente y para el tiempo hasta la progresión en tumores con estadios avanzados.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el paquete informático SPSS v13.0.

6. Resultados.

6. Resultados.

Características basales de los enfermos incluidos con CPCNP.

Se incluyeron 53 pacientes en el subgrupo diagnosticados de neoplasias de pulmón intervenidas quirúrgicamente (IQ) y 62 pacientes en el subgrupo con tumores localmente avanzados o diseminados (D)

La mediana de edad de los pacientes del subgrupo IQ (tabla 3) fue de 63 años con un rango distribuido entre 43 y 82. De todos ellos, 47 fueron varones y 6 fueron mujeres. En estadio IA fueron incluidos 5 pacientes, en estadio IB 21 pacientes, en estadio IIA 2 pacientes, en estadio IIB 9 pacientes, en estadio IIIA 10 pacientes, en estadio IIIB 2 pacientes, en estadio IV 3 y uno no clasificado debido a que no fue registrado el tamaño del tumor primario en la historia. Entre ellos 36 se determinaron histológicamente como epidermoides, 12 como adenocarcinomas y 5 como carcinomas indiferenciados de célula grande.

Dentro del subgrupo D se incluyeron 62 pacientes (tabla 4), con una mediana de edad de 62 con un rango distribuido entre 41 y 81. De todos ellos 51 fueron hombres y 11 fueron mujeres. En estadio IIIB se analizaron 27 y en estadio IV 35. Desde el punto de vista histológico se contabilizaron 33 epidermoides, 13 adenocarcinomas y 16 carcinomas indiferenciados de célula grande.

Tabla 3. Características basales de los casos de CPCNP intervenidos quirúrgicamente.

Característica n=53	
Mediana de edad	63 (43 –82)
Hombres	47(88,7%)
Mujer	6(11,3%)
Histología	
Adenocarcinoma	12(22,6%)
Epidermoide	36(68%)
Célula grande	5(9,4%)
T	
T1	9 (17%)
T2	39(73,6%)
T3	3(5,6%)
T4	1(1,9%)
No clasificado	1(1,9%)
N	
N0	31(58,5%)
N1	13(24,5%)
N2	8(15,1%)
N3	1(1,9%)
Estadio TNM	
IA	5(9,4%)
IB	21(39,6%)
IIA	2(3,8%)
IIB	9(17%)
IIIA	10(18,9%)
IIIB	2(3,8%)
IV	3(5,6%)
No clasificado	1(1,9%)

Tabla 4. Características basales de los casos de CPCNP diseminado.

Característica n=62	
Mediana de edad	62 (41 –81)
Hombres	51(82,3%)
Mujer	11(17,7%)
Histología	
Adenocarcinoma	13(21%)
Epidermoide	33(53,2%)
Célula grande	16(25,8%)
T	
T1	9 (14,5%)
T2	8(12,9%)
T3	38(61,3%)
No clasificado	7(11,3%)
N	
N0	12(19,4%)
N1	5(8,1%)
N2	30(48,4%)
N3	6(9,7%)
No clasificado	9(14,5%)
Estadio TNM	
IIIB	27(43,5%)
IV	35(56,5%)

Análisis de supervivencia de ambos grupos.

En el grupo de enfermos D:

La mediana y la media de la supervivencia global de la serie de enfermos con estadio avanzado de manera global fue de 8 (IC95%: 6,06-9,94) y 10,72 meses (IC95%: 7,91-13,54). Los datos globales para el tiempo hasta la progresión fueron: 6 meses de mediana (IC95%:3,80-8,20) y 7,84 meses de media (IC95%:6,28-9,40).

La mediana y la media del tiempo hasta la progresión por sexos fue de 5 (IC95%: 0,66-9,34) y 7,1 meses (IC95%:4,60-9,60) respectivamente para las mujeres y para los hombres, una mediana de 6 (IC95%:3,15-8,85) y una media de 8 (IC95%:6,18-9,82). En cuanto a la supervivencia global los datos fueron: para las mujeres una mediana de 9 (IC95%:6,43-11,57) y una media de 11 (IC95%:4,57-17,44); y para los hombres los valores fueron: mediana de 8 (IC95% 4,86-11,14) y una media de 10,68 (IC95%: 7,55-13,82). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al utilizar el método de Kaplan-Meier ni al comparar el tiempo hasta la progresión con el género ni cuando se comparó la supervivencia global (ver figuras 4 y 5) con unos valores de la p al utilizar el test log-rank de $p=0,488$ (THP vs sexo) y $p=0,995$ (SG vs sexo).

La mediana del tiempo hasta la progresión para el estadio IIIB fue de 9 meses (IC96%:6,70-11,29), con una media de 9 meses (IC95%:6,32-11,76). La mediana de supervivencia global fue de 9 meses (IC95%:6,35-11,35) para el estadio IIIB, con una media de 12,55 meses (IC95%:7,51-17,60). La mediana del tiempo hasta la progresión para el estadio IV fue de 5 meses (IC95%:3,12-6,88),

con una media de 7 meses (IC95%:5,19-8,81). La mediana de supervivencia global fue de 8 meses (IC95%:2,02-13,98) para el estadio IV, con una media de 9,19 meses (IC95%:6,24-12,14). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al utilizar el método de Kaplan-Meier ni al comparar el tiempo hasta la progresión con el estadio ni cuando se comparó la supervivencia global (ver figuras 6 y 7) con unos valores de la p al utilizar el test log-rank de $p=0,186$ (THP vs estadio) y $p=0,484$ (SG vs estadio).

La mediana del tiempo hasta la progresión para los casos de carcinoma epidermoide fue de 7 meses (IC95%: 4,34-9,66), con una media de 7,7 (IC95%: 5,86-9,53). Para los casos de adenocarcinoma, la mediana fue de 5 (IC95%: 0-13,63), con una media de 7,18 (IC95%: 3,74-10,63). En los casos con carcinoma indiferenciado de célula grande la mediana fue de 6 (IC95%: 0-13,57) y la media 8,6 (IC95%:4,73-12,47). La mediana de supervivencia global fue de 8 meses (IC95%: 4,75-11,24) para el carcinoma epidermoide con una media de 9,12 (IC95%: 6,00-12,23). Para los casos de adenocarcinoma la mediana y la media de supervivencia global fueron de: 8 (IC95%: 0-18) y 11,16 (IC95%:5,87-16,46). En el caso de los carcinomas indiferenciados de célula grande los valores para la supervivencia global fueron: mediana de 12 meses (IC95%: 0-24,94) y una media de 13,90 (IC95%:5,54-22,27). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al utilizar el método de Kaplan-Meier ni al comparar el tiempo hasta la progresión con la histología ni cuando se comparó la supervivencia global (ver figuras 8 y 9) con unos valores de la p al utilizar el test log-rank de $p=0,649$ (THP vs histología) y $p=0,484$ (SG vs histología).

En el grupo de IQ:

La media para la SLE del grupo completo fue de 45,24 meses (IC95%: 37,90-52,60). La media para la SG fue de 47,16 (IC95%:39,80-54,52). En ambos casos, en esta serie, no se han alcanzado las medianas de supervivencia.

Las medianas de supervivencia libre de enfermedad en relación al género no fueron calculadas ya que no se habían alcanzado. La media de SLE en el grupo de las mujeres fue de 38,04 (IC95%: 22,79-53,28) y de 46,23 (IC95%: 38,70-53,74) meses para los hombres. Este mismo inconveniente se observó al evaluar la supervivencia global en función del sexo. La media de SG en el grupo de las mujeres fue de 39 (IC95%: 24,61-53,38) y en el de los hombres fue de 48,93 (IC95%: 41,95-55,91). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las curvas de supervivencia libre de enfermedad por el método Kaplan-Meier (ver figuras 10 y 11) con unos valores de p al aplicar el test log-rank de: $p=0,896$ (SLE vs sexo) y $p=0,838$ (SG vs sexo).

Las medianas de supervivencia libre de enfermedad por estadio no se han alcanzado excepto para el estadio IV, con una mediana de SLE de 4,00 meses (IC95%: 0,79-7,20). Las medias fueron: 49,23 meses (IC95%:42,16-65,30) para el estadio I; 34,23 (IC95%:20,78-47,69) para el estadio II, 33,85 (IC95%: 22,44-45,25) para el estadio III, y 3,67 (IC95%: 1,94-5,40) para el estadio IV. Tampoco se han alcanzado las medianas de supervivencia global, exceptuando la del estadio IV que es de 4 meses. Las medias de supervivencia global fueron: 48,93 (IC95%:41,46-56,39) para el estadio I; 37,63 (IC95%:24,23-51,02) para el estadio II, 37,09 (IC96%:26,38-47,80) para el estadio III y 7,33 (IC95%: 0,80-13,87). Se

encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las curvas de supervivencia libre de enfermedad por el método Kaplan-Meier (ver figuras 12 y 13) con unos valores de p al aplicar el test log-rank de: $p=0,000002$ (SLE vs estadio) y $p=0,00004$ (SG vs estadio)

La mediana de supervivencia libre de enfermedad global no se alcanzó en ninguno de los subtipos histológicos. Para el carcinoma epidermoide la media fue de 44,63 (IC95%: 37,16-52,10). Para los casos de adenocarcinoma, la media fue de 40,36 (IC95%: 24,63-56,10). En los casos con carcinoma indiferenciado de célula grande la media fue de 30,80 (IC95%:12,33-49,27). La mediana de supervivencia global no se ha alcanzado para ninguno de los subtipos histológicos. La media del carcinoma epidermoide es de 48,32 (IC95%: 42,12-54,53). Para los casos de adenocarcinoma la media de supervivencia libre de enfermedad fue de: 41,45 (IC95%: 27,29-55,61). En el caso de los carcinomas indiferenciados de célula grande el valor para la supervivencia libre de enfermedad fue de 32,20 (IC95%:15,06-49,34). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al utilizar el método de Kaplan-Meier al comparar la supervivencia libre de enfermedad con la histología ni cuando se comparó la supervivencia global (ver figuras 14 y 15) con unos valores de la p al utilizar el test log-rank de $p=0,611$ (SLE vs histología) y $p=0,429$ (SG vs histología).

Figura 4. THP vs sexo

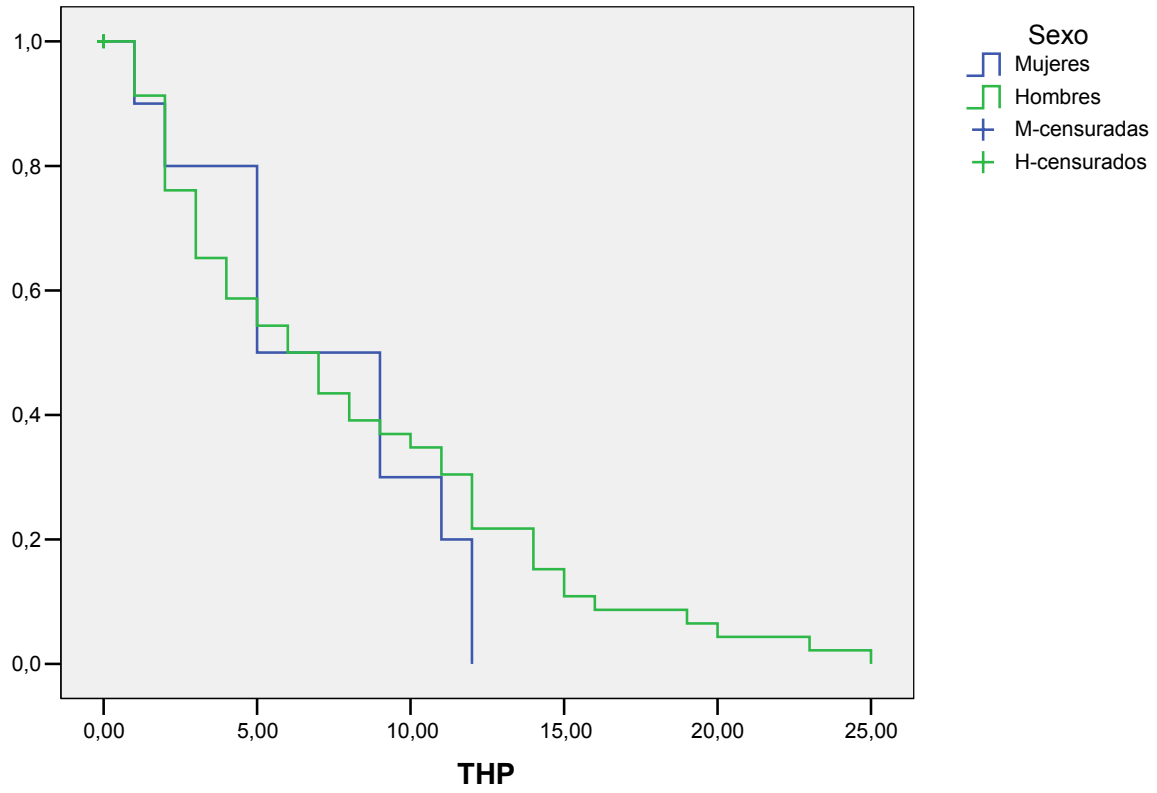


Figura 5. SG vs sexo.

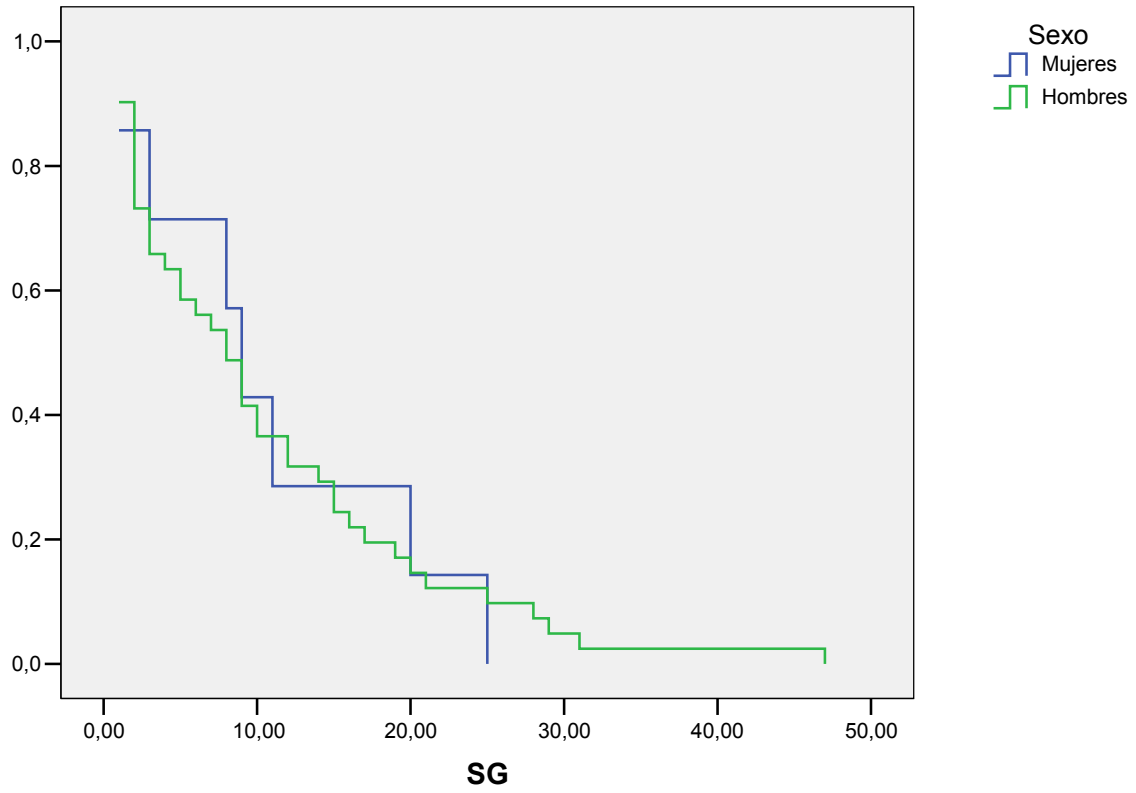


Figura 6. THP vs estadio.

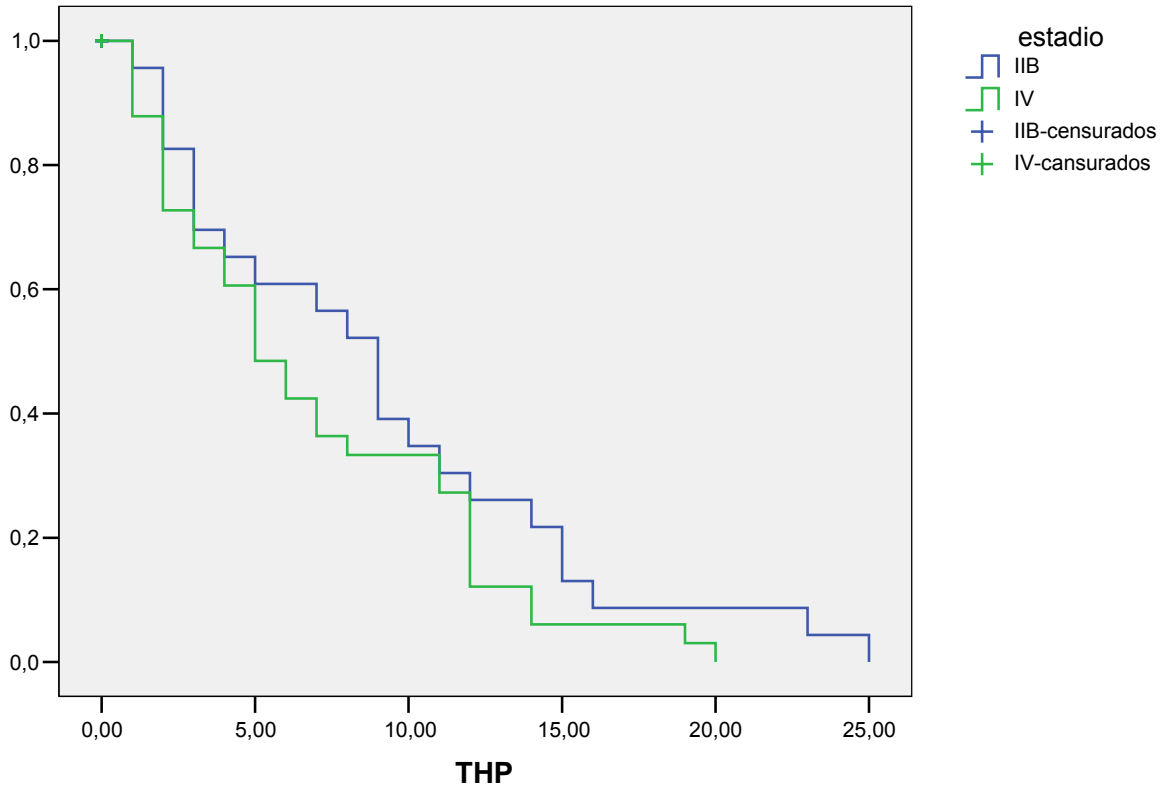


Figura 7. SG vs estadio.

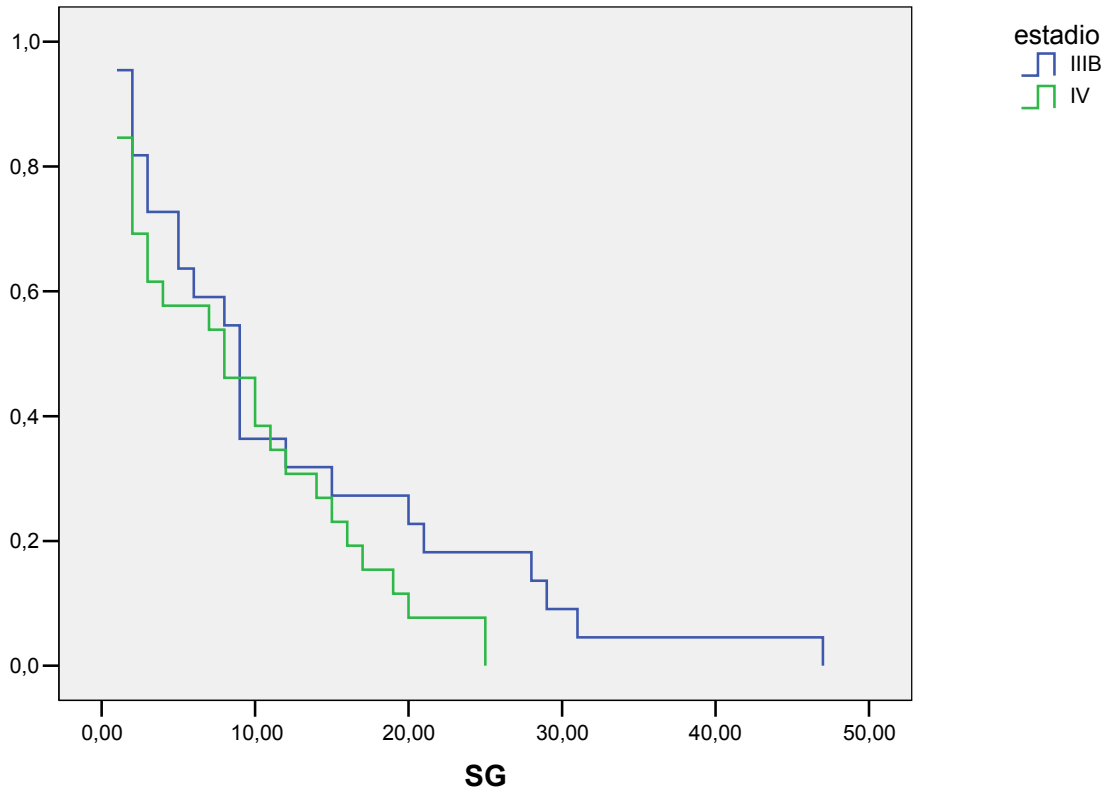


Figura 8. THP vs histología.

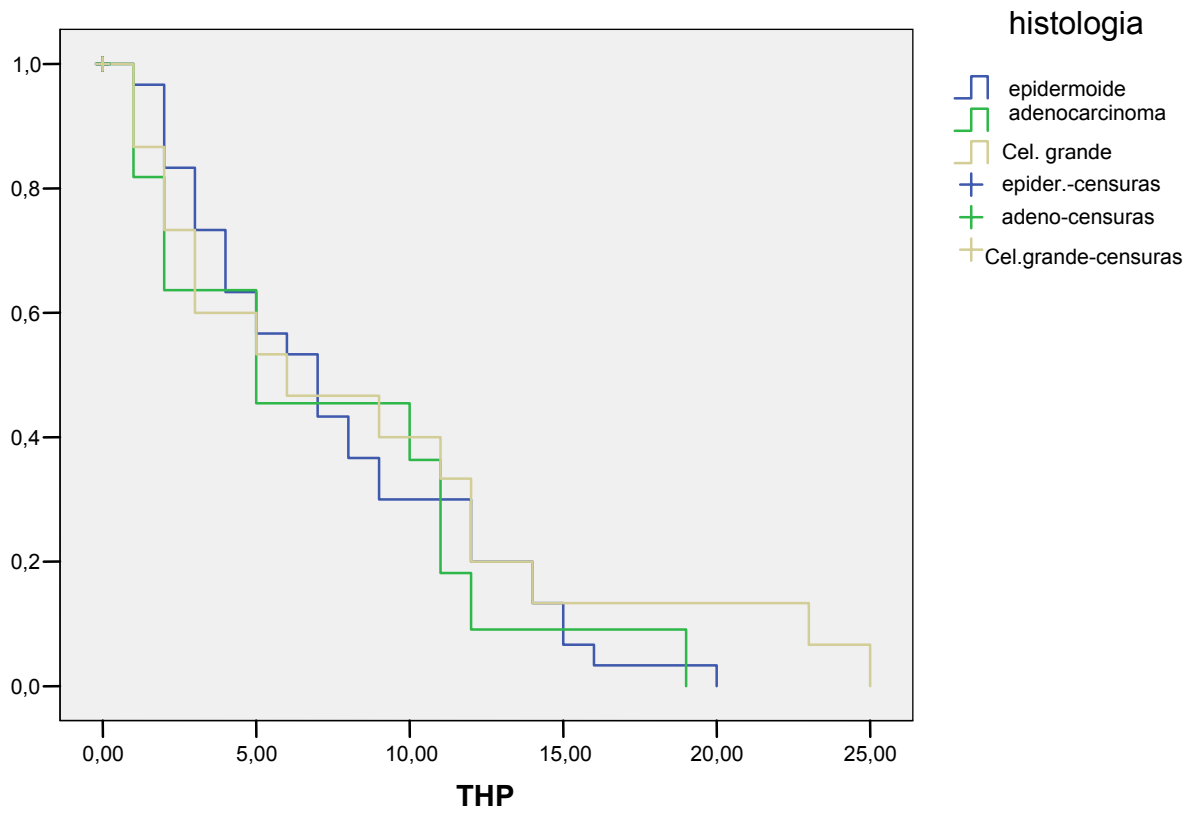


Figura 9. SG vs histología.

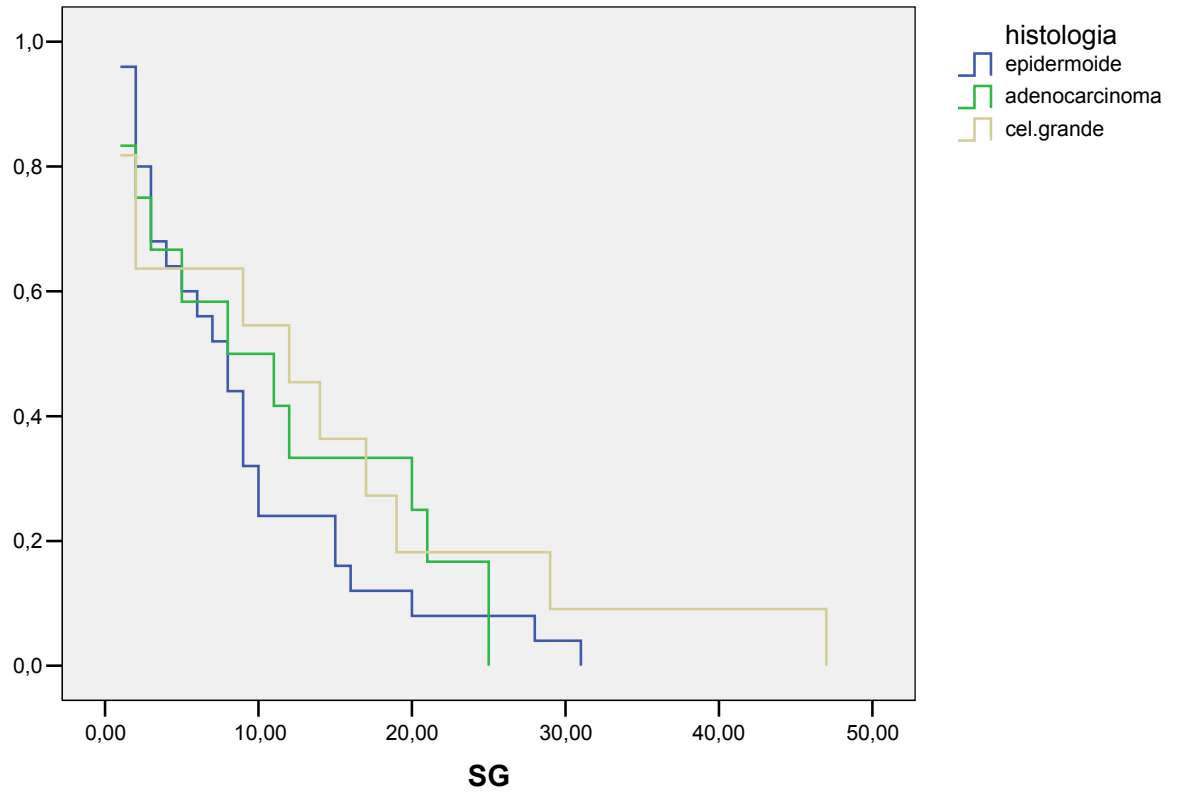


Figura 10. SLE vs sexo.

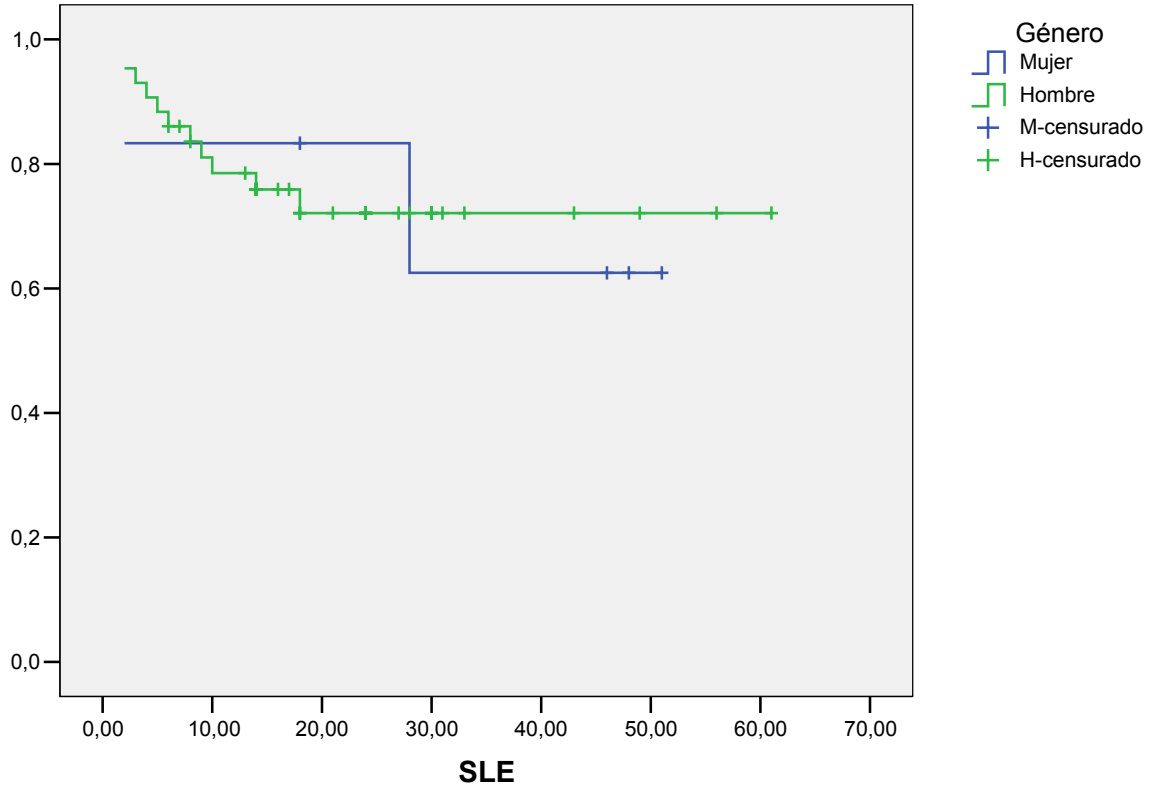


Figura 11. SG vs sexo.

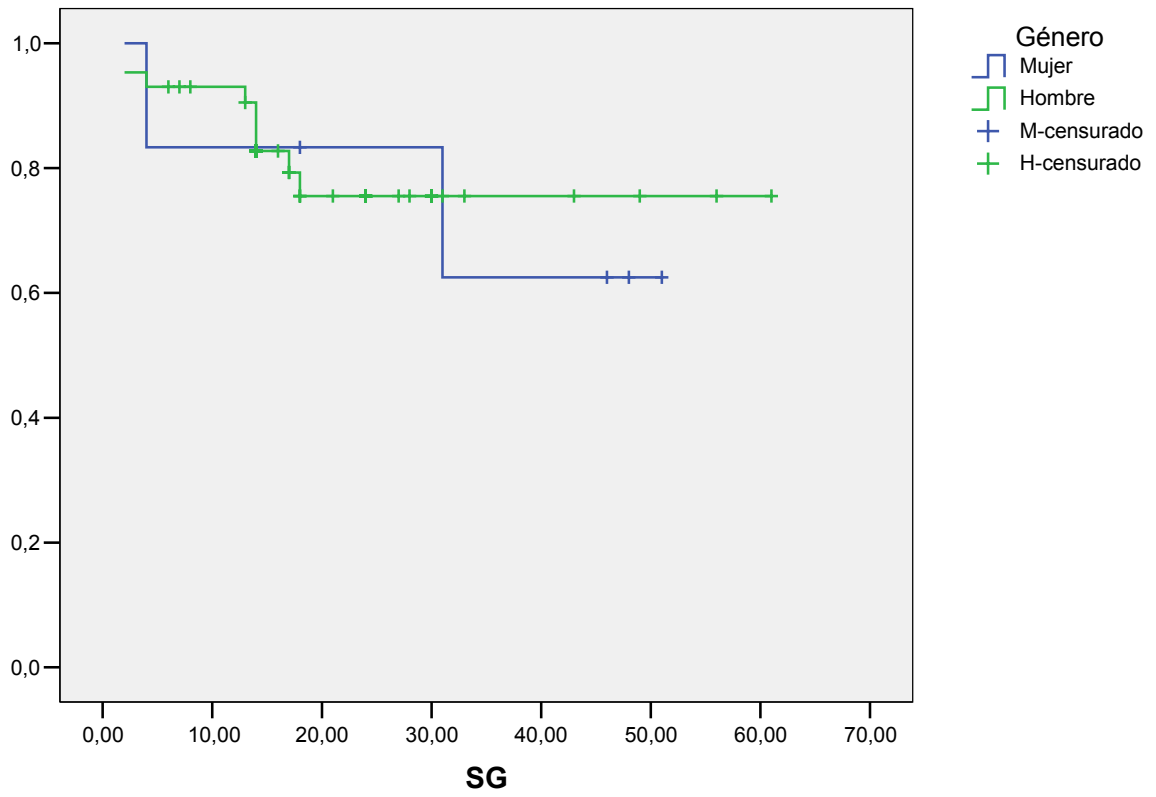


Figura 12. SLE vs estadio.

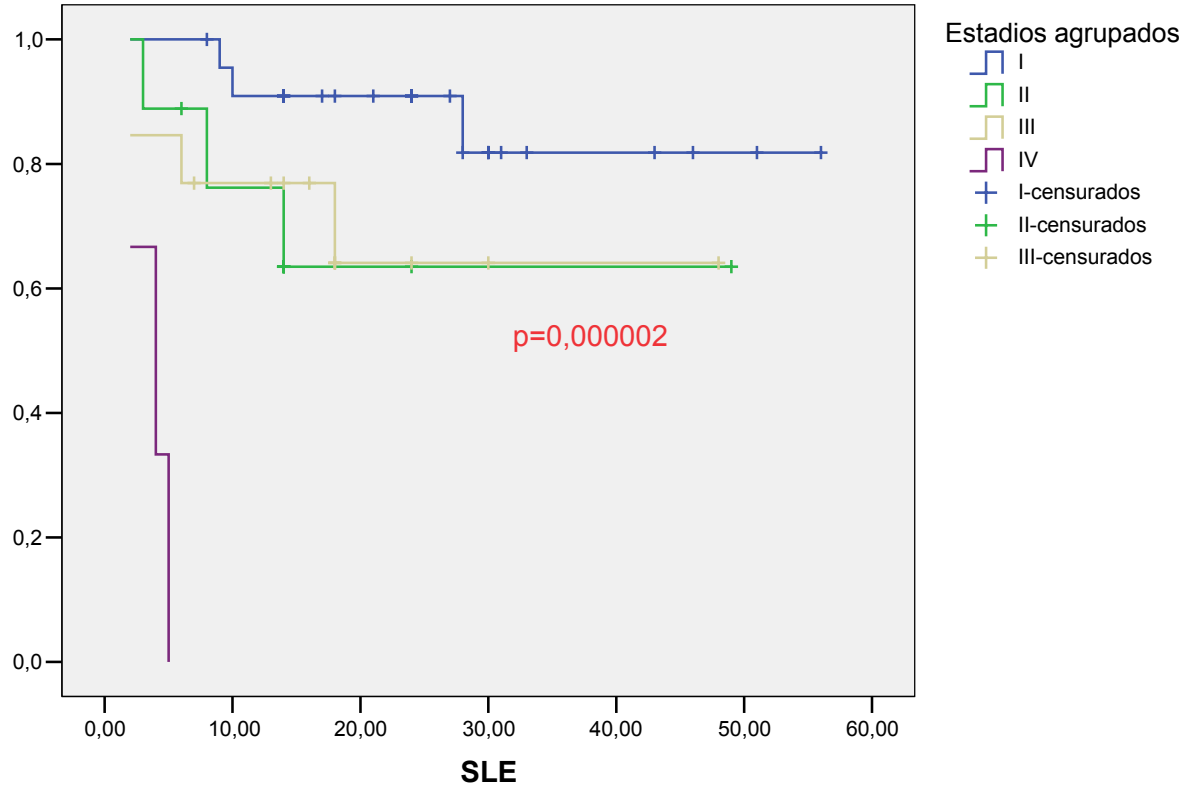


Figura 13. SG vs estadio.

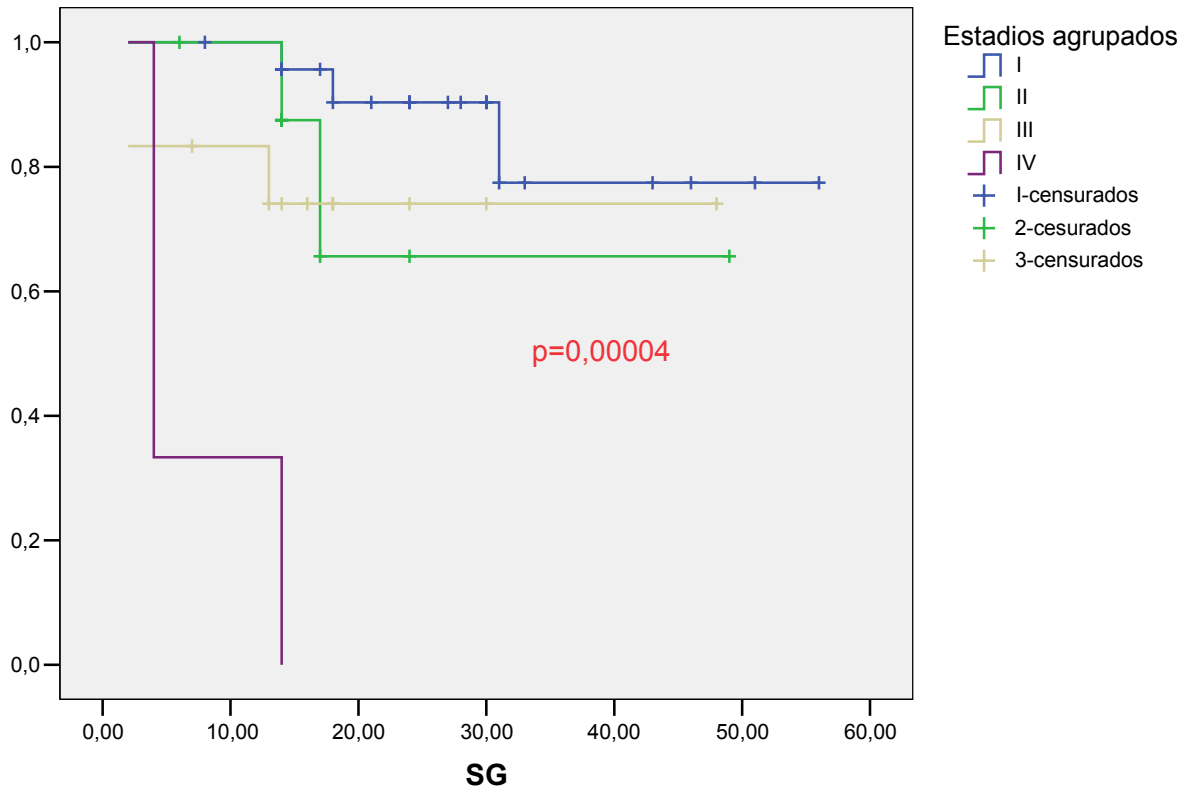


Figura 14. SLE vs histología.

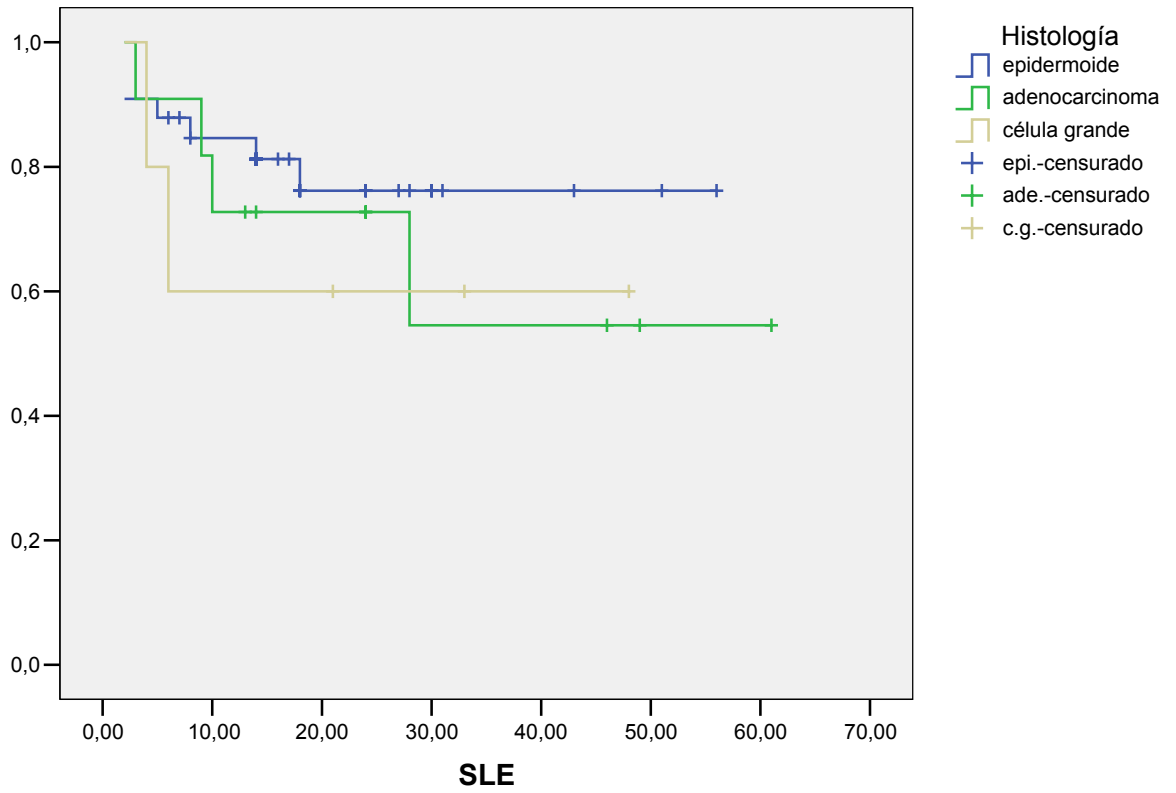
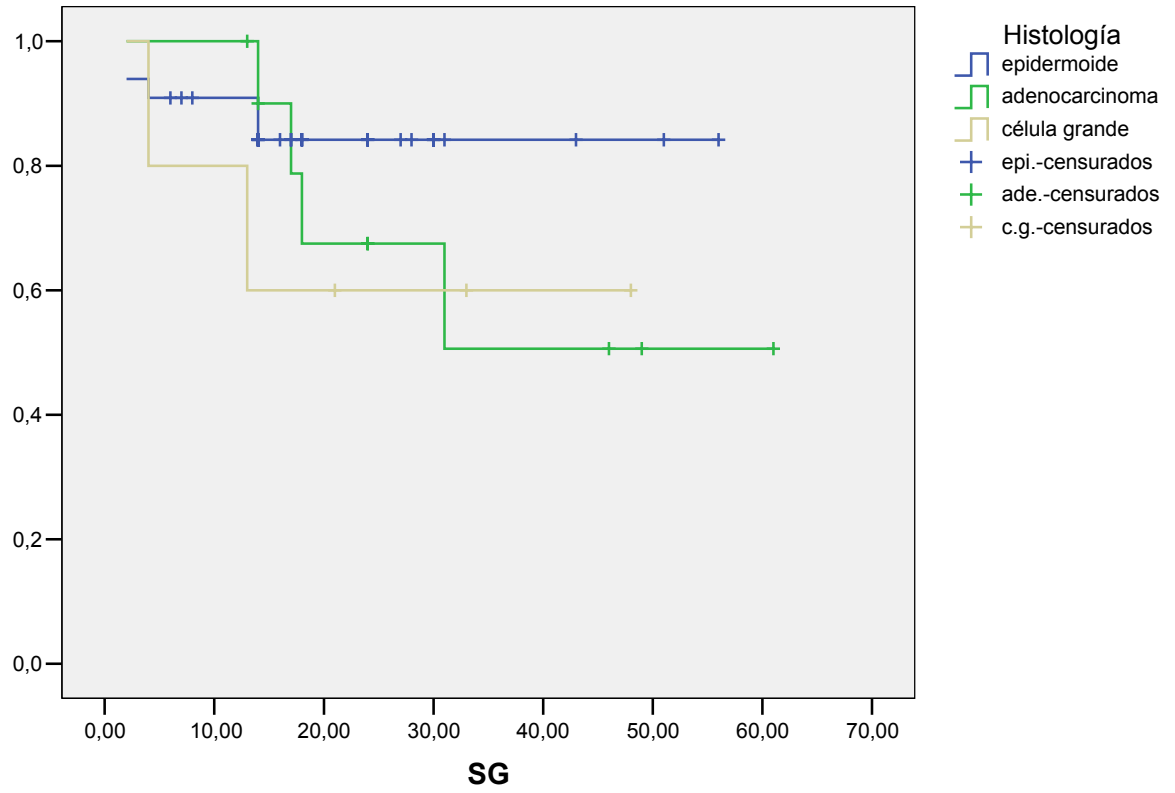


Figura 15. SG vs histología.



Expresión de Chokα por qRT-PCR y su relación con las variables clinico-patológicas de los pacientes incluidos en el subgrupo IQ.

El análisis de expresión de ARNm de Chokα demostró que 28 de las 53 muestras estudiadas (52,8%) presentaban un incremento de la expresión.

Debido a que la mayoría de los datos contabilizan como censuras el paquete estadístico no calcula las estimaciones puntuales de medianas y medias ni sus correspondientes IC95% tanto para la SLE como la SG, la mediana de seguimiento fue de 18 meses (Figura 16). Existía una diferencia estadísticamente significativa entre ambos subgrupos ($p=0.05$), evidenciándose un mejor pronóstico en términos de SLE en aquellos pacientes sin sobre-expresión de Chokα. Las diferencias alcanzadas entre ambos grupos también no fueron estadísticamente significativas en cuanto a la SG, pero se observó una tendencia ($p=0,07$) nuevamente de que la expresión de Chok empeora el pronóstico vital de los pacientes intervenidos por un CPCNP (Figura 17).

Al realizar el análisis multivariante aplicando un modelo de regresión de cox, en el subtipo por “entrada” la única variable tanto en la supervivencia global como en la supervivencia libre de enfermedad con significación estadística fue el estadio con unos HR de 2,329 (IC95%: 1,297- 4,182) con una significación de $p=0,005$ para la SLE y HR de 2,524 (IC95%: 1,373- 4,638) con una significación de $p=0.003$ para la SG. En el subtipo “por pasos” la única variable que entra para generar el modelo pronóstico es de nuevo el estadio. HR de 2,487 (IC95%: 1,363- 4,539), $p=0,003$ para la SLE y HR de 2,524 (IC95%: 1,373- 4,638), $p=0,003$ para la SG. En cuanto a la Chokα los HR hallados fueron: 2,149 (IC95%: 0,492- 9,394)

para la SG y de 2,405 (IC95%: 0,657- 8,810) para la SLE, en ambos casos sin alcanzar significación estadística con unos valores de p de 0,309 y 0,185 respectivamente.

Figura 16. SLE vs Chokα.

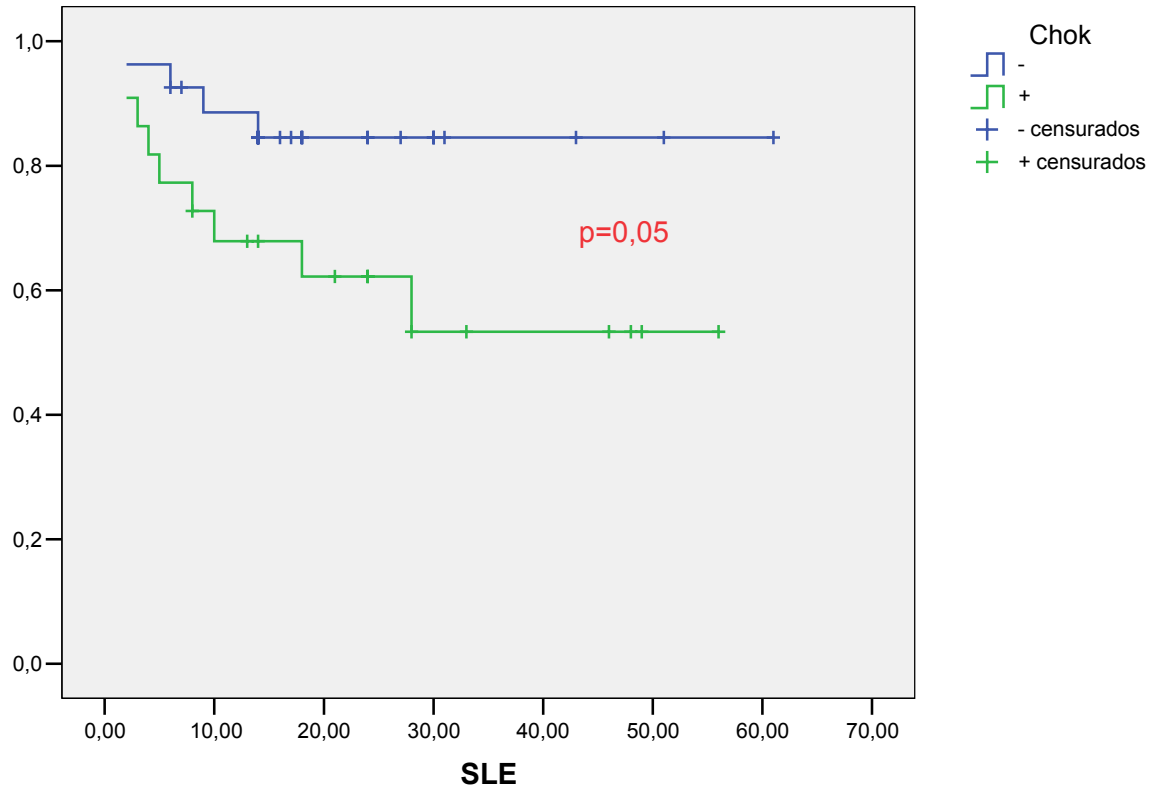
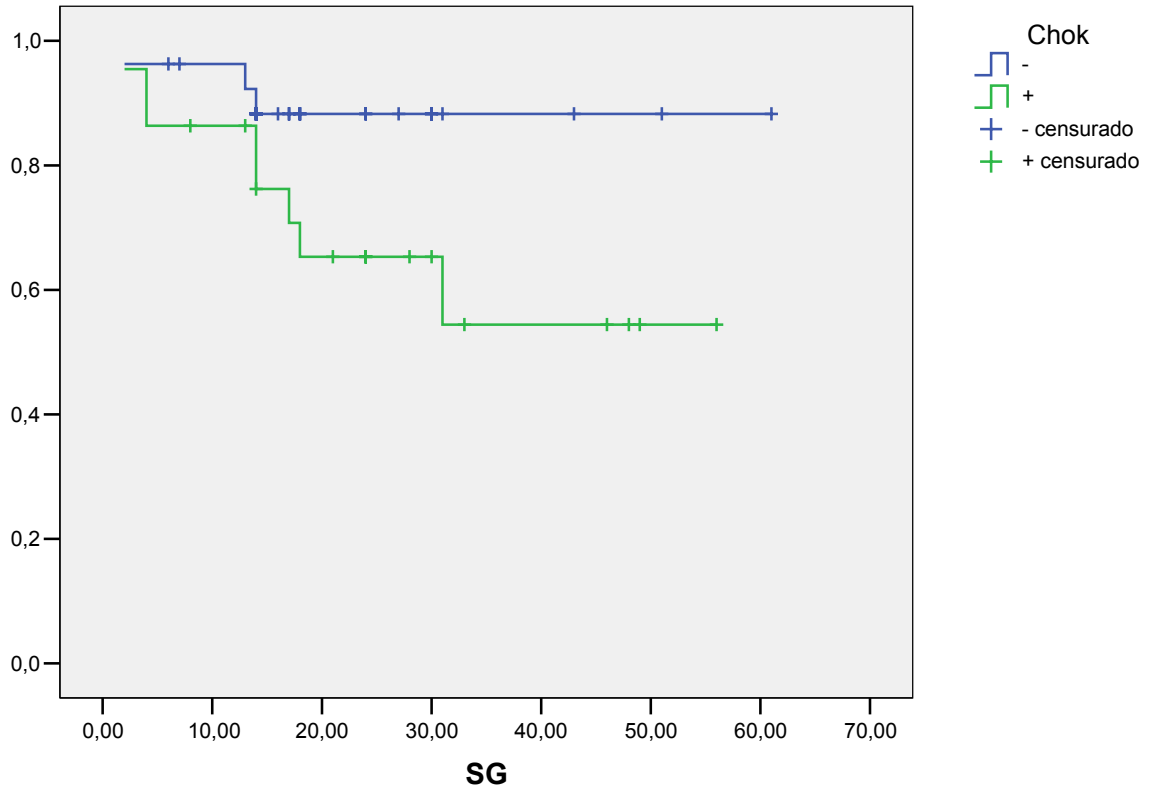


Figura 17. SG vs Chokα



No se encontró relación entre la expresión de colina-quinasa y el sexo de los pacientes, la distribución de los casos en función de estas dos variables esta representada en la tabla de contingencia correspondiente (ver tabla 5) $p=0,310$. Tampoco se demostró asociación estadística entre la expresión del ARNm y el estadio de la enfermedad (ver tabla 6), $p=0,287$. En cambio si se observó asociación estadísticamente significativa entre el subtipo histológico y la expresión de mensajero de la proteína con una $p=0,013$, la tabla de contingencia correspondiente esta representada en la tabla 7.

Tabla 5. Chokα vs Sexo.

	Sexo		Total
	H	M	
Chok -	26	2	28
+	21	4	25
Total	47	6	53

Tabla 6. Chokα vs Estadio.

	Estadios				Total
	I	II	III	IV	
Chok -	14	5	8	0	27
+	12	5	5	3	25
Total	26	10	13	3	52

Tabla 7. Chokα vs Histología.

	Histología			Total
	epidermoide	adenocarcinoma	cel. grande	
Chok -	24	3	1	28
Chok +	12	9	4	25
Total	36	12	5	53

Expresión de Chokα por inmunohistoquímica.

Como hemos demostrado en el apartado anterior, la sobre-expresión de Chokα evidenciada mediante qRT-PCR se correlaciona con una menor SLE y SG en pacientes diagnosticados e intervenidos de carcinoma no microcítico de pulmón. Este hallazgo invita a evaluar la expresión de Chokα en muestras de pacientes en estadios avanzados, de los cuales es compleja la obtención de material en condiciones adecuadas para emplear la citada tecnología. Por ello decidimos analizar la expresión de Chokα mediante inmunohistoquímica empleando un anticuerpo frente a la citada enzima. Además, el empleo de la inmunohistoquímica está ampliamente extendido por lo que su incorporación a la práctica clínica estaría prácticamente garantizada. Así, determinamos la expresión de Chokα en muestras parafinas procedentes de biopsias de 62 pacientes.

Todas las muestras tumorales expresaron Chokα. Así, las células tumorales presentaron una expresión de Chokα de manera muy intensa, en citoplasma. No observamos tinción alguna en el tejido intersticial de las áreas adyacentes a la neoplasia. En las células histológicamente normales que se correspondían con el tejido cercano al área tumoral se observó tinción en las células ciliadas epiteliales, en las glándulas bronquiales y en los neumocitos alveolares. Desde el momento en que prácticamente el 100% de las muestras era positiva para la tinción, y dada la ubicuidad del enzima, además también se observaba tinción de las células normales, fue imposible cuantificar diferencias de intensidad entre las distintas muestras e imposible, por lo tanto, establecer correlaciones con las variables clínico- patológicas recogidas. Por ello parece quedar establecido que la

metodología a utilizar para el análisis de Chok α como marcador pronóstico en cáncer de pulmón no microcítico ha de ser cuantitativa, como es el análisis de la expresión de ARNm.

Figura 18. Inmunohistoquímica de un anticuerpo frente a Chok de un caso de carcinoma epidermoide.

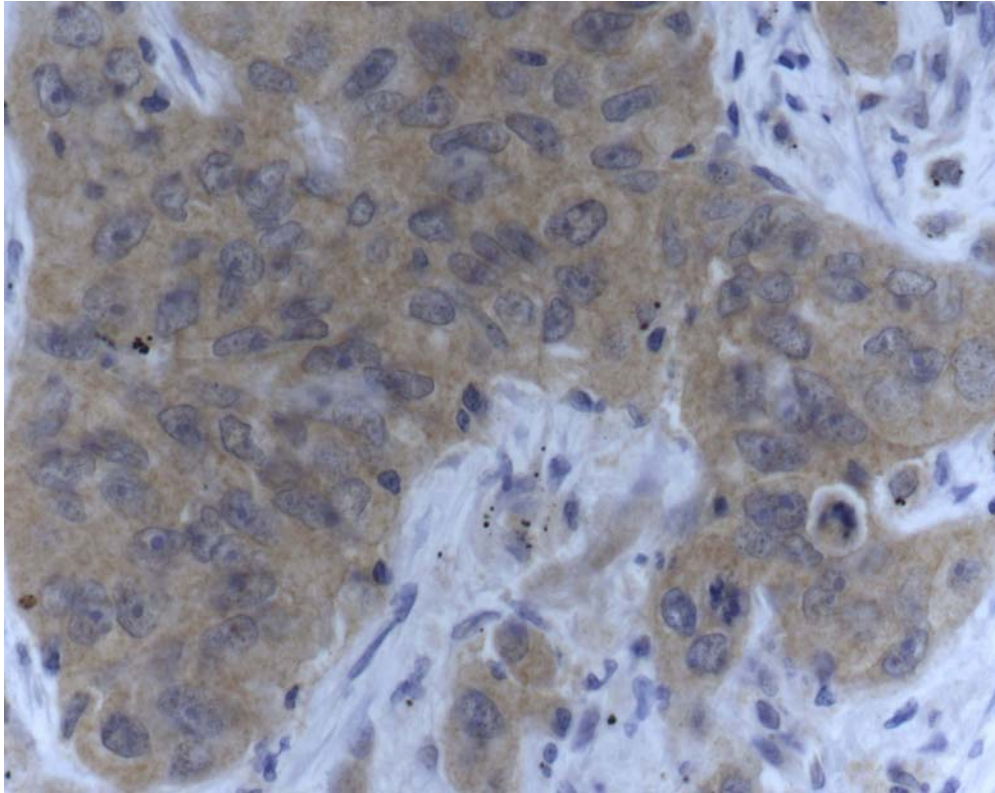
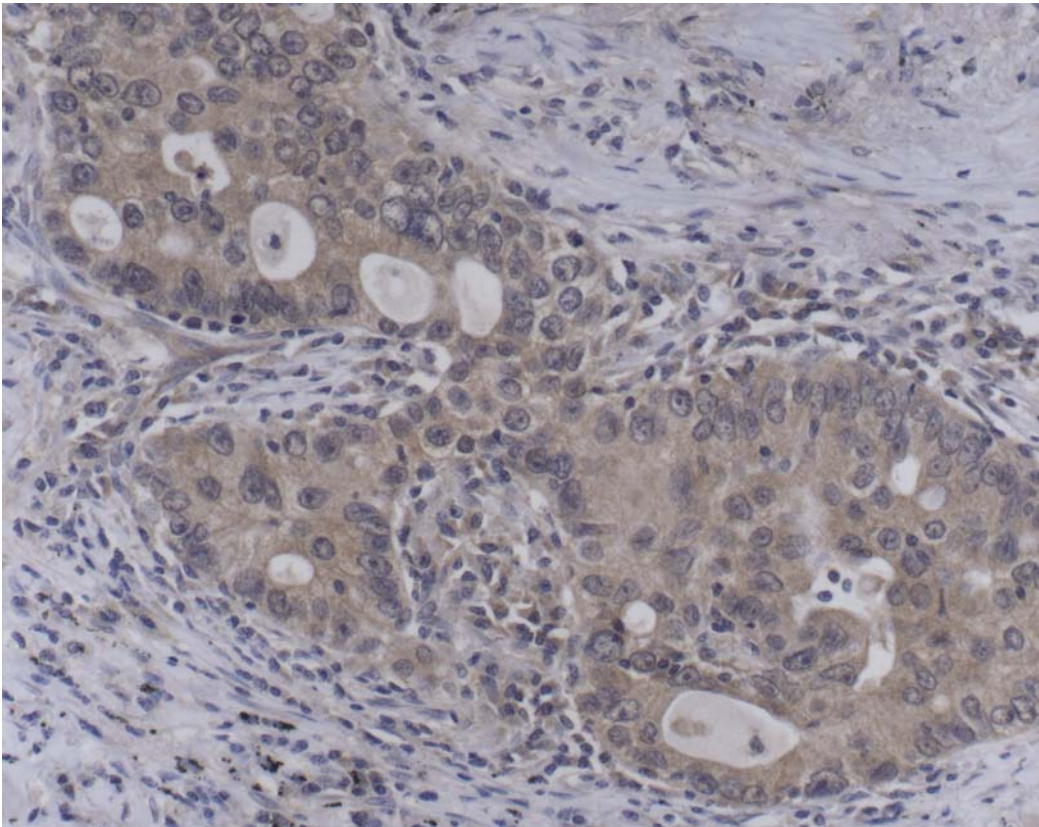


Figura 19. Inmunohistoquímica con un anticuerpo frente a Chok de un adenocarcinoma.



7. Discusión.

7. Discusión.

Nuestros resultados demuestran que la expresión de colina-quinasa analizada mediante qRT-PCR en muestras quirúrgicas procedentes de pacientes diagnosticados de carcinoma no microcítico de pulmón se correlaciona con una menor SLE y una tendencia a una menor SG. Así, la media de supervivencia libre de enfermedad en aquellos pacientes que expresan colina-quinasa es de 34 meses mientras que aquellos en los que no hemos demostrado expresión es de 52 meses durante el seguimiento realizado. Este efecto es similar en el análisis de la SG aunque no se llega a alcanzar la significación estadística. Por ello, podemos considerar que la expresión de colina-quinasa es un factor de mal pronóstico para aquellos pacientes intervenidos quirúrgicamente.

Estos datos son especialmente relevantes si consideramos que el 52,8% de todos los pacientes operados de nuestra serie expresaban colina-quinasa. Así, debemos tener en cuenta que la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global de nuestros pacientes difieren aproximadamente en 18 meses. En este sentido, si consideramos además la potencial mortalidad de la cirugía para el cáncer de pulmón, 2% de mortalidad en los primeros 30 días post-cirugía para las lobectomías y un 6% para las neumonectomías (149-152), nos surge la duda sobre la necesidad o no de la intervención en los pacientes con expresión de colina-quinasa. Evidentemente, no es aceptable metodológicamente proponer la abstención quirúrgica fundamentada en estos datos pero es una posibilidad que debería ser estudiada con profundidad en un futuro.

Por otro lado, la supervivencia de aquellos pacientes sin expresión de colina-quinasa es tan prolongada que se acerca, e incluso iguala, a la de los pacientes que han recibido quimioterapia adyuvante. En este sentido, consideramos que es igualmente relevante este evento, ya que la mayoría de pacientes sometidos a cirugía por un carcinoma no microcítico de pulmón deben recibir tratamiento con quimioterapia adyuvante ya que se ha demostrado recientemente que la tasa de recurrencias disminuye con la administración de ésta. En nuestra serie ningún paciente ha recibido tratamiento adyuvante y, aun así, la supervivencia es similar, e incluso superior a la de series históricas tratadas con quimioterapia adyuvante. Por ello, y asumiendo las inherentes limitaciones metodológicas de nuestra propuesta, consideramos que sería muy importante analizar la supervivencia de los pacientes sin expresión de colina-quinasa en presencia o ausencia de tratamiento adyuvante, ya que creemos que la administración de quimioterapia no impactaría en gran medida sobre la supervivencia. Además, este análisis permitiría por un lado que un gran número de pacientes pudiera evitar un tratamiento extremadamente tóxico y, por otro, una importante reducción del gasto sanitario de nuestro Sistema Público de Salud. En resumen, nuestros resultados en pacientes diagnosticados en estadios precoces sugieren nuevos análisis que pueden obligar a un replanteamiento de las estrategias actuales.

La presencia de colina-quinasa en los carcinomas no microcítico de pulmón de nuestra serie de pacientes coincide con datos obtenidos desde microarrays de ADN. Así, Garber et al (131) estudiaron 67 muestras tumorales obtenidas de 56 pacientes, con seguimientos durante al menos 5 años, mediante microarrays de

ADNc que incluía 24000 secuencias. Identificaron, a través de algoritmos de agrupación jerárquica de genes, patrones de expresión que permitían separar diferentes subtipos histológicos. Entre las 24000 secuencias, se encontraba Chok α , observándose una expresión distinta entre los casos de adenocarcinoma y los otros tres tipos de cáncer de pulmón. El estudio del grupo de Garber no planteaba como objetivo fundamental la identificación de marcadores pronósticos sino el estudio descriptivo sobre especímenes histológicamente distintos, por lo que no es posible una extrapolación hacia nuestros más allá de la confirmación por otra serie de la expresión del ARNm de colina-quinasa. Nuestro estudio no ha demostrado diferencias de expresión de colina-quinasa entre los distintos subtipos histológicas, lo cual coincide con los datos proporcionados por Garber et al. Consideramos que el tamaño muestral de nuestro estudio no fue lo suficientemente grande como para poder demostrar tal circunstancia por lo que no debe extraer conclusiones acerca de la relación de la expresión de Chok α y la estirpe histológica. Es más, nuestro estudio no fue diseñado para evaluar tal posibilidad. Por otro lado, el grupo de Garber planteaba la posibilidad de que un perfil génico pudiera realizar predicciones de supervivencia. A diferencia de nuestros resultados, cuando se enfrentó la capacidad pronóstica del perfil identificado por Garber y cols. en un análisis multivariante contra el sistema de clasificación TNM, fue éste último el mejor predictor del comportamiento en términos de supervivencia de toda la serie. Desconocemos los motivos por los que existen esta disparidad de resultados entre los datos proporcionados por Garber y cols. y los obtenidos en nuestra serie, aunque es más que probable que la

plataforma de alto rendimiento empleada por Garber et al pudiera estar modulando nuestras diferencias. Desde la introducción de las tecnologías de alto rendimiento en evaluación genómica se sabe que la reproductibilidad de los resultados es muy limitada. Así, cuando observamos los genes críticos identificados con estas plataformas por distintos autores detectamos que son muy pocos los que coinciden, no sólo entre las distintas marcas comerciales sino incluso con la misma marca. Con esto no queremos sugerir que la falta de reproductibilidad de los resultados obtenidos por arrays limite su valor científico, sino que en la mayoría de los casos se debe obtener una confirmación por qRT-PCR. Esta tecnología, que es la que nosotros hemos utilizado, tiene suficiente capacidad de reproducción como para poder garantizar resultados biológicamente consistentes y clínicamente sólidos. Por ello, creemos que las distintas tecnologías empleadas podrían subyacer a la explicación de las diferencias encontradas. Este hecho coincide también con otros autores que han analizado mediante tecnologías de alto rendimiento la predicción de supervivencia de pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón. Tal y como hemos descrito en la introducción, ninguno de estos trabajos ha conseguido superar a la capacidad de predicción del sistema TNM. En nuestro estudio, el tamaño muestral nos impide realizar un análisis comparativo entre el TNM y la expresión de Chok.

Estos datos en términos de mal pronóstico poseen un gran soporte biológico. En este sentido, que una enzima con importantes implicaciones en proliferación celular por factores de crecimiento y replicación se correlacione con una menor supervivencia de los pacientes intervenidos quirúrgicamente y, en general, en

estadios más precoces es razonable. Se estableció previamente, en el 2004, la relevancia de Chok y fosforilcolina en la proliferación celular inducida por factores de crecimiento. En primer lugar analizaron el comportamiento de las células del epitelio mamario humano (HMEC), en las que se observó un aumento de la producción de fosforilcolina en respuesta a EGF, insulina e hidrocortisona. Esta respuesta era inhibida completamente por MN58b, un inhibidor específico de Chok(153;154). En este trabajo también se demuestra que el incremento de la producción de fosforilcolina con relación a la sobreexpresión de Chok es suficiente para promover la síntesis de ADN por las células HMEC. También estudiaron la expresión de Chok en líneas celulares de cáncer de mama (MCF7, MDA-MB-231, T47D y SkBr3), observándose que se encuentra regulada al alza, objetivándose incrementos de su expresión en 10 veces a la de las células HMEC. La herregulina (HRG) es un factor de crecimiento implicado en la multiplicación de las células de cáncer de mama. Pero es incapaz de provocar división en las células de tejido mamario no transformado. En este trabajo se demostró que la respuesta mitogénica a HRG requiere de Chok ya que la inhibición de esta por MN58b abolía completamente la respuesta de las células tumorales de mama a este factor de crecimiento. Con este trabajo quedaba establecida la importancia de Chok en la carcinogénesis mamaria. Por otro lado, la génesis de fosfocolina a partir de colina mediada por la actividad colina-quinasa parece ser un paso esencial para que determinados factores de crecimiento como el PDGF y el bFGF ejerzan su acción mitogénica sobre fibroblastos de ratón(143;155). Este efecto se fundamenta en el hecho de que estos factores de crecimiento son incapaces de aumentar la síntesis

de ADN cuando la actividad de Chok es inhibida por el inhibidor denominado hemicolinium-3 (HC-3). Además, el suplemento exógeno de fosfocolina es capaz por si mismo de originar actividad mitogénica (138;145). La acumulación de fosfocolina como resultado de la activación de Chok ha sido estudiada en células en estadios precoces de estimulación por suero(156), prolactina(157), estrógenos(158) y en células moduladas por la actividad ras(144;159-161). En este sentido, se sugiere que la acumulación intracelular de fosfocolina por la activación de Chok es un hecho universal, que ocurre en una gran variedad de tipos celulares estimulados con diferentes factores de crecimiento. Esta circunstancia se confirma también en modelos de carcinoma de colon, estudiados por Nakagami y cols.(162;163). Así observaron el incremento de la actividad de Chok y los niveles de fosfocolina en cáncer de colón humano. Además, evidenciaron de forma paradójica que en un modelo de cáncer de colon inducido por 1,2 dimetilhidrazina, se producía un aumento de la actividad de Chok sin aumento de la síntesis de fosfocolina. El grupo del Profesor Lacal demostró, apoyando lo expuesto por el grupo japonés, el aumento de la expresión de Chok mediante Western blot en una línea celular de cáncer de colon HT-29(140). Por ello, los niveles elevados de fosforilcolina, de Chok o de la actividad de esta última son marcadores de progresión de las células tumorales. Estas alteraciones parecen relacionadas con el desbalance en la actividad de la ruta de Kennedy, que es consecuencia indirecta de los altos requerimientos de fosfatidilcolina en la mitosis tumoral. Es decir, es posible que exista una co-regulación entre el ciclo celular y la síntesis de lípidos. Aquí, la citidiltransferasa es el paso limitante en la

síntesis de fosfatidilcolina, considerándose esta enzima como una diana tumoral(164). En resumen, a mayor tasa de proliferación y división celular se requiere mayor síntesis de membranas, por lo que las enzimas encargadas de la síntesis de las mismas deberán incrementar su actividad. Así, parece razonable un incremento en esta tasa en neoplasias de mayor agresividad, evidenciada ésta como un descenso en la supervivencia de los pacientes.

El incremento de la actividad de Chok α en el carcinoma no microcítico de pulmón puede ser debido a diversos factores. Por un lado, la correlación entre la actividad de Chok α y la actividad de diversos oncogenes, muchos de ellos críticos en el desarrollo del carcinoma no microcítico de pulmón, ya ha sido analizada en profundidad (141). Así, el oncogén ras es capaz de regular la actividad de Chok en células de mamíferos independientemente de la disponibilidad de colina. Esta activación por ras implica a dos efectores de ras denominados Ral-GDS y PI3K. Ral-GDS, es un factor intercambiador de nucleótidos para Ral-GTPasas que es capaz de inducir transformación en los fibroblastos NIH3T3. PI3K y sus productos están implicados en el control de la proliferación y supervivencia celular. Estos dos efectores fueron capaces de establecer una activación parcial de Chok tanto en experimentos con transfecciones transitorias como estables. La combinación de ambas reestablecía la activación completa de Chok de la misma manera que ras, sugiriendo que ambas vías cooperan en esta activación (28). Otro grupo, ha demostrado que podría existir una tercera vía de señalización implicada ya que se ha sugerido que la sobreexpresión de Chok α en fibroblastos de ratones potencia la síntesis de ADN mediada por la insulina y el IGF-1 a través de p44/p42 MAPK y

p70/S6. En resumen, Chok puede ser activada a través de oncogenes tales como Ras, aumentando con ello la capacidad de replicación y proliferación celular, lo cual coincide en términos biológicos con los resultados obtenidos en nuestra serie de pacientes. En este sentido es importante destacar el hecho de que las mutaciones que generan una activación constitutiva de ras no son frecuentes en el carcinoma no microcítico de pulmón por lo que la actividad si Chok está activada por ras, éste debe ser inducido por eventos distintos a una mutación en su secuencia. Además, otros oncogenes como src y mos pueden incrementar la actividad endógena de Chok(161;165), por lo que es posible que en nuestros pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón sean éstos y no ras los implicados en la activación de Chok. Sin embargo, nuestro trabajo no está diseñado para resolver esta cuestión por lo que estudios futuros deberían evaluar la causa por la que Chok está activada en carcinoma no microcítico de pulmón.

Los datos obtenidos en la serie de pacientes diagnosticados en estadios avanzados y analizados mediante inmunohistoquímica sobre piezas tumorales procedentes de biopsias e incluidas en parafina fueron poco informativos ya que, como se ha descrito en el apartado Resultados, todas las muestras resultaron teñidas de la misma manera. Así, el principal interés que teníamos al analizar mediante inmunohistoquímica la presencia de Chok, era que uno de los problemas que actualmente se plantean, con el rápido avance en los métodos biotecnológicos, es la simplificación de éstos para obtener con ello una rápida implantación en la clínica diaria. Todos los esfuerzos técnicos que empleamos para obtener las mejores condiciones posibles para determinar diferencias en la

tinción de los distintos pacientes terminaron siempre de la misma manera: una tinción global en todos ellos. Además, varios anatómo-patólogos de reconocido prestigio caracterizaron, de forma similar a lo obtenido por nuestros colaboradores, todas las muestras como positivas. Por tanto no fue posible analizar las diferencias frente a ninguna de las variables que inicialmente pretendíamos evaluar.

Este es un problema que se repite en la literatura a la hora de valorar las tinciones por inmunohistoquímica. Como refiere Seidal y cols (166), cuando un anticuerpo es experimental la interpretación, si se desconoce la localización exacta microanatómica, se complica sobremanera. En cualquier caso podemos encontrar varios motivos para explicar la inmunotinción es universal:

La ubicuidad de esta proteína demostrada en ratón por los trabajos del grupo japonés(167), hace que la distinción del inmunomarcado del fondo sea muy complicada, dificultando la valoración de una intensidad de marcado diferente entre las distintas muestras.

Otro de los posibles motivos es la dificultad para establecer las condiciones ideales de aplicación de un nuevo anticuerpo (desenmascaramiento, incubación, etc), conduciéndonos en su análisis a no diferenciar el tejido tumoral del fondo.

En resumen, los datos obtenidos a través de inmunohistoquímica no permiten cuantificar la expresión de cada muestra y, por tanto, diferenciar a los pacientes, por lo que actualmente no podemos considerarla como una técnica válida para la determinación de Chokα. Mientras tanto y si se reproduce el valor pronóstico de su determinación mediante qRT-PCR, será necesario el establecimiento de centros

de referencia con acceso a esta técnica que harían de proveedores del resto del sistema sanitario.

Este trabajo abre nuevas posibilidades estratégicas dentro del carcinoma no microcítico de pulmón. La determinación de Chok permite la identificación de dos grupos de pacientes: existen pacientes beneficiables de la cirugía y de la adyuvancia con los esquemas estándar, mientras que existen otros enfermos beneficiables de la inhibición de Chok, ya que sus niveles elevados se asocian a una supervivencia similar a las series de pacientes no intervenidos y que no mejorarían con la cirugía.

Aunque la resección quirúrgica es la mejor modalidad terapéutica para los pacientes con estadios precoces de CPCNP, se ha observado que incluso pacientes con el mismo estadio presentan una gran disparidad en recurrencia y supervivencia. Incluso después de la cirugía una proporción no despreciable de pacientes recaen. El establecimiento como estándar de tratamiento en cáncer de pulmón no microcítico intervenido de la quimioterapia adyuvante(52;168) otorga una gran relevancia a trabajos que exploran nuevos factores pronósticos, debido a que el beneficio atribuible a este tratamiento oscila entre un 4% y un 15%. La actual tendencia a la mejor selección de la población susceptible de beneficiarse de un tratamiento potencialmente tóxico hace que los resultados de este trabajo queden subrayados. Podemos plantear en base a los resultados obtenidos tras las sucesivas y oportunas verificaciones un ensayo clínico de adyuvancia. Es decir, podríamos proyectar un ensayo en que, tras el análisis de la expresión de Chok, asignáramos al grupo que sobreexpresa esta molécula un tratamiento adyuvante,

ya que hemos objetivado en este trabajo que la sobreexpresión predice una futura recaída, mientras que el grupo en el que no se sobreexpresa muy probablemente solo fuera necesario realizar un seguimiento clínico. Otra posibilidad sería la de utilizar un esquema más agresivo de quimioterapia adyuvante en el grupo de peor pronóstico, es decir el Chokα positivo. En resumen, este tipo de trabajo nos permite identificar un grupo de pacientes que tras la cirugía se beneficiaría de una quimioterapia adyuvante lo más eficaz posible.

Las posibilidades de personalización del tratamiento que ofrece este trabajo, ya que los resultados permiten seleccionar una subpoblación de pacientes que se beneficiaría teóricamente de una terapia adyuvante más agresiva, genera un abanico de beneficios para el sistema de salud.

En primer lugar nos permite distinguir una población que se va a beneficiar claramente del tratamiento adyuvante, frente a otra, aproximadamente un 47,2%, que probablemente este suficientemente tratada con la cirugía exclusivamente. Lo que, *a priori*, disminuiría el gasto sanitario que supone el sobretratar a los pacientes. Además, evitamos el riesgo derivado de las posibles toxicidades generadas por el tratamiento.

El desarrollo de una nueva molécula frente a esta nueva diana permitirá aumentar el arsenal frente al CPCNP, que como se ha expuesto en sucesivas ocasiones en este trabajo en 20 años ha pasado de una tasa de curación global del 15% al 16%.

La aparición de un posible nuevo fármaco frente a una diana selectiva, contribuye a disminuir la toxicidad global de los tratamientos clásicos de

quimioterapia. Consiguiendo aumentar el balance riesgo/beneficio a favor de este segundo, objetivo este primordial de la oncología médica.

El objetivo de todas las drogas antitumorales es alcanzar una alta especificidad frente a las células tumorales, sin afectar a las células normales. La observación del metabolismo lipídico en consonancia con la activación de la mitosis, ha animado el desarrollo de la inhibición del metabolismo de la fosfatidilcolina a diferentes niveles.

La primera molécula descrita con capacidad para inhibir la colina-quinasa ha sido el hemicolinium-3(HC-3), un fragmento de la colina sustrato de Chok, con el inconveniente de que solo es efectivo “in vitro” cuando se añade 4-6 horas después de ser estimulados los cultivos celulares con factores de crecimiento. Está molécula es altamente tóxica “in vivo”.

En colaboración con distintos grupos de química médica, el grupo del profesor Lacal puso en marcha un programa de desarrollo de inhibidores de Chok. El HC-3 se utilizó inicialmente para la síntesis de análogos. Introduciéndose derivados quinolínicos e isoquinolínicos. Consiguiendo un incremento en la actividad de 50 veces en modelos “ex vivo” y de 600 veces en modelos celulares. Estos nuevos compuestos han demostrado mayor capacidad inhibitoria en células transformadas que presentan altos niveles de fosforilcolina en comparación con sus parientes no transformadas. Estos compuestos demostraron tener un menor efecto tóxico en ratones, en comparación con el HC-3, lo que permitió la experimentación en líneas celulares tumorales humanas y en ratones atímicos. Se

alcanzó una actividad antitumoral “in vivo” del 70-80% de inhibición del crecimiento celular de los explantes(169).

Por otro lado, durante el estudio y caracterización de Chok se describieron otras drogas con capacidad inhibitoria. Entre ellas están los análogos de colina: mostaza de etil-colina, mostaza de etil-colina con ion aziridinium (AF64A, MEChAz), butirilcolina, clorocolina, propionilcolina, tiocolina, ametilcolina, colina-selenio, CDP_colina, etanolamina, N,N-dimetil-N-propiletanolamina, dimetiletanolamina (DME), monometiletanolamina (MME), N-metil-2-hidroximetilpiperidina, betaína, metionina, tetrametilamonio, purinil-6-histamina, tetraetilamonio, N-(2-bromocianil (amino) etil)-5-isoquinolinasulfonamida (H89) y malation(170-177). Como la actividad de Chok requiere ATP y magnesio, otra posibilidad de inhibir esta enzima es desplazar estas dos moléculas, una o ambas(178). La adenosina es un inhibidor de esta enzima, de manera competitiva frente a MgATP. Las moléculas que pueden competir con el magnesio son el mercurio, el plomo y el manganeso(177). Algunos análogos del ATP también son inhibidores del enzima 5,5'-ditiobis (2-acido nitrobenzoico), N-etilmaleimida, KF y estearil-CoA(179). Un inhibidor irreversible sería el AF64A, este es letal para el organismo.

Sin embargo, el compuesto más desarrollado y altamente específico es el MN58b. El mecanismo por el cual la inhibición de la producción de fosforilcolina bloquea la síntesis de ADN todavía no está esclarecida, parece que produce un bloqueo en la fosforilación del gen Rb específicamente en la células tumorales. En estudios con linfocitos la adición del MN58b provoca una parada en el ciclo celular

en G0/G1. Esto sugiere que la inhibición de Chok interfiere en el ciclo celular antes de que la célula alcance la fase S. En los linfocitos estimulados mediante IL-2 en presencia de MN58b se produce un descenso en la fosforilación de la pRb. Es decir, a pesar de la utilización de estimuladores de la mitosis las células continúan quiescentes.

La inhibición de la actividad intracelular de Chok causa un drástico descenso en la concentración de fosforilcolina en las células normales, sin que se observe una traducción en la cantidad de fosfatidilcolina sintetizada. En las células tumorales, la inhibición de este enzima no tiene repercusión en la fosforilación de la pRB, las células no se paran en la transición G0/G1, sino que se produce apoptosis, apoyando esta observación la medición de la degradación de poli-ADP-ribosa-polimerasa (PARP) y ADN. Incluso se ha objetivado la activación de la caspasa 9 procedente de la degradación de PARP como consecuencia de la activación del apoptosoma. Al igual que en los linfocitos, se observa una drástica disminución de fosforilcolina, pero, en este caso, si se traduce también en una disminución de los niveles de fosfatidilcolina y esfingomielina. Como consecuencia se ocasiona un desbalance frente a la producción de ceramidas, compuestos de la degradación de la esfingomielina. En este sentido las ceramidas se han asociado a la promoción de apoptosis por lo que es posible que estén implicadas en la inducción de ésta. Así, parece que el incremento de los niveles de fosforilcolina puede ser un marcador del estatus de la célula en la transición G1/S. En las células tumorales la inhibición del enzima disminuye la producción de fosforilcolina que posteriormente se traduce en una disminución de CDP-colina y

finalmente provoca la disminución de la síntesis de fosfolípidos de membrana. Estos efectos no se observan en las células no tumorales. Así, la diferencia entre las células transformadas y las normales estriba en que en las primeras no se produce una parada del ciclo celular manteniéndose activos los requerimientos de fosfolípidos de membrana. En conclusión, las células normales pasa a un estado quiescente reversible al inhibir la Chok, mientras que en las células tumorales se produce una activación de la apoptosis que es irreversible. Esto es debido a que en las células transformadas se desencadena una alteración metabólica al no impedirse el avance en el ciclo celular, en la que la necesidad de fosforilcolina para la síntesis de fosfatidilcolina causa la degradación de la esfingomielina formándose ceramidas. Por tanto, podríamos considerar la inhibición de Chok α como un sistema viable desde el punto de vista terapéutico humano. Así, estos datos en combinación con los obtenidos en este trabajo soportan claramente que una vez terminados los estudios preclínicos, sea en pacientes diagnosticados de carcinoma no microcítico de pulmón donde testar por primera vez el citado fármaco.

Todo lo anteriormente expuesto en conjunto con estos resultados sugieren que la expresión de Chok α es un factor de mal pronóstico en pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón en estadios precoces. Además, todos los datos biológicos expuestos soportan claramente estos resultados. Sin embargo, nuestro trabajo tiene una serie de limitaciones. En primer lugar, debemos destacar que los datos obtenidos en este estudio sobre el cáncer de pulmón no microcítico surgen del estudio retrospectivo de pacientes operados a los cuales, a partir de

una muestra congelada, se determina por qRT-PCR la expresión de Chokα. Tanto la tecnología empleada como las limitaciones propias de un estudio retrospectivo deben ser analizadas para determinar el valor real de los resultados ofrecidos. Así, las curvas de supervivencia (SLE y SG) representadas por el método de Kaplan-Meier y los test log-rank que comparan las representaciones gráficas de ambos grupos, alumbran un resultado estadísticamente significativo cuanto a la SLE y una clara tendencia en el caso de la SG que conceden una supervivencia opuesta en función de la expresión de Chokα, de tal manera que aquellos pacientes que expresan el ARNm de Chokα tienen un claro peor pronóstico frente aquellos que no lo expresan. Los datos retrospectivos pueden tener importantes limitaciones metodológicas por lo que cada uno de los factores pronósticos conocidos en el carcinoma no microcítico de pulmón deben ser analizados. Por ejemplo, se sabe que el estadio es el factor pronóstico más importante en este tipo de tumor. De esta manera, la validez de los datos estaría claramente robustecida si en ausencia de la variable explicativa que nosotros evaluamos, el estadio fuera factor pronóstico en un análisis univariante dentro de nuestra serie. Se ha observado la asociación clara tanto en el análisis univariante como en el multivariante del estadio con la SLE y la SG, con la salvedad de que hemos encontrado uno de los grupos pronósticos, aquellos pacientes con estadio III que tienen un pronóstico tanto en recaída como en supervivencia global mucho más favorable de lo esperado. Durante toda la redacción de este trabajo se ha insistido en que el único factor pronóstico sólido, hasta el momento actual es el estadio basado en el TNM, entonces: ¿por qué el estudio aunque encuentra significación estadística no

clasifica según lo esperado al grupo de estadios III? La principal tesis es la del tamaño muestral, un tamaño muestral reducido como es el caso, no permite detectar diferencias de pronóstico reducidas, condicionándose la posibilidad de encontrar estas diferencias por el tamaño de los subgrupos. La distribución de los casos entre los distintos estadios es: I:26, II:10, III:13 y IV:3. Esta distribución condiciona un claro desbalance entre los distintos subgrupos, lo que aunque permite alcanzar significación al estudiar el estadio quizá no elude la aparición de sesgos de selección dentro de cada subgrupo. Observándose en el análisis de las curvas de supervivencia que los pacientes en estadio II tienen en nuestra muestra peor pronóstico que aquellos que presentan estadio III, claramente tenemos un sesgo de selección ya que el escaso número ha podido condicionar que se hayan seleccionado pacientes con un anormal peor pronóstico. O de otra manera puede ser que el escaso número de pacientes en estadio III en nuestra muestra tienen un extraordinario buen pronóstico. Otros factores que han podido condicionar este resultado es el sesgo de selección cometido por los cirujanos al solo operar pacientes con estadios III si su situación general fuera excelente, realizando una selección más cuidadosa de los enfermos con estadios IIIA que probablemente tendrían una menor comorbilidad que los pacientes seleccionados para una cirugía con una menor carga tumoral. Esto es comprensible ya que los estadios IIIA irán preferentemente a una neumonectomía mientras que los estadios I y II podrán ser abordados mediante una lobectomía. En el subgrupo de pacientes en estadio IIIB se produce de nuevo una selección muy cuidadosa de los enfermos sometidos a cirugía, ya que en general se unen dos condiciones muy restrictivas:

una muy buena respuesta a la quimioterapia de inducción y de nuevo una escasa comorbilidad. Estos problemas se asumen cuando se realiza un estudio retrospectivo piloto como es el caso.

Por otro lado, la tecnología empleada en el análisis de muestras quirúrgicas puede generar limitaciones en términos de reproducibilidad. En primer lugar, al ser una técnica relativamente novedosa nos encontramos que los distintos grupos de investigadores realizan sus experimentos en lo básico de manera similar pero con ciertos detalles que los diferencian, por lo que la falta de estandarización debe ser considerada una importante limitación. Por ejemplo, la elección de los genes *housekeeping* marcará los valores de referencia sobre los que después se va a establecer el ΔCt de la muestra. La complejidad de esta forma de análisis se concreta en la dificultad para reproducir estos estudios por distintos laboratorios, conduciendo en el momento actual a la búsqueda de consensos inter-laboratorios que permita la generalización de este tipo de estudios.

En cualquier caso al tratarse de un estudio piloto, los resultados obtenidos son prometedores, ya que con independencia del tamaño muestral se ha obtenido una diferencia claramente significativa entre ambos grupos tanto para la SLE. Así los pacientes que sobre-expresan Chok α mediante qRT-PCR tienen un claro peor pronóstico. Además, la plausibilidad biológica con la que este modelo se manifiesta en las distintas fases de estudio preclínicas, y en los distintos tumores genera un importantísimo soporte a la principal conclusión de nuestro trabajo. Finalmente, indicar que este trabajo puede ser empleado como fundamento para la validación de la potencia predictora que posee la determinación de Chok α

mediante qRT-PCR en otras series más numerosas y de otras instituciones y, en segundo lugar, validar los datos obtenidos en ensayos clínicos aleatorizados.

8. Resumen.

8. Resumen.

El cáncer de pulmón es la causa más frecuente de muerte por cáncer a escala mundial(1-4). Además el número de casos y de muertes por cáncer de pulmón ha estado aumentando año tras año durante más de la mitad del siglo pasado, provocando más de 600.000 muertes en 1995. Se prevé que este número continúe incrementándose durante las primeras décadas del presente siglo (4;5). En España, se diagnostican 18.500 nuevos casos al año y ha sido responsable de 17.308 muertes en el año 2000(6). Esto supone una prevalencia aproximada de 24.000 casos/año, lo cual refleja la altísima letalidad de este tumor. Así, menos del 15% de los pacientes logran sobrevivir cinco años tras el diagnóstico.

El CPCNP puede ser tratado con éxito mediante resección quirúrgica cuando se encuentra localizado. En el caso de la enfermedad localmente avanzada, la quimioterapia basada en el cisplatino es efectiva, consiguiendo mejorar la supervivencia y la calidad de vida. En la enfermedad avanzada el empleo de combinaciones de dos fármacos quimioterápicos es la mejor opción terapéutica. Los recientes avances en el uso de fármacos antiangiogénicos y el mejor conocimiento del receptor EGFR y la población susceptible de responder al tratamiento de fármacos contra esta diana, está permitiendo mejorar la evolución de determinados pacientes con cáncer de pulmón (aquellos con histología no epidermoide o con mutaciones del EGFR que sensibilizan frente al uso de pequeñas moléculas frente a este receptor). Sin embargo, la supervivencia global de este tipo de enfermedad ha pasado de ser de un 15% a un 16% en los últimos

20 años(52). Esta situación demuestra la necesidad de definir lo más finamente posible la situación de la enfermedad en cada enfermo. La heterogeneidad de los pacientes incluidos en cada estadio y su dispar pronóstico y evolución esta animando a los distintos grupos investigadores a encontrar nuevos factores pronósticos que sean capaces de conducirnos hacia un tratamiento lo más personalizado posible.

Chok α es la enzima responsable de la síntesis de PCho, y esta implicada tanto en procesos metabólicos como en proliferación celular (137;142). Varios estudios han demostrado su implicación en el desarrollo de diversos tumores entre los que se encuentra el cáncer de pulmón(140). Recientemente se ha establecido Chok α como un nuevo oncogén que interviene en la transformación tumoral de las células humanas, induciendo tumorigénesis “in vivo”(135).

En el presente trabajo se pretende establecer Chok α como un nuevo marcador pronóstico molecular que ayude a implementar la clasificación de los CPCNPs, con la intención de seguir avanzando hacia un tratamiento personalizado del cáncer de pulmón.

Se establecieron dos subgrupos de pacientes diagnosticados de carcinoma no microcítico de pulmón para realizar evaluaciones biológicas diferentes. Por un lado, existía un subgrupo de pacientes diagnosticados de CPCNP intervenidos quirúrgicamente (n=53) en los que se realizó la determinación por TaqMan. Por otro lado, el subgrupo de pacientes en estadios avanzados (n=62) se empleó para realizar el estudio con inmunohistoquímica. El motivo de esta selección radicó en

la necesidad de disponer de muestras tisulares fijadas mediante congelación para proceder a la extracción de ARNm.

Los resultados obtenidos demuestran que la expresión de colina-quinasa, analizada mediante qRT-PCR en muestras quirúrgicas procedentes de pacientes diagnosticados de carcinoma no microcítico de pulmón, se correlaciona con una menor SLE. Por ello, podemos considerar que la expresión de colina-quinasa es un factor de mal pronóstico, en cuanto a la recaída, para aquellos pacientes tratados mediante cirugía. Los datos obtenidos a través de inmunohistoquímica no permiten diferenciar a los pacientes, por lo que actualmente no podemos considerarla como una técnica válida para la determinación de Chok α .

La plausibilidad biológica con la que este modelo se manifiesta en las distintas fases de estudio preclínicas, y en los distintos tumores genera un importantísimo soporte a la principal conclusión de nuestro trabajo. Finalmente, indicar que este trabajo puede ser empleado como fundamento para la validación de la potencia predictora que posee la determinación de Chok α mediante qRT-PCR en otras series más numerosas y de otras instituciones y, en segundo lugar, validar los datos obtenidos en ensayos clínicos aleatorizados.

9. Conclusiones

9. Conclusiones:

1. Se ha detectado la sobreexpresión de Colina-quinasa mediante qRT-PCR sobre muestras en fresco de carcinoma no microcítico de pulmón intervenido quirúrgicamente en un 52,8% de los pacientes.

2. Un incremento del número de copias de ARNm de este nuevo oncogén se asocia con una menor supervivencia libre de enfermedad con una $p=0,05$, en el grupo pacientes intervenidos quirúrgicamente.

3. La sobreexpresión de colina-quinasa, medida mediante qRT-PCR, en pacientes intervenidos quirúrgicamente presenta una tendencia a la asociación con menor supervivencia global ($p=0,07$).

4. El estadio, en función de la clasificación TNM, se asocia a la supervivencia libre de enfermedad en los pacientes intervenidos quirúrgicamente con una significación estadística de $p=0,003$.

5. El estadio, en función de la clasificación TNM, se asocia a la supervivencia global en los pacientes intervenidos quirúrgicamente con una significación estadística de $p=0,003$.

6. La expresión de colina-quinasa se relaciona, con el subtipo histológico, en el grupo de pacientes intervenidos quirúrgicamente.

7. La determinación por inmunohistoquímica de la expresión de colina-quinasa dio como resultado la tinción de la totalidad de los casos incluidos en estadios avanzados de carcinoma no microcítico de pulmón.

8. Los datos obtenidos a través de inmunohistoquímica no permiten diferenciar a los pacientes, por lo que actualmente no podemos considerarla como una técnica válida para la determinación de colina-quinasa.

9. Este trabajo puede ser empleado como fundamento para la validación de la potencia predictora, que posee la determinación de Chok α mediante qRT-PCR, en otras series más numerosas y de otras instituciones.

10. Apéndice.

10. qRT-PCR.

La PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) es una técnica que nos permite amplificar una secuencia de nucleótidos determinada. Esta amplificación se fundamenta en la complementariedad de las bases nucleotídicas y la capacidad de separación de la doble hélice a ciertas temperaturas. La reacción se lleva a cabo en un termociclador y consiste en la amplificación de una secuencia de ADN mediante la utilización de una enzima que actúa a temperaturas superiores a los 70°C, denominada Taq polimerasa. Para que la enzima pueda comenzar a copiar la secuencia problema de ADN es necesaria la utilización de una pareja de oligonucleótidos, llamados cebadores o *primers*, que hibridan específicamente con dicha secuencia. Cada ciclo de la hibridación consta de los siguientes pasos:

- Desnaturalización de la doble cadena de ADN, que se realiza por aumento de la temperatura hasta 95°C.
- Anillamiento o hibridación de los oligonucleótidos a las cadenas sencillas (la temperatura varía dependiendo de las secuencias del oligonucleótido)
- Copia de la cadena molde por la enzima Taq polimerasa, que se realiza entre 55 y 75°C.

Al duplicarse la cantidad de ADN amplificado en cada ciclo se producirá un aumento exponencial del número de copias del ADN problema, que facilitará el estudio posterior del mismo.

La RT-PCR es una variante de la PCR que permite el análisis de ARNm mediante su conversión en ADNc por una enzima ADN polimerasa llamada transcriptasa inversa.

La RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) permite medir el producto de la PCR directamente a medida que se va acumulando(180;181). Además de los cebadores directo y reverso de la reacción de PCR, este sistema utiliza una sonda, que consiste en un oligonucleótido complementario de la secuencia que se va a amplificar marcado con una sustancia fluorescente (F) y una sustancia (Q) que suprime esta fluorescencia. Durante la fase de extensión de la PCR no existe fluorescencia mientras la sonda este intacta, ya que es suprimida por la proximidad de la sustancia Q. Una vez la amplificación se produce, la sonda se degrada por la actividad 5'-3' exonucleasa de la Taq polimerasa, y la sustancia fluorescente deja de ser suprimida por la sustancia Q. (Figura 1).

De esta forma, con cada ciclo de la PCR se producirá un incremento de la señal fluorescente hasta que la curva alcanza una meseta. El ciclo de PCR en el que la fluorescencia alcanza un valor umbral de 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia basal es el que se toma de referencia para la medida cuantitativa. Este ciclo se denomina ciclo umbral o *threshold cycle* (Ct) y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de secuencia a amplificar. (Figura2)(182-184).

En Oncología el tipo de análisis que se realiza de estos datos es la cuantificación relativa, en la que se comparan los niveles de expresión de un

determinado gen entre dos o más muestras para identificar el número de veces que se expresa más o menos un gen en una muestra respecto a la otra.

Existe en el mercado, productos para el análisis de la expresión génica por qRT-PCR, consistentes en colecciones de sondas y cebadores prediseñados que permiten la cuantificación específica de cualquier gen descrito en las bases de datos. Además existen unos dispositivos denominados tarjetas microfluídicas que permiten realizar el análisis de la expresión de múltiples genes simultáneamente.

Para la realización de este tipo de estudios se debe seleccionar además del gen problema uno o varios genes de referencia, también llamado control endógeno o *housekeeping*, es aquel cuya expresión, *a priori*, no varía de un caso a otro, por lo que permitiría garantizar la existencia de una misma cantidad de ARNm en las distintas muestras estudiadas. En nuestro estudio se utilizó la subunidad 18S de la ARN ribosomal (18S) y el gen GADPH.

Descripción del método.

A) Aislamiento del ARN total:

El ARN total fue extraído de las muestras congeladas con Trizol Reagent (Invitrogen). Siguiendo el protocolo de la casa comercial.

La concentración y pureza del ARN total aislado se determinó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

B) Síntesis de ADN complementario.

Para la preparación del ADNc se utilizó 1µg de ARN total con el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) durante 2 horas a 37°C.

C) Reacción qRT-PCR.

El análisis del ADNc se llevó a cabo por triplicado utilizando el ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems). Como controles internos se utilizó el ARNm de GADPH y la fracción ribosomal 18S amplificándose conjuntamente con el de Chok α . Como soporte se utilizaron tarjetas microfluídicas.

D) Medición de la expresión génica.

El gen de Chok α se analizó en paralelo con el gen de referencia 18S. Los datos del ciclo umbral o Ct para cada muestra fueron generados a través del software específico SDS versión 2.1 (Applied Biosystems). Los cambios existentes en la expresión génica fueron calculados con el mismo software, utilizando el método Δ Ct. Para ello se determinó en primer lugar el valor Δ Ct del gen Chok α de las 40 muestras y la muestra calibradora.

$$\Delta\text{Ct Chok}\alpha \text{ en muestra } n = \text{Ct Chok}\alpha \text{ en muestra } n - \text{Ct } 18\text{S en muestra } 1$$

Una vez obtenidos estos datos se calculó el punto de corte a partir del cual se considera sobre-expresión del ARNm de Chok α en función de la curva COR de distribución de los valores de Δ Ct, eligiendo un punto de corte con la mayor sensibilidad y con una menor pérdida de especificidad que se encontrara siempre

por encima del nivel de expresión de Chokα en una muestra comercial de tejido de pulmón normal.

Figura 20. RT-PCR cuantitativa.

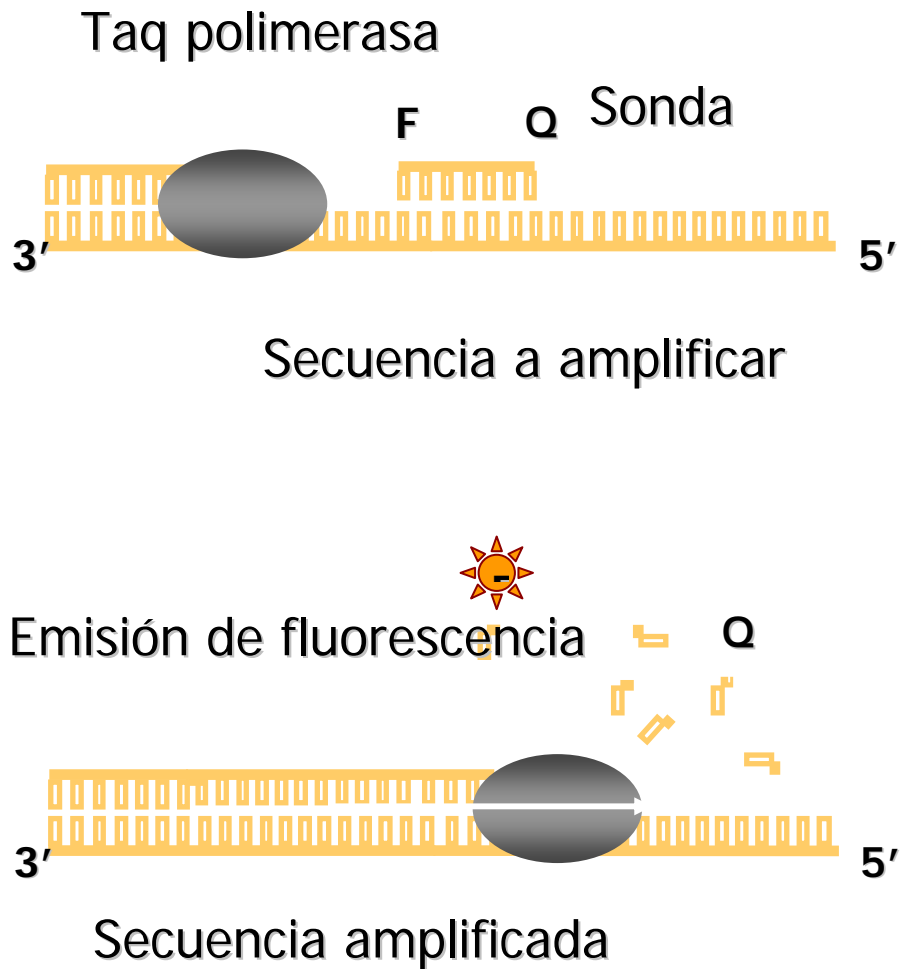
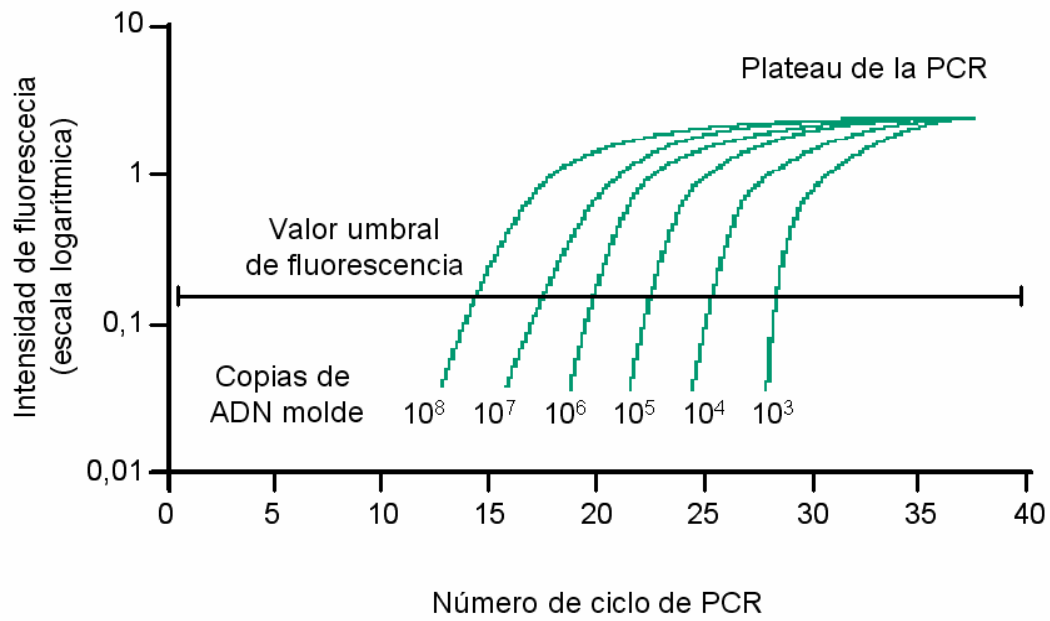


Figura 21. RT-PCR cuantitativa.



11. Bibliografía

Bibliografía

- (1) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2):74-108.
- (2) Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer* 1996; 77(12):2464-2470.
- (3) Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56(2):106-130.
- (4) Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 2005; 23(14):3175-3185.
- (5) Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C, Jr. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 1992; 339(8804):1268-1278.
- (6) Lopez-Abente G, Pollan M, Aragones N, Perez GB, Hernandez B, V, Lope V et al. [State of cancer in Spain: incidence]. *An Sist Sanit Navar* 2004; 27(2):165-173.
- (7) Adler L. Primary malignant growth of the lungs and bronchi. New York: Longmans-Green, 1912.

- (8) Doll R. Lung cancer and cigarette smoking. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1959; 15(2):417-423.
- (9) Doll R. Smoking and lung cancer. Report to the Sub-Committee for the Study of the Risks of Cancer from Air Pollution and the Consumption of Tobacco. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1959; 15:1283-1296.
- (10) Doll R, Peto R. Mortality in relation to smoking: 20 years' observations on male British doctors. *Br Med J* 1976; 2(6051):1525-1536.
- (11) Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *Br J Cancer* 2005; 92(3):426-429.
- (12) Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc* 1950; 143(4):329-336.
- (13) Wynder EL, Graham EA. Etiologic factors in bronchiogenic carcinoma with special reference to industrial exposures; report of eight hundred fifty-seven proved cases. *A M A Arch Ind Hyg Occup Med* 1951; 4(3):221-235.
- (14) Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 2004; 328(7455):1519.
- (15) Samet JM. The 1990 Report of the Surgeon General: The Health Benefits of Smoking Cessation. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(5):993-994.

- (16) Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996; 274(5286):430-432.
- (17) Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M et al. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(10):803-811.
- (18) Janerich DT, Thompson WD, Varela LR, Greenwald P, Chorost S, Tucci C et al. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N Engl J Med* 1990; 323(10):632-636.
- (19) Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ* 1997; 315(7114):980-988.
- (20) Dalager NA, Pickle LW, Mason TJ, Correa P, Fontham E, Stemhagen A et al. The relation of passive smoking to lung cancer. *Cancer Res* 1986; 46(9):4808-4811.
- (21) Chen CL, Hsu LI, Chiou HY, Hsueh YM, Chen SY, Wu MM et al. Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: a follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *JAMA* 2004; 292(24):2984-2990.
- (22) Brown SC, Schonbeck MF, McClure D, Baron AE, Navidi WC, Byers T et al. Lung cancer and internal lung doses among plutonium workers at the Rocky Flats Plant: a case-control study. *Am J Epidemiol* 2004; 160(2):163-172.

- (23) Beckett WS. Epidemiology and etiology of lung cancer. *Clin Chest Med* 1993; 14(1):1-15.
- (24) Coultas DB, Samet JM. Occupational lung cancer. *Clin Chest Med* 1992; 13(2):341-354.
- (25) Sorahan T, Williams SP. Mortality of workers at a nickel carbonyl refinery, 1958-2000. *Occup Environ Med* 2005; 62(2):80-85.
- (26) Smith AH, Goycolea M, Haque R, Biggs ML. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol* 1998; 147(7):660-669.
- (27) Wild P. Lung cancer risk and talc not containing asbestiform fibres: a review of the epidemiological evidence. *Occup Environ Med* 2006; 63(1):4-9.
- (28) Warnock ML, Isenberg W. Asbestos burden and the pathology of lung cancer. *Chest* 1986; 89(1):20-26.
- (29) van Loon AJ, Kant IJ, Swaen GM, Goldbohm RA, Kremer AM, van den Brandt PA. Occupational exposure to carcinogens and risk of lung cancer: results from The Netherlands cohort study. *Occup Environ Med* 1997; 54(11):817-824.
- (30) Weiss W. Asbestosis: a marker for the increased risk of lung cancer among workers exposed to asbestos. *Chest* 1999; 115(2):536-549.

- (31) Weiss W. The cigarette factor in asbestosis. *Chest* 1990; 97(4):769-770.
- (32) Camus M, Siemiatycki J, Meek B. Nonoccupational exposure to chrysotile asbestos and the risk of lung cancer. *N Engl J Med* 1998; 338(22):1565-1571.
- (33) Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* 2005; 330(7485):223.
- (34) Li X, Hemminki K. Familial multiple primary lung cancers: a population-based analysis from Sweden. *Lung Cancer* 2005; 47(3):301-307.
- (35) Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Gudbjartsson DF, Jonsson HH, Kristjansson K, Arnason S et al. Familial risk of lung carcinoma in the Icelandic population. *JAMA* 2004; 292(24):2977-2983.
- (36) Law MR. Genetic predisposition to lung cancer. *Br J Cancer* 1990; 61(2):195-206.
- (37) Amos CI, Caporaso NE, Weston A. Host factors in lung cancer risk: a review of interdisciplinary studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992; 1(6):505-513.
- (38) Broman K, Pohlabeln H, Jahn I, Ahrens W, Jockel KH. Aggregation of lung cancer in families: results from a population-based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol* 2000; 152(6):497-505.

- (39) Li X, Hemminki K. Inherited predisposition to early onset lung cancer according to histological type. *Int J Cancer* 2004; 112(3):451-457.
- (40) Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* 2005; 93(7):825-833.
- (41) Ooi WL, Elston RC, Chen VW, Bailey-Wilson JE, Rothschild H. Increased familial risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1986; 76(2):217-222.
- (42) Boone CW, Kelloff GJ, Malone WE. Identification of candidate cancer chemopreventive agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: a review. *Cancer Res* 1990; 50(1):2-9.
- (43) Woodson K, Tangrea JA, Barrett MJ, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Serum alpha-tocopherol and subsequent risk of lung cancer among male smokers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(20):1738-1743.
- (44) Hubbard R, Venn A, Lewis S, Britton J. Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(1):5-8.
- (45) Samet JM, Humble CG, Pathak DR. Personal and family history of respiratory disease and lung cancer risk. *Am Rev Respir Dis* 1986; 134(3):466-470.

- (46) Travis WD. Pathology of lung cancer. *Clin Chest Med* 2002; 23(1):65-81, viii.
- (47) Yesner R, Carter D. Pathology of carcinoma of the lung. Changing patterns. *Clin Chest Med* 1982; 3(2):257-289.
- (48) Madri JA, Carter D. Scar cancers of the lung: origin and significance. *Hum Pathol* 1984; 15(7):625-631.
- (49) Barsky SH, Huang SJ, Bhuta S. The extracellular matrix of pulmonary scar carcinomas is suggestive of a desmoplastic origin. *Am J Pathol* 1986; 124(3):412-419.
- (50) Mountain CF. The international system for staging lung cancer. *Semin Surg Oncol* 2000; 18(2):106-115.
- (51) Mountain CF. Staging classification of lung cancer. A critical evaluation. *Clin Chest Med* 2002; 23(1):103-121.
- (52) Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2004; 350(4):351-360.
- (53) Scott WJ, Howington J, Movsas B. Treatment of Stage II Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003; 123(90010):188S-201.

- (54) Robinson LA, Wagner H, Jr., Ruckdeschel JC. Treatment of Stage IIIA Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003; 123(90010):202S-2220.
- (55) Mountain CF. Lung cancer staging classification. *Clin Chest Med* 1993; 14(1):43-53.
- (56) Mountain CF. Surgery for stage IIIa-N2 non-small cell lung cancer. *Cancer* 1994; 73(10):2589-2598.
- (57) Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest* 1997; 111(6):1718-1723.
- (58) Jett JR, Scott WJ, Rivera MP, Sause WT. Guidelines on Treatment of Stage IIIB Non-small Cell Lung Cancer. *Chest* 2003; 123(90010):221S-2225.
- (59) Socinski MA, Morris DE, Masters GA, Lilenbaum R. Chemotherapeutic management of stage IV non-small cell lung cancer. *Chest* 2003; 123(1 Suppl):226S-243S.
- (60) Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346(2):92-98.
- (61) Mountain CF, Hermes KE. Surgical treatment of lung cancer. Past and present. *Methods Mol Med* 2003; 75:453-487.

- (62) Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol* 1998; 16(3):1207-1217.
- (63) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M. Cancer. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, editors. *Molecular Biology of the Cell*. New York and London: Garland Science, 2002: 1313-1362.
- (64) Velu TJ, Lowy DR. Proto-oncogene activation in lung cancer. *N Engl J Med* 1988; 318(15):992.
- (65) Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1998; 77(4):663-669.
- (66) Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res* 2001; 7(7):1850-1855.
- (67) Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* 2003; 21(20):3798-3807.
- (68) Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand

- transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res* 1997; 3(4):515-522.
- (69) Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzella F, Incarbone M, Sozzi G et al. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997; 15(8):2858-2865.
- (70) Ishida T, Sugio K, Yokoyama K, Teteishi M, Oka T, Nishino T et al. [Immunohistochemical evidences of prognostic parameters associated with tumor development of pulmonary adenocarcinoma]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1991; 92(9):1107-1110.
- (71) Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304(5676):1497-1500.
- (72) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350(21):2129-2139.
- (73) Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of

- lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol* 2000; 18(18):3221-3229.
- (74) Slebos RJ, Rodenhuis S. The ras gene family in human non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1992;(13):23-29.
- (75) Rodenhuis S, Slebos RJ. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52(9 Suppl):2665s-2669s.
- (76) Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S et al. Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(2):668-675.
- (77) Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1990; 323(9):561-565.
- (78) Lu C, Soria JC, Tang X, Xu XC, Wang L, Mao L et al. Prognostic factors in resected stage I non-small-cell lung cancer: a multivariate analysis of six molecular markers. *J Clin Oncol* 2004; 22(22):4575-4583.
- (79) Greatens TM, Niehans GA, Rubins JB, Jessurun J, Kratzke RA, Maddaus MA et al. Do molecular markers predict survival in non-small-cell lung cancer? *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(4 Pt 1):1093-1097.

- (80) Velu TJ, Beguinot L, Vass WC, Willingham MC, Merlino GT, Pastan I et al. Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science* 1987; 238(4832):1408-1410.
- (81) Ichimura E, Maeshima A, Nakajima T, Nakamura T. Expression of c-met/HGF receptor in human non-small cell lung carcinomas in vitro and in vivo and its prognostic significance. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87(10):1063-1069.
- (82) Qiao H, Hung W, Tremblay E, Wojcik J, Gui J, Ho J et al. Constitutive activation of met kinase in non-small-cell lung carcinomas correlates with anchorage-independent cell survival. *J Cell Biochem* 2002; 86(4):665-677.
- (83) Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weyant RJ, Testa JR, Landreneau RJ. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997; 57(3):433-439.
- (84) Laudanski J, Chyczewski L, Niklinska WE, Kretowska M, Furman M, Sawicki B et al. Expression of bcl-2 protein in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathology and patient survival. *Neoplasma* 1999; 46(1):25-30.
- (85) Laudanski J, Niklinska W, Burzykowski T, Chyczewski L, Niklinski J. Prognostic significance of p53 and bcl-2 abnormalities in operable nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2001; 17(4):660-666.

- (86) Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *N Engl J Med* 1993; 329(10):690-694.
- (87) Anton RC, Brown RW, Younes M, Gondo MM, Stephenson MA, Cagle PT. Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Hum Pathol* 1997; 28(9):1079-1082.
- (88) Ohmura Y, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Telomerase activity and Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(8):2980-2987.
- (89) Huang CI, Neuberg D, Johnson BE, Wei JY, Christiani DC. Expression of bcl-2 protein is associated with shorter survival in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 98(1):135-143.
- (90) Borner MM, Brousset P, Pfanner-Meyer B, Bacchi M, Vonlanthen S, Hotz MA et al. Expression of apoptosis regulatory proteins of the Bcl-2 family and p53 in primary resected non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(5-6):952-958.
- (91) Hwang JH, Lim SC, Kim YC, Park KO, Ahn SJ, Chung WK. Apoptosis and bcl-2 expression as predictors of survival in radiation-treated non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50(1):13-18.

- (92) Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Ghisdal L, Mascaux C et al. Role of Bcl-2 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 89(1):55-64.
- (93) Chambers AF, MacDonald IC, Schmidt EE, Koop S, Morris VL, Khokha R et al. Steps in tumor metastasis: new concepts from intravital videomicroscopy. *Cancer Metastasis Rev* 1995; 14(4):279-301.
- (94) Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, McDermott MP, Benoit N, Yang SC et al. p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(13):961-970.
- (95) Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(18):1366-1373.
- (96) Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(12):857-862.
- (97) Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J* 2001; 18(4):705-719.

- (98) Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10):4055-4063.
- (99) Casey G, Lopez ME, Ramos JC, Plummer SJ, Arboleda MJ, Shaughnessy M et al. DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 1996; 13(9):1971-1981.
- (100) Xu HJ, Cagle PT, Hu SX, Li J, Benedict WF. Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res* 1996; 2(7):1169-1176.
- (101) Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(9):695-699.
- (102) Geradts J, Fong KM, Zimmerman PV, Maynard R, Minna JD. Correlation of abnormal RB, p16ink4a, and p53 expression with 3p loss of heterozygosity, other genetic abnormalities, and clinical features in 103 primary non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 1999; 5(4):791-800.
- (103) Volm M, Koomagi R, Rittgen W. Clinical implications of cyclins, cyclin-dependent kinases, RB and E2F1 in squamous-cell lung carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 79(3):294-299.

- (104) Shapiro GI, Rollins BJ. p16INK4A as a human tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1242(3):165-169.
- (105) Merlo A, Gabrielson E, Askin F, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9 in human primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1994; 54(3):640-642.
- (106) Gazzeri S, Gouyer V, Vour'ch C, Brambilla C, Brambilla E. Mechanisms of p16INK4A inactivation in non small-cell lung cancers. *Oncogene* 1998; 16(4):497-504.
- (107) Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D et al. Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1995; 55(24):6200-6209.
- (108) Huang CI, Taki T, Higashiyama M, Kohno N, Miyake M. p16 protein expression is associated with a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the lung. *Br J Cancer* 2000; 82(2):374-380.
- (109) Hommura F, Dosaka-Akita H, Kinoshita I, Mishina T, Hiroumi H, Ogura S et al. Predictive value of expression of p16INK4A, retinoblastoma and p53 proteins for the prognosis of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer* 1999; 81(4):696-701.
- (110) Thorgeirsson UP, Lindsay CK, Cottam DW, Gomez DE. Tumor invasion, proteolysis, and angiogenesis. *J Neurooncol* 1994; 18(2):89-103.

- (111) Salden M, Splinter TA, Peters HA, Look MP, Timmermans M, van Meerbeeck JP et al. The urokinase-type plasminogen activator system in resected non-small-cell lung cancer. Rotterdam Oncology Thoracic Study Group. *Ann Oncol* 2000; 11(3):327-332.
- (112) Malmstrom P, Bendahl PO, Boiesen P, Brunner N, Idvall I, Ferno M. S-phase fraction and urokinase plasminogen activator are better markers for distant recurrences than Nottingham Prognostic Index and histologic grade in a prospective study of premenopausal lymph node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(7):2010-2019.
- (113) Volm M, Mattern J, Koomagi R. Relationship of urokinase and urokinase receptor in non-small cell lung cancer to proliferation, angiogenesis, metastasis and patient survival. *Oncol Rep* 1999; 6(3):611-615.
- (114) Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 2000; 18(5):1135-1149.
- (115) Ray JM, Stetler-Stevenson WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; 7(11):2062-2072.
- (116) Brown PD, Giavazzi R. Matrix metalloproteinase inhibition: a review of anti-tumour activity. *Ann Oncol* 1995; 6(10):967-974.

- (117) Ponton A, Coulombe B, Skup D. Decreased expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in metastatic tumor cells leading to increased levels of collagenase activity. *Cancer Res* 1991; 51(8):2138-2143.
- (118) Ylisirnio S, Hoyhtya M, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer--TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res* 2000; 20(2B):1311-1316.
- (119) O'byrne KJ, Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Cox G, Turley H, Steward WP et al. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor and angiogenesis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2000; 82(8):1427-1432.
- (120) Harpole DH, Jr., Richards WG, Herndon JE, Sugarbaker DJ. Angiogenesis and molecular biologic substaging in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1996; 61(5):1470-1476.
- (121) Baillie R, Harada K, Carlile J, Macluskey M, Schor SL, Schor AM. Expression of vascular endothelial growth factor in normal and tumour oral tissues assessed with different antibodies. *Histochem J* 2001; 33(5):287-294.
- (122) Baillie R, Carlile J, Pendleton N, Schor AM. Prognostic value of vascularity and vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2001; 54(2):116-120.

- (123) Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY et al. Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(1):72-79.
- (124) Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT et al. Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19(2):432-441.
- (125) Ohta Y, Tomita Y, Oda M, Watanabe S, Murakami S, Watanabe Y. Tumor angiogenesis and recurrence in stage I non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1999; 68(3):1034-1038.
- (126) Ohta Y, Nozaki Z, Nozawa H, Kamesui T, Tsunozuka Y, Oda M et al. The predictive value of vascular endothelial growth factor and nm23 for the diagnosis of occult metastasis in non-small cell lung cancer. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92(3):361-366.
- (127) Fontanini G, Vignati S, Boldrini L, Chine S, Silvestri V, Lucchi M et al. Vascular endothelial growth factor is associated with neovascularization and influences progression of non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3(6):861-865.
- (128) Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two

- receptors (VEGF-R1-Fit1 and VEGF-R2-Fik1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis and survival. *J Pathol* 1999; 188(4):369-377.
- (129) A.B.Sandler, R.Gray, D.H.Johnson, M.C.Perry. Randomized phase II/III Trial of paclitaxel (P) plus carboplatin (C) with or without bevacizumab (NSC # 704865) in patients with advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): An Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Trial - E4599. *J Clin Oncol* 2005; 23(16S):4.
- (130) Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, Herbst RS, Nemunaitis JJ, Jablons DM et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(11):2184-2191.
- (131) 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* 2001; 98(24):13784-13789.
- (132) Bhattacharjee S, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1 A.D.; 98(24):13790-13795.

- (133) Wigle DA, Jurisica I, Radulovich N, Pintilie M, Rossant J, Liu N et al. Molecular profiling of non-small cell lung cancer and correlation with disease-free survival. *Cancer Res* 2002; 62(11):3005-3008.
- (134) Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8(8):816-824.
- (135) Ramirez-de-Molina A, Gallego-Ortega D, Sarmentero J, Banez-Coronel M, Martin-Cantalejo Y, Lacal JC. Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer Res* 2005; 65(13):5647-5653.
- (136) Ackerstaff E, Glunde K, Bhujwala ZM. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? *J Cell Biochem* 2003; 90(3):525-533.
- (137) Kiss Z. Regulation of mitogenesis by water-soluble phospholipid intermediates. *Cell Signal* 1999; 11(3):149-157.
- (138) Kiss Z, Mukherjee JJ, Crilly KS, Chung T. Ethanolamine, but not phosphoethanolamine, potentiates the effects of insulin, phosphocholine, and ATP on DNA synthesis in NIH 3T3 cells--role of mitogen-activated protein-kinase-dependent and protein-kinase-independent mechanisms. *Eur J Biochem* 1997; 250(2):395-402.

- (139) Aoyama C, Liao H, Ishidate K. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog Lipid Res* 2004; 43(3):266-281.
- (140) Ramirez-de-Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Gutierrez R, Martinez-Pineiro L, Sanchez J, Bonilla F et al. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(3):580-583.
- (141) Ramirez-de-Molina A, Penalva V, Lucas L, Lacal JC. Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene* 2002; 21(6):937-946.
- (142) Ramirez-de-Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Lacal JC. From Ras signalling to ChoK inhibitors: a further advance in anticancer drug design. *Cancer Lett* 2004; 206(2):137-148.
- (143) Cuadrado A, Carnero A, Dolfi F, Jimenez B, Lacal JC. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene* 1993; 8(11):2959-2968.
- (144) Ramirez-de-Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Penalva V, Lucas L, Lacal JC. Inhibition of ChoK is an efficient antitumor strategy for Harvey-, Kirsten-, and N-ras-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285(4):873-879.

- (145) Chung T, Huang JS, Mukherjee JJ, Crilly KS, Kiss Z. Expression of human choline kinase in NIH 3T3 fibroblasts increases the mitogenic potential of insulin and insulin-like growth factor I. *Cell Signal* 2000; 12(5):279-288.
- (146) Desai NN, Spiegel S. Sphingosylphosphorylcholine is a remarkably potent mitogen for a variety of cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181(1):361-366.
- (147) Desai NN, Carlson RO, Mattie ME, Olivera A, Buckley NE, Seki T et al. Signaling pathways for sphingosylphosphorylcholine-mediated mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* 1993; 121(6):1385-1395.
- (148) Gallego-Ortega D, Ramirez-de-Molina A, Gutierrez R, Ramos MA, Sarmentero J, Cejas P et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against choline kinase alpha and their potential use as diagnostic tools in cancer. *Int J Oncol* 2006; 29(2):335-340.
- (149) Romano PS, Mark DH. Patient and hospital characteristics related to in-hospital mortality after lung cancer resection. *Chest* 1992; 101(5):1332-1337.
- (150) Nagasaki F, Flehinger BJ, Martini N. Complications of surgery in the treatment of carcinoma of the lung. *Chest* 1982; 82(1):25-29.
- (151) Vincent RG, Takita H, Lane WW, Gutierrez AC, Pickren JW. Surgical therapy of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1976; 71(4):581-591.

- (152) Keagy BA, Lores ME, Starek PJ, Murray GF, Lucas CL, Wilcox BR. Elective pulmonary lobectomy: factors associated with morbidity and operative mortality. *Ann Thorac Surg* 1985; 40(4):349-352.
- (153) Rodriguez-Gonzalez A, de Molina AR, Fernandez F, Ramos MA, Nunez MC, Campos J et al. Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene* 2003; 22(55):8803-8812.
- (154) Rodriguez-Gonzalez A, Ramirez-de-Molina A, Fernandez F, Lacal JC. Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly specific and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action. *Oncogene* 2004; 23(50):8247-8259.
- (155) Jimenez B, del Peso L, Montaner S, Esteve P, Lacal JC. Generation of phosphorylcholine as an essential event in the activation of Raf-1 and MAP-kinases in growth factors-induced mitogenic stimulation. *J Cell Biochem* 1995; 57(1):141-149.
- (156) Warden CH, Friedkin M. Regulation of choline kinase activity and phosphatidylcholine biosynthesis by mitogenic growth factors in 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 1985; 260(10):6006-6011.
- (157) Ko KW, Cook HW, Vance DE. Reduction of phosphatidylcholine turnover in a Nb 2 lymphoma cell line after prolactin treatment. A novel mechanism for control of phosphatidylcholine levels in cells. *J Biol Chem* 1986; 261(17):7846-7852.

- (158) Vigo C, Paddon HB, Millard FC, Pritchard PH, Vance DE. Diethylstilbestrol treatment modulates the enzymatic activities of phosphatidylcholine biosynthesis in rooster liver. *Biochim Biophys Acta* 1981; 665(3):546-550.
- (159) Macara IG. Elevated phosphocholine concentration in ras-transformed NIH 3T3 cells arises from increased choline kinase activity, not from phosphatidylcholine breakdown. *Mol Cell Biol* 1989; 9(1):325-328.
- (160) Teegarden D, Taparowsky EJ, Kent C. Altered phosphatidylcholine metabolism in C3H10T1/2 cells transfected with the Harvey-ras oncogene. *J Biol Chem* 1990; 265(11):6042-6047.
- (161) Hernandez-Alcoceba R, Saniger L, Campos J, Nunez MC, Khaless F, Gallo MA et al. Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* 1997; 15(19):2289-2301.
- (162) Nakagami K, Uchida T, Ohwada S, Koibuchi Y, Morishita Y. Increased choline kinase activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(11):1212-1217.
- (163) Nakagami K, Uchida T, Ohwada S, Koibuchi Y, Suda Y, Sekine T et al. Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(4):419-424.
- (164) Finney RE, Nudelman E, White T, Bursten S, Klein P, Leer LL et al. Pharmacological inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis is associated

- with induction of phosphatidylinositol accumulation and cytolysis of neoplastic cell lines. *Cancer Res* 2000; 60(18):5204-5213.
- (165) Ratnam S, Kent C. Early increase in choline kinase activity upon induction of the H-ras oncogene in mouse fibroblast cell lines. *Arch Biochem Biophys* 1995; 323(2):313-322.
- (166) Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(9):1204-1207.
- (167) Aoyama C, Yamazaki N, Terada H, Ishidate K. Structure and characterization of the genes for murine choline/ethanolamine kinase isozymes alpha and beta. *J Lipid Res* 2000; 41(3):452-464.
- (168) Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 352(25):2589-2597.
- (169) Hernandez-Alcoceba R, Fernandez F, Lacal JC. In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer Res* 1999; 59(13):3112-3118.
- (170) Rodriguez-Gonzalez A, Ramirez-de-Molina A, Benitez-Rajal J, Lacal JC. Phospholipase D and choline kinase: their role in cancer development and their potential as drug targets. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5:191-201.

- (171) Monks DE, Goode JH, Dewey RE. Characterization of soybean choline kinase cDNAs and their expression in yeast and *Escherichia coli*. *Plant Physiol* 1996; 110(4):1197-1205.
- (172) Ancelin ML, Vial HJ. Choline kinase activity in *Plasmodium*-infected erythrocytes: characterization and utilization as a parasite-specific marker in malarial fractionation studies. *Biochim Biophys Acta* 1986; 875(1):52-58.
- (173) Ishidate K, Nakazawa Y. Choline/ethanolamine kinase from rat kidney. *Methods Enzymol* 1992; 209:121-134.
- (174) Ishidate K. Choline/ethanolamine kinase from mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1348(1-2):70-78.
- (175) Carrasco MP, Segovia JL, Marco C. Modulation of biosynthesis of phosphatidylcholine via CDP-choline in rat liver: influence of ethanol on the microsomal cholinephosphotransferase activity. *Mol Cell Biochem* 2001; 217(1-2):43-50.
- (176) Wieprecht M, Wieder T, Geilen CC. N-[2-bromocinnamyl(amino)ethyl]-5-isoquinolinesulphonamide (H-89) inhibits incorporation of choline into phosphatidylcholine via inhibition of choline kinase and has no effect on the phosphorylation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase. *Biochem J* 1994; 297 (Pt 1):241-247.

- (177) Barlow P, Marchbanks RM. Effect of ethyl choline mustard on choline dehydrogenase and other enzymes of choline metabolism. *J Neurochem* 1984; 43(6):1568-1573.
- (178) WITTENBERG J, KORNBORG A. Choline phosphokinase. *J Biol Chem* 1953; 202(1):431-444.
- (179) Wecker L, Reinhardt RR. Adenosine inhibits choline kinase activity and decreases the phosphorylation of choline in striatal synaptosomes. *J Neurochem* 1988; 50(6):1945-1951.
- (180) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11(9):1026-1030.
- (181) Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10(4):413-417.
- (182) Mocellin S, Rossi CR, Marincola FM. Quantitative real-time PCR in cancer research. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2003; 51(5):301-313.
- (183) Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med* 2003; 9(5):189-195.

- (184) 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):402-408.

12. Glosario.

BNCO. Bronconeumopatía crónica obstructiva.

C, Cho. Colina.

CATX-8. Proteína relacionada con ras, rab-25.

Chok. Colina-quinasa.

CPCNP. Carcinoma de pulmón de célula no pequeña.

EGF. Factor de crecimiento epidérmico.

EGFR: Receptor del Factor de crecimiento epidérmico.

FGF. Factor de crecimiento de fibroblastos.

GAP. Proteínas activadoras de GTPasas.

GDI. Inhibidores de la disociación de guanina.

GEF. Factores intercambiadores de nucleótidos de guanina.

HGF. Factor de crecimiento de hepatocitos.

HMGIIY. Proteína del grupo de alta motilidad isoforma I e Y.

HPCAL-4. Proteína similar a la hipocalcina 4.

HRG. Herregulina.

IGFBP3. Proteína de unión al factor de crecimiento similar a insulina 3.

LDH. Lactato deshidrogenasa.

MAPK. Proteína-quinasa activada por mitógenos.

MMP. Metaloproteinasas de la matriz.

NOLA-3. Miembro 3 de la familia nucleolar.

PA. Activador del plasminógeno

PAI. Inhibidor del activador del plasminógeno.

PCho. Fosfocolina.

PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PI3K. Fosfatidilinositol 3 quinasa.

qRT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

RhoA. Miembro A de la familia de genes homólogos a ras.

ROCK. Proteinquinasa 1 asociada a Rho.

S1P. Esfingosina-1-fosfato.

SFTP. Proteínas del surfactante pulmonar.

SG. Supervivencia global.

SLE. Supervivencia libre de enfermedad.

SPC. Esfingosilfosfocolina.

TGF. Factor de crecimiento transformante.

THP. Tiempo hasta la progresión.

TIMP. Inhibidor tisular de las metaloproteinasas de la matriz.

TK. Tirosín-quinasa.

t-PA. Activador tisular del plasminógeno.

TTF-1. Factor de transcripción tiroidea.

uPA. Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.

VEGF-C. Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular C